

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/9175
IB/81140

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1987

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



UNICAMP

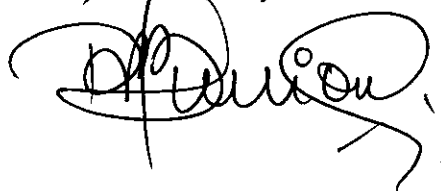
INSTITUTO DE BIOLOGIA

TÉCNICAS DE PROTOPLASTIZAÇÃO E ISOLAMENTO
DE DNA DE ALTO PESO MOLECULAR DE *Aspergillus niger*.

CAMPINAS SP

Tese defendida pela candidata Maria Luíza
Borges e aprovada pela Comissão Julgadora

Campinas, 15 de dezembro de 1987
MARIA INÊS BORGES



TÍTULO - Técnicas de protoplastização e isolamento
de DNA de alto peso molecular de
Aspergillus niger

ORIENTADOR: Prof. Dr. RENATO BONATELLI JR.

CO-ORIENTADORES: Prof. Maristela O. Azevedo
Prof. Maria Sueli S. Felipe

DISSERTAÇÃO apresentada ao Insti-
tuto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas, área Ge-
nética.

CAMPINAS - SP

1987

UNICAMP

Classif.	T
Autor	BGJST
V.	Ex.
Tombo BC/	9175
JB / 765	

IB/81140
34 9175

À

Dilza e José Borges,
que me deram a vida
e
força maior de vivê-la,

DEDICO

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Spartaco A. Filho, pela acolhida carinhosa, o que me permitiu desenvolver no laboratório de Biologia Molecular da UnB, a segunda parte do trabalho de tese sob suas valiosas sugestões.

À Prof. Maristela O. Azevedo, pela orientação, amizade e apoio desde o início deste trabalho.

Ao Prof. Renato Bonatelli Jr., pela amizade, que permitiu este trabalho conjunto relevando-o com a sua orientação e experiência.

À Prof. M. Sueli S. Felipe, pela amizade, que com prontidão e paciência contribuiu na realização das dosagens colorimétricas do DNA.

À Prof. Elza A. de Luna, pela amizade, incentivo e auxílio na parte citológica.

Aos Profs. Helena Luna e Felizardo P. da Silva pela total liberdade de uso do laboratório de Genética da UnB, possibilitando-me o desenvolvimento da primeira parte desta tese.

Ao Prof. Rolf D. Illg e demais membros da comissão de pós graduação do Dept^o de Genética e Evolução pela concessão à permuta - Unicamp/UnB - o que favoreceu este trabalho.

Ao Prof. João Lúcio de Azevedo, pelo estímulo inicial, amizade e confiança despositada na formação de seus estagiários.

Ao Prof. Carlos Roberto Félix, pela liberdade de trabalho no laboratório de Enzimologia da UnB e por algumas linhagens de fungos concedidas.

Aos Profs. Cláudio L. Messias, João L. de Azevedo e Ivanhoé R. Baracho pela revisão final e alterações sugeridas à esta tese.

Ao CNPq e CAPES, pela concessão de bolsas de estudo.

Aos amigos e parentes não citados que sempre me estimularam a prosseguir e Yessalto com carinho, meus irmãos: Toim, Verônica, Mônica e tia Dagmar.

AGRADECIMENTOS

À amiga Rosa Lizana, pelo carinho e ao Jaime Ramirez, minhas saudades.

Aos amigos, Cláudio Mello e Lídia Pepe, pela atenção prestada à redação final do "summary".

Ao Pedro Zanotta, pelas discussões, durante a elaboração final deste trabalho.

Aos amigos de Campinas: Helena, Rodolfo, Solange, Lucho e aos colegas do curso de pós graduação de Genética na área de microrganismos.

Aos amigos de Brasília: Bia, Elita, Ildinete, Cirano, Luiz Artur, Suzy, Marta, Fernando Fortes, Fernando Araripe, Renata, Marcos, especialmente ao Heitor, Lourdes, Lucília Kátia e Soninha.

Aos técnicos e auxiliares da UnB: Petrônio, Ornil, Gláucia, Pedro, Fátima, Celso e ao Nestor pelas fotografias.

Aos professores, secretários, técnicos e auxiliares da Unicamp que de certa forma contribuíram ao andamento deste trabalho.

Ao Gisaldo do Nascimento e Roberto Ribeiro pela paciência e trabalho para edição desta tese.

ABREVIATURAS

DFA	-	difenilamina
DNA	-	ácido desoxirribonucleico
DNase	-	desoxirribonuclease
DTT	-	ditiotreitól
EDTA	-	ácido etilenodiaminotetracético
EtBr	-	brometo de etídio
Kb	-	quilobase
mA	-	miliampere
nm	-	nanômetro
M	-	peso molecular
p/v	-	peso por volume
RNA	-	ácido ribonucleico
RNase	-	ribonuclease
SDS	-	dodecilsulfato de sódio
TRIS	-	tris (hidroximetil) aminometano
v/v	-	volume por volume
YG	-	extrato de levedura e glicose
YGT	-	extrato de levedura, glicose e Tween 80

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1 Produção de Protoplastos	03
2.1.1 Enzimas líticas	05
2.1.2 Utilização de fatores auxiliares das enzimas líticas	09
2.1.3 Otimização de estabilizadores osmóticos	12
2.2 Extração de DNA	13
2.3 Aplicações mais Recentes Envolvendo Protoplastos e DNA	18
2.3.1 Complementação com marca de seleção para auxotrofia	19
2.3.2 Isolamento de sequência de replicação autônoma ("ARS") através da utilização de vetores integrativos	20
2.3.3 Integração de genes exógenos com objetivos de se expressar uma característica de interesse	21

2.3.4	Fusão de protoplastos	22
3.	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Procedência das Linhagens	23
3.2	Meios de cultura Utilizados	24
3.2.1	Meio mínimo - MM (PONTECORVO <u>e col.</u> , 1953) ..	24
3.2.2	Meio mínimo líquido	24
3.2.3	Meio completo - MC (PONTECORVO <u>e col.</u> , -1953) modificado por AZEVEDO e COSTA, (1973)	24
3.2.4	Meio completo líquido	25
3.2.5	Meio mínimo duas vezes concentrado (MM 2xC) e meio completo duas vezes concentrado (MC 2xC)	25
3.2.6	Meio YGT (GAMBINO <u>e col.</u> , 1984)	25
3.2.7	Meio YG (GAMBINO <u>e col.</u> , 1984)	26
3.2.8	Esterilização e conservação	26
3.3	Preparo de Soluções para Tratamento de Conídios e Protoplastos	26
3.3.1	Solução de caseína hidrolizada (AZEVEDO e COSTA, 1973)	26
3.3.2	Solução de ácido nucleico hidrolizado de levedura (AZEVEDO e COSTA, 1973)	26

3.3.3	Solução e vitaminas (AZEVEDO e COSTA, 1973)	27
3.3.4	Solução salina (0,85%)	27
3.3.5	Solução tampão fosfato 0,2M	28
3.3.6	Solução tampão fosfato 0,02M	28
3.3.7	Solução tampão fosfato para coloração de conídios e protoplastos (FURTADO, 1968)	30
3.3.8	Solução de KCl (ISAAC, 1979)	30
3.3.9	Solução MgSO 1,0M	31
3.3.10	Solução estabilizadora de Sorbitol	31
3.3.11	Solução de albumina 5% (ROBINOW e CATEN, 1969)	32
3.3.12	Solução fixadora para conídios (FURTADO, 1968)	32
3.3.13	Solução fixadora para protoplastos	32
3.3.14	Solução de HCl 1N (37%)	32
3.3.15	Solução corante de Giemsa (BEÇAK e PAULETE, 1976)	33
3.4	Preparo de Soluções para Tratamento do DNA	33
3.4.1	Tampão de extração de DNA de protoplastos (pH = 8,0)	33
3.4.2	Tampões para as demais extrações	33
3.4.3	Solução de espermidina I (pH = 8,0) (MORRIS, 1978, modificado)	34
3.4.4	Solução tampão (TR) (MANIATIS e <u>col</u> ., 1982).	34
3.4.5	Solução tampão (TE) (MANIATIS e <u>col</u> ., 1982).	35

3.4.6	Solução de espermidina II - 10x (TP) (solução 10 vezes concentrada)	35
3.4.7	Solução espermidina II' (TP')	35
3.4.8	Solução - TL	36
3.4.9	Solução clorofane (MANIATIS e <u>col.</u> ., 1982)...	36
3.4.10	Solução de ribonuclease (RNase-A)	36
3.4.11	Solução tampão borato 10x (10 vezes concentrada) (TEB 10x) para eletroforese (MANIATIS e <u>col.</u> ., 1982)	37
3.4.12	Solução tampão para amostra de eletroforese (TA) 3x (3 vezes concentrada) .	37
3.4.13	Solução de brometo de etídio (EtBr) a 1% (MANIATIS e <u>col.</u> ., 1982)	37
3.4.14	Solução de difenilamina - DFA (GILES e MYERS, 1965)	38
3.4.15	Solução de cloreto de césio (CsCl) (MANIATIS e <u>col.</u> ., 1982)	38
3.4.16	Solução tampão para enzima de restrição (MANIATIS e <u>col.</u> ., 1982)	39
3.4.17	Solução tampão para o sistema de ligação (MANIATIS e <u>col.</u> ., 1982)	39
3.5	Preparo de Gel de Agarose 1% para Eletroforese (MANIATIS e <u>col.</u> ., 1982)	39
3.6	Manutenção de Culturas.....	40
3.7	Obtenção de Protoplastos	40

3.7.1	Método descrito por HAMLIN <u>e col.</u> (1981) ...	40
3.7.2	Método descrito por GAMBINO <u>e col.</u> (1984) modificado	42
3.7.3	Técnica de coloração de protoplastos (LUNA, 1985) modificado pela autora	44
3.7.4	Técnica para observação nuclear em conídios e micélio (LUNA, 1985)	44
3.8	Extração de DNA Total do Fungo Filamentoso <u>Aspergillus niger</u>	45
3.8.1	Extração de DNA de protoplastos	45
3.8.2	Extração de DNA de micélio	46
3.9	Critérios de Análise do DNA de <u>Aspergillus</u> <u>niger</u>	53
3.9.1	Dosagem do DNA pelo método da difenilamina (DFA)	53
3.9.2	Dosagem do DNA segundo Warburg	54
3.9.3	Medidas de DNA/CsCl em refratômetro	54
3.9.4	Sistema de eletroforese	55
3.9.5	Sistema de digestão com enzimas de restrição <u>Eco</u> RI e religação com a T ₄ DNA-ligase	56
4.	RESULTADOS	58

4.1	Protoplastos de <u>Aspergillus niger</u>	58
4.1.1	Aspectos do micélio antes e após digestão da parede celular	58
4.1.2	Influência dos métodos e estabilizadores osmóticos no número de protoplastos	58
4.1.3	Algumas considerações sobre conídios e protoplastos	59
4.1.4	Estudo citológico dos conídios, hifas e protoplastos	61
4.2	Características do DNA Obtido de Protoplastos de <u>A niger</u>	64
4.3	Características do DNA do <u>A. niger</u> Obtido do Micélio	64
4.3.1	Com uso de pérolas de vidro	64
4.3.2	Com uso de nitrogênio líquido	68
4.3.3	Com uso de nitrogênio líquido e redução do tempo de manipulação	70
4.3.4	Aplicação da metodologia padronizada na extração de DNA de outros fungos filamentosos	73
4.3.5	Variação do grau de pureza do DNA ao longo do procedimento de extração	73
4.3.6	Dosagem e medida de recuperação do DNA através do método da difenilamina	75

4.3.7	Purificação por cloreto de césio (CsCl)	75
4.3.8	Perfil de restrição e ligação do DNA de <u>A. niger</u>	75
5.	DISCUSSÃO	80
5.1	Protoplastos	80
5.2	Estudo Citológico dos Protoplastos	82
5.3	Extração de DNA Total de <u>Aspergillus niger</u>	83
6.	CONCLUSÕES	89
7.	RESUMO	92
8.	SUMMARY	94
9.	BIBLIOGRAFIA	96

1. INTRODUÇÃO

A grande importância que se tem dado ao estudo do Aspergillus niger deve-se à sua utilização em processos de fermentação, com os quais podem ser obtidos vários metabólitos de interesse industrial (LOCKWOOD, 1975; BANKS e col., 1976).

Do ponto de vista genético, desde a determinação da ocorrência do ciclo parassexual por PONTECORVO e col. (1953) diversos trabalhos foram realizados tanto com linhagens que não são utilizadas industrialmente (LHOAS, 1967; VAN TUYL, 1977) como com linhagens industriais (CHANG e TERRY, 1973; DAS e ILCZUK, 1978; BALL e col., 1978; BONATELLI JR. e col., 1983). Os resultados indicam que há possibilidade de se obter melhoramento da produção de metabólitos por indução de mutações, pelo uso de diplóides e/ou segregantes em escala industrial.

Um aspecto ainda pouco explorado nesta espécie é o estudo do ponto de vista molecular, do qual destacamos a clonagem gênica e a transformação genética. Para que estas técnicas sejam plenamente desenvolvidas são requisitos mui-

to importantes a otimização da produção de protoplastos e das técnicas de extração de DNA.

Considerando os aspectos acima, o presente trabalho tem como objetivos:

I) definir uma metodologia que permita obter número elevado de protoplastos bem como estabelecer melhores condições de regeneração dos mesmos.

II) determinar um método adequado para a extração de DNA de alto peso molecular, alto grau de pureza possibilitando a sua digestão por enzimas de restrição e posterior religação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Produção de Protoplastos

As bactérias gram-positivas e gram-negativas têm sido utilizadas há mais de cinquenta anos, por diferentes pesquisadores, para a obtenção de protoplastos, segundo HOPWOOD (1981).

Os estudos genéticos desenvolvidos nas últimas décadas utilizando procariotos se beneficiaram sobremaneira das técnicas de produção e regeneração de protoplastos, principalmente com microrganismos dos gêneros Bacillus e Streptomyces.

FODOR e col. (1976) e SCHAEFFER e col. (1976) obtiveram recombinantes de Bacillus, através da fusão de protoplastos assim como HOPWOOD e col. (1977) também os obtiveram de Streptomyces. Transformantes desses actinomicetos são também bons exemplos do sucesso obtido por BIBB e col. (1978) na utilização de protoplastos em experimentos de

transformação. No entanto, o estabelecimento da competência celular desenvolvida por DAGERT e EHRLICH (1979) em Escherichia coli tem feito deste microrganismo um modelo para aplicação dessas técnicas em procariotos.

Dentro do grupo dos eucariotos, Saccharomyces cerevisiae representa um sistema bem esclarecido, desde as etapas de obtenção até as de regeneração de protoplastos. Este sistema ficou definido a partir dos trabalhos desenvolvidos por HINNEN (1978) e BEGGS (1978) que utilizaram a enzima zimoliase na obtenção de protoplastos em função da eficiência de transformação.

Recentemente tem sido pesquisado o uso de lipossomos, membranas de fosfolipídios, como veículos de transferência de DNA nos protocolos de transformação. Estas vesículas encapsulando o DNA de interesse são misturadas com os protoplastos e, através da fusão de membranas, ocorre a penetração do material genético na célula (AHN e PACK, 1985). A eficiência do processo foi estudada por vários autores em diferentes circunstâncias: RADFORD e col. (1981) utilizaram protoplastos de Neurospora crassa, HOLUBOVA e col. (1985) protoplastos de Bacillus subtilis, AHN e PACK (1985) estudaram a transformação de Saccharomyces cerevisiae, na presença de DNA encapsulado em lipossomos, contudo, não observaram aumento significativo na eficiência. Porém, destacaram serem estes veículos potentes tanto para a introdução de plasmídios na célula, como para dificultarem a ação de

DNases presentes no sistema.

Pode-se considerar que os problemas de obtenção e regeneração de protoplastos envolvem os seguintes itens:

- utilização de enzimas líticas na digestão da parede celular;
- utilização de fatores auxiliares das enzimas durante a digestão;
- escolha adequada de estabilizadores osmóticos.

2.1.1 - Enzimas líticas

EMERSON e EMERSON (1958) foram os primeiros a observarem protoplastos de fungos filamentosos usando mutantes osmóticos de Neurospora crassa, deficientes na formação de parede celular. Essas linhagens evidenciaram sensibilidade osmótica ao serem incubadas num sistema lítico, liberando protoplastos. BACHMANN e BONNER (1959) observaram os mesmos resultados incubando conídios e hifas jovens de N. crassa durante quatro dias, com as enzimas líticas do caramujo Helix pomatia. Outros fungos como Penicillium italicum, Helminthosporium gramineum, Alternaria citri, Verticillium albo-atrum, Trichotecium roseum e Mucor sphaerosporum, ao serem submetidos ao mesmo tratamento, responderam de maneira semelhante, com a enzima comercial-

mente denominada de Helicase - BDH (suco digestivo do caramujo). Em Aspergillus nidulans e Fusarium culmorum a liberação de protoplastos ocorreu com apenas duas horas de incubação (AGUIRRE e VILLANUEVA, 1962).

HAMILTON e CALVET (1964) obtiveram protoplastos dos mutantes osmóticos de Neurospora crassa sem o uso de enzimas líticas. Eles aumentaram a concentração de açúcares no meio de cultura até 20% e verificaram que a partir de 10% ocorria a liberação e manutenção de protoplastos. Este fato foi atribuído a inibição da síntese da parede celular e à pressão osmótica, favorecendo a formação de protoplastos. A impossibilidade de se utilizar tal procedimento com outros fungos filamentosos, forçou o desenvolvimento de outras metodologias que permitissem a obtenção de protoplastos utilizando diferentes preparados de enzimas líticas.

Dentre os autores que utilizaram enzimas líticas como principal ferramenta na obtenção dos protoplastos destacaram-se MUSÍLKOVA e FENCL (1968). Eles demonstraram que a concentração da enzima afetava a produção de protoplastos de vários fungos como Penicillium purpurogenum, Rhizopus nigricans, Cephalosporium salmosynematum, Cladosporium fulvum, Botrytis paeoniae, Alternaria tenuis, A. tomato, Aspergillus niger e A. oryzae. Observaram ainda que, não só a concentração de enzimas, mas também a variação nas fontes de carbono e nitrogênio dos meios de cultura interferiam na liberação dos protoplastos. Para o A. niger constataram que

o número de protoplastos oscilou entre 10^4 - 10^6 /ml, sendo que, a produção decrescia com a variação da temperatura (25° - 43° C) e idade do micélio (15 - 40 horas). Paralelamente, o número aumentava em função dos menores pesos úmidos de micélio (0,3 a 0,5 mg) com a quantidade de 10 mg de enzima lítica fixada para os experimentos.

Posteriormente MUSÍLKOVA e col. (1969) relataram também a preparação de um sistema enzimático de Penicillium purpurogenum capaz de lisar a parede de hifas jovens e liberar protoplastos de fungos filamentosos. Obtiveram protoplastos de Aspergillus niger, A. awamori e Penicillium chrysogenum, utilizando o produto das culturas do P. purpurogenum, saturado com 80% de sulfato de amônia. Verificaram que o número de protoplastos atingiu valores da ordem de 10^6 , equivalente ao do controle tratado com Helicase. Valores inferiores foram observados no tratamento dos fungos Aspergillus oryzae, Cephalosporium e Trichothecium roseum. Constataram ainda que, o complexo enzimático obtido do P. purpurogenum, não apresentou nenhuma ação na liberação dos protoplastos dos micélios de Fusarium melanosporum e Cladosporium fulvum, quando submetidos às mesmas condições de ensaio.

Diversos outros grupos tentaram estabelecer sistemas autolíticos visando criar alternativas que facilitassem a obtenção de protoplastos. REYES e LAHOZ (1976) descreveram um método de liberação a partir do micélio jovem de

Neurospora crassa, utilizando o complexo enzimático obtido desse fungo. Protocolo semelhante foi montado por ISAAC e GOKHALE (1982) que observaram a presença de protoplastos de Aspergillus nidulans após incubar o micélio com enzimas líticas do próprio A. nidulans. Verificaram que, o ponto máximo de atividade autolítica coincidia com o número maior de protoplastos obtidos no sistema.

Outras alternativas na busca de enzimas que fossem eficientes e que aumentassem a frequência de protoplastos, foram testadas por ACHA e VILLANUEVA (1963) e AGUIRRE e col. (1964). Os autores compararam estreptoizima extraída de Streptomyces com a Helicase de Helix pomatia. Constataram seus efeitos lesivos sobre a parede celular de fungos filamentosos e leveduras, com produção semelhante de protoplastos em ambos os tratamentos.

Os fungos do gênero Trichoderma, desde a década de 70, têm sido empregados na produção de enzimas líticas. VRIES e WESELS (1972) utilizavam enzimas presentes no meio de cultura de Trichoderma viride no ataque à parede de Schizophyllum commune com a conseqüente produção de protoplastos. ISAAC e PEBERDY (1979) executaram o mesmo procedimento com Trichoderma harzianum obtendo protoplastos de Aspergillus nidulans e de outros gêneros de fungos.

Atualmente, complexos enzimáticos produzidos comercialmente têm sido mais utilizados, em função da especifici-

cidade de hidrólise, sobre os diferentes componentes da parede celular dos fungos (JOHNSTON, 1965; HASEGAWA e NORDIN, 1969; HAMLYN e col., 1981; ROKEM e col. 1986).

HAMLYN e col. (1981) trabalharam com várias enzimas comerciais e estudaram a ação isolada e combinada entre elas como segue abaixo:

Novozym 234 / Cellulase CP,
Novozym 234 / Cereflo,
Novozym 234 / Cellulase CP / Cereflo,
Novozym 234 / Cellulase CT / Cereflo,
Novozym 234 / Cellulase (Merck) / Cereflo e
Cellulase CP / Cereflo.

Os autores montaram sistemas líticos para os fungos Aspergillus niger, A. nidulans, A. rugulosus e A. ochraceus, conseguindo resultados variados em relação a produção de protoplastos da ordem de 10^6 - 10^7 protoplastos/ml.

2.1.2 - Utilização de fatores auxiliares das enzimas líticas.

Outros tratamentos puderam ser incluídos ao sistema de digestão da parede celular de fungos, visando facilitar a ação das enzimas líticas. DOOIJEWAARD KLOOSTERZIEL e col. (1973) acrescentaram compostos de tiois, tais como ditio-treitol (DTT), 2 - mercaptoetanol ou cisteamina como

tratamento preliminar da cultura líquida do fungo Geotrichum candidum. Observaram que a liberação dos protoplastos ocorreu de maneira mais rápida e eficiente, facilitando o estudo que vinham desenvolvendo sobre os mecanismos de secreção de lipases extracelulares. As pesquisas no sentido de estudar o processamento da biossíntese da cefalosporina, foram desenvolvidas por FAWCETT e col. (1973) que submeteram também o micélio do Cephalosporium acremonium, aos compostos acima citados resultando na obtenção de protoplastos. Para o grupo dos Aspergillus HAMLIN e col. (1981) observaram que a presença desses tióis, não afetava a produção de protoplastos nesse fungo, fato que era perceptível apenas quando utilizavam as linhagens de Acremonium chrysogenum e Saccharomyces cerevisiae.

O uso de detergentes no tratamento auxiliar das enzimas digestivas, foi uma estratégia montada por SIETSMA e BOER (1973) quando se detiveram a estudar a regeneração da parede de protoplastos em linhagens de Pythium. Ao submeterem o micélio desse fungo a um pré-tratamento com detergentes (Triton X-100, Deoxicolato e lauril sulfato de sódio) verificaram que o Triton X-100 foi o mais eficiente, facilitando a ação enzimática (cellulase e helicase) liberando uma grande quantidade de protoplastos em 4 horas de incubação. Durante os testes com Pythium, verificaram que tanto os derivados de tiol quanto os agentes quelantes (citrato e EDTA) promoviam tal efeito sendo a eficiência de regeneração em meio líquido e sólido de aproximadamente 30%. Obser-

varam também que a regeneração só ocorria na presença de estabilizadores orgânicos.

Em relação ao Aspergillus niger, COLE e POPE (1981) citaram os detergentes Triton X-100, Nonidet P-40, Tween - 80 e Dodecil sulfato de sódio (SDS) como os causadores da liberação crescente de protoplastos, quando acrescentados ao sistema nas concentrações (p/v) de 0,1%, 0,2% e 0,5%. Acima desse patamar a produção se mantinha embora o SDS a 1% interferisse na germinação dos conídios.

Os detergentes têm-se prestado também ao estudo da cinética de divisão celular, pois também favorecem a sincronização dos ciclos mitóticos (BERGEN e MORRIS, 1983). Linhagens selvagens e mutantes de Aspergillus nidulans, foram selecionadas por GAMBINO e col. (1984) para análise dos microtúbulos durante o período da interfase da mitose. Para tanto foi necessária a remoção da parede celular com Novozym 234 com o auxílio de Tween - 80 a 0,2%, e os protoplastos foram analisados por imunofluorescência, após 10 horas de crescimento.

Em relação à participação de aminoácidos STEVENSON (1985) verificou que o acréscimo da glicina 3,7% (p/v) combinada a lisozima, facilita a digestão da parede de Streptomyces coelicolor. O autor observou a liberação de protoplastos a partir de tubos germinativos e de micélio, em microscópio eletrônico.

2.1.3 - Otimização de estabilizadores osmóticos

Inicialmente BACHMANN e BONNER (1959) determinaram que os melhores estabilizadores osmóticos para protoplastos de Neurospora crassa, eram sacarose, maltose, ramnose e frutose. Estes, juntamente com manitol e sorbitol foram posteriormente classificados por SIETSMA e BOER (1973) como estabilizadores orgânicos e as soluções de KCl, NaCl, NH₄Cl, MgSO₄ designadas de estabilizadores inorgânicos. Esses autores verificaram através de ensaios osmóticos, que a formação de protoplastos de Pythium era afetada na presença dos estabilizadores orgânicos e prontamente favorecida na presença dos inorgânicos ao contrário do que ocorria nas placas de regeneração.

Fatores como esses fizeram com que estudos de otimização de soluções fossem desenvolvidas para cada fungo em questão.

Para o Aspergillus nidulans ficaram padronizadas soluções de KCl e MgSO₄ 0,6M, na preservação da membrana dos protoplastos. Nessas condições, ISAAC (1979) analisou ultraestruturas e também determinou a variabilidade do número de núcleos presentes nos protoplastos liberados com 1 e 3 horas de digestão da parede celular. Verificou-se que o número máximo de 10 núcleos correspondia as preparações com MgSO (PEBERDY, 1979).

Para os protoplastos de Humicola sp. MACEDO (1986) verificou que dos vários estabilizadores utilizados, o $MgSO_4$ foi o que melhor favoreceu a regeneração em meio de cultura sobrepujando-se ao efeito do sorbitol.

2.2 - Extração de DNA

Vários métodos de isolamento de DNA têm sido propostos com o interesse de se estabelecer um procedimento geral que sirva de base aos mais diversos organismos. Apesar de alguns métodos já estarem definidos, continua havendo a preocupação de ajustá-los e otimizá-los de acordo com as particularidades do tipo celular com que se está trabalhando (SMITH e HALVORSON, 1967; SPECHT e col., 1982; GARBNER e YODER, 1983). Conseguir DNA biologicamente ativo e livre de impurezas é essencial para submetê-lo à análises.

Visando a estes objetivos MARMUR (1961) foi um dos primeiros pesquisadores a relatar detalhadamente, um procedimento mediante o qual foram testados aproximadamente 200 microrganismos. Ressaltou a importância dos componentes das soluções utilizadas em cada etapa, destacando a ação do clorofórmio, dodecil sulfato de sódio (SDS) e agentes quelantes na desnaturação das proteínas e inibição das DNases. O autor conseguiu, a partir de 1 - 2g de células, obter 2mg de DNA que utilizou para determinar medidas físicas como coeficiente de sedimentação ($S_{20,w}$), temperatura média de

fusão (Tm) e peso molecular (PM). A confirmação das propriedades biológicas dessa molécula, ele obteve transformando linhagens de Diplococcus pneumoniae e de Bacillus.

As informações citadas acima vieram fortalecer trabalhos posteriores nos quais a maioria dos pesquisadores as utilizou e discutiu o mecanismo de ação do detergente SDS (NOLL e STUTZ, 1967) e do perclorato de sódio (Na ClO₄) no isolamento de ácidos nucleicos de bacteriófagos (FREIFELDER, 1967). O uso do NaClO₄, em altas concentrações (5M), foi uma alternativa descrita por MARMUR (1961) para auxiliar a dissociação das nucleoproteínas. Este autor concluiu que não é possível descrever uma técnica única que seja eficiente na purificação de DNA de vários microrganismos, sugerindo alterações ao longo das etapas e adaptações desse método na extração de DNA de tecidos animais (KALF e GRÉCE, 1967; KLETT e SMITH, 1968). Para tecidos vegetais, as alterações relatadas (STERN, 1968) se referem essencialmente à ruptura da parede celulósica dos diferentes órgãos e a substituição do fenol pelo SDS a 5% (p/v).

As soluções propostas serviram de base para o estabelecimento de métodos mais refinados na extração de DNA, independentemente do tipo de célula em estudo. Os objetivos almejados eram preparações mais puras para que se pudesse caracterizar melhor essa molécula.

O processo de purificação do DNA, quer seja ele de

origem animal, vegetal ou de microrganismos, apresenta muita resistência na separação dos polissacarídeos na etapa final. Em relação a estas dificuldades EDELMAN (1975) sugere o uso da coluna de concanavalina A ligada à sefarose para facilitar tal separação. Os polissacarídeos ligam-se à resina da coluna por afinidade de cargas e as moléculas de DNA a atravessam. Ele obteve assim mais de 95% do DNA livre de polissacarídeos. Recurso semelhante foi descrito por LURQUIN e col. (1975), que utilizaram também o sistema de coluna. Os autores submeteram a amostra a uma filtração em agarose com alta força iônica e obtiveram rendimento de 150 a 200 µg de DNA, a partir de 600 mg de tecido fresco. Consideraram essas adaptações favoráveis, o que tornou esse método rápido e aplicável a várias espécies vegetais.

Uma outra abordagem em plantas foi utilizada pelo grupo de LEMMERS e col. (1980) ao adaptar um procedimento de isolamento de DNA de alto peso molecular. Os autores seguiram etapas que envolviam desde o congelamento de células com nitrogênio líquido, até diálise exaustiva do DNA depois da purificação em CsCl, sem se fazer necessário o uso de colunas, visando a aplicação em experimentos de clonagem.

O isolamento de núcleos por centrifugação diferencial define uma outra estratégia utilizada descartando assim, de início, componentes indesejáveis à purificação do DNA como descrito por GEALT e col (1976).

Ao tentarem, sem sucesso, obter DNA de protoplas-

tos, os autores desenvolveram um método que consistiu em isolar núcleos do fungo filamentoso Aspergillus nidulans. Através de uma descrição pormenorizada ressaltaram o tratamento inicial das hifas com nitrogênio líquido observando que 25 a 50% da quebra do micélio ocorria devido à trituração com homogeneizador (tipo "blender"). Constataram que o congelamento favorecia esse processo ao mesmo tempo que paralisava bruscamente as reações enzimáticas. Após esta etapa, presumiram que ocorreria uma perda muito grande de DNA quando se removiam as hifas por filtração. Ao optarem por centrifugação diferencial verificaram que, através de microscopias de fluorescência e eletrônica, núcleos permaneciam intactos, a partir dos quais extraíram o DNA. Metodologia semelhante foi adotada por FELDEN e col. (1976) com objetivo de se estudar as proteínas histônicas desse fungo.

A necessidade de caracterização do genoma de indivíduos de diversas espécies que contivessem ou não segmentos de DNA clonado, tem direcionado as etapas alternativas na purificação de DNA de alto peso molecular.

DAVIS e col. (1977) obtiveram preparações de fago λ , bactérias (plasmidial e cromossomal) leveduras e células animais. Constataram que os critérios adotados forneceram moléculas de DNA suficientemente puras para análises enzimáticas e de hibridização.

HAUTALA e col. (1977) adotaram um sistema mais ri-

goroso na purificação do DNA de Neurospora crassa. Separaram núcleos de conídios germinados e obtiveram 6 mg de DNA que foram, a seguir, submetidos ao gradiente de CsCl. Nessa etapa final, conseguiram recuperar 62% do material total aplicado e concentrado numa banda correspondente a 1,72g/ml de CsCl. Verificaram que a relação de DNA e proteína ($A_{260} : A_{280}$) se aproximou de 1,9, e estimaram o PM em $1,0 - 2,0 \times 10^7$ daltons. Valores próximos a estes foram observados em Aspergillus nidulans por MORRIS (1978) que encontrou a mesma correspondência de PM com os fagos padrões: $T_7 = 2,6 \times 10^7$ e $\lambda = 3,2 \times 10^7$ daltons. O autor conseguiu DNA de alto peso molecular, através de protoplastos e ruptura de esporos com nitrogênio líquido, auxiliado por pérolas de vidro. Através de gel de agarose 0,5% (p/v), comparou e analisou o DNA obtidos pelos dois processos. Estimou em aproximadamente 250 μ g de DNA por cada grama de esporos e 450 μ g por grama de protoplastos. O autor determinou uma equivalência de 0,5 - 0,75 g de protoplastos para cada 5 g de micélio.

Visando extrair o DNA do interior de mitocôndrias, alguns autores têm utilizado quantidades maiores de micélio fresco na produção de protoplastos. Foram necessários 50 g de micélio, para que MORRIOTT e col. (1984) conseguissem uma recuperação aproximada de 60 μ g de DNA mitocondrial, a partir de protoplastos do fungo Fusarium oxysporum. Os autores trataram o micélio inicialmente com β -mercaptoetanol para em seguida montarem um sistema de digestão da parede celular. Eles combinaram a Novozym 234 à

cellulase - CP nas proporções de 0,5% (p/v) e conseguiram depois de 16 horas de incubação, os protoplastos dos quais isolaram as mitocôndrias. O DNA que extraíram dessas organelas foi caracterizado por microscopia eletrônica e análises de restrição demonstrando que essa molécula é circular e que apresenta 46,5 Kb. Verificaram que ao ser submetido ao gradiente de CsCl formava-se uma única banda correspondendo a densidade de 1,685 g/ml.

Segundo WEEKS e col. (1986) um procedimento rápido e eficiente para se obter DNA de diferentes fontes pode ser aplicado utilizando ultracentrifugação. Eles usaram células Hela, Chlamydomonas reinhardi, insetos, vegetais leveduras e bactérias no teste de tal metodologia. Os autores procederam à lise celular, acrescentando em seguida CsCl mais EtBr, eliminando algumas etapas de desproteíntização comum em outros processos. Ao evitarem o tratamento com fenol e clorofórmio conseguiram reduzir o tempo de preparação, centrifugando o material por 4 horas a 100.000 rpm. Depois de 5 horas de trabalho observaram que o DNA se encontrava livre de contaminações, resolvido em bandas nítidas.

2.3 - Aplicações mais Recentes Envolvendo Protoplastos e DNA

O desenvolvimento da Tecnologia do DNA Recombinante (TDR), particularmente em relação às técnicas habituais da Engenharia Genética foi possível graças à utilização de

bactérias como hospedeiras em trabalhos de transformação (MANDEL e HIGA, 1970). Nos últimos anos, fungos já bem estudados bioquímica e morfológicamente mostraram-se de grande utilidade. Diversos pesquisadores interessados na transformação genética de Neurospora crassa (CASE e col., 1979) e Aspergillus nidulans (YELTON e col., 1984) viram nesses microrganismos os modelos de aplicações dessas técnicas, em fungos filamentosos. Vários foram os objetivos para os quais se voltaram.

2.3.1 - Complementação com marca de seleção para auxotrofia

A transformação desses microrganismos tem sido descrita por diversos grupos que conseguiram estabelecer essa metodologia clonando genes como o $qa - 2^+$ de N. crassa que codifica para a enzima dehidroquinase, capaz de complementar duplos mutantes ($qa-2$; $aro-9$) desse fungo (CASE e col., 1979). Foi observado também que o gene $pyr - 4^+$ que codifica para a descarboxilase orotidina 5'- fosfato em N. crassa, pode transformar linhagens de A. nidulans deficientes para essa característica (BALLANCE e col., 1983).

Genes originários do A. nidulans foram também utilizados na construção de vetores para a transformação desse fungo (JOHN e PEBERDY, 1984). YELTON e col. (1984) transformaram linhagens de A. nidulans, deficientes para o triptofano, com o plasmídeo integrativo contendo o gene tpr C.

Em Escherichia coli, esses autores observaram que, o plasmídeo construído por eles apresentava-se replicativo. O mesmo foi observado por BALLANCE e col. (1983) ao utilizarem o gene arg B de A. nidulans, através da construção de um vetor com capacidade de promover transformação em fungo.

Em relação ao Aspergillus niger, esse sistema também está sendo adaptado. O gene arg B anteriormente selecionado de A. nidulans, foi utilizada por BUXTON e col. (1985) que pela primeira vez demonstraram a transformação do A. niger. Eles observaram mutantes desse fungo expressando esse gene, complementando a deficiência à ornitina transcarboxilase (OTC). Posteriormente, KELLY e HYNES (1985) observaram linhagens de A. niger expressando o gene amd S de A. nidulans através de integração genômica. A maneira como sucedeu a integração no cromossoma levaram esses autores a acreditar que o sistema de transformação em A. niger aproxima-se mais do sistema de mamíferos que do de leveduras.

2.3.2 - Isolamento de uma sequência de replicação autônoma ("ARS") através da utilização de vetores integrativos

As propriedades de um vetor podem ser alteradas, transformando-os de vetores integrativos em vetores replicativos ou autônomos pela inserção de sequências de DNA específicas. Estes fragmentos de DNA são conhecidos como se-

quências de replicação autônoma (ARS) quando o DNA inserido é de origem diferente da célula hospedeira e como "ori" quando é DNA isolado da própria espécie.

Plasmídios de replicação autônoma são comuns em bactérias com grande número de cópias por célula (DAGERT e EHRLICH, 1979) e em leveduras (GUNGE, 1983). A estratégia de se modificar um plasmídeo integrativo para replicativo tem sido utilizado em levedura (TEIXEIRA, 1985). Em fungos filamentosos, RAO e REDDY (1984) descreveram o isolamento de sequências do Phanerochaete chrysosporium capazes de promover a replicação autônoma ("ARS") em plasmídeo de Saccharomyces cerevisiae. PAIETTA e MARZLUF (1985) tentaram o mesmo utilizando conídios germinados de Neurospora crassa. O processo aplicado foi o tratamento com acetato de lítio visando isolar sequência replicativa do próprio fungo ("ori").

2.3.3 - Introdução de genes exógenos com objetivos de expressar uma característica de interesse

BUXTON e col. (1985) propuseram estudos comparativos a nível molecular entre A. nidulans e A. niger onde a regulação de genes e outros processos servissem de fontes de esclarecimentos da biologia molecular de fungos filamentosos de importância biotecnológica.

Sendo esses microrganismos capazes de altos níveis

de produção, vários autores pensaram em clonar genes que neles pudessem se expressar, na tentativa de secretar proteínas de interesse industrial. Um exemplo é o caso do gene da enzima β -glicosidase originária do A. niger, se expressando em leveduras (PENTTILA e col., 1984). Um outro caso é o do gene amd S de A. nidulans se expressando em A. niger (KELLY e HYNES, 1985).

2.3.4 - Fusão de protoplastos

Também com perspectivas de uso industrial, REYMOND e col. (1986) destacaram fusão de protoplastos. Eles comentaram que a utilização dessa técnica em linhagens de Penicillium, Aspergillus e Cephalosporium tem tido como propósito aumentar a produção de metabólitos. Alegam que, o sucesso de tal método, tem sido um incentivo na sua utilização. REYMOND e FEVRE (1986) seguiram os protocolos de ANNÉ e PEBERDY, (1976) e obtiveram 10^7 /ml protoplastos de Penicillium. Conseguiram linhagens híbridas entre P. caseicolum, P. album ou P. roqueforti através da fusão de protoplastos.

Foi observado ainda, que os produtos de fusão entre linhagens de Metarhizium anisopliae (SILVEIRA e AZEVEDO 1987) não ultrapassou a taxa de 1% , o que levaram esses autores a considerarem incompatibilidade inter e intra espécies, para justificar a taxa reduzida da fusão de protoplastos. Outros autores relacionaram-na, à fatores que en-

volvem isolamento e natureza dos protoplastos (KEVEI e PE-
BERDY, 1984).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Procedência das Linhagens

As linhagens de Aspergillus niger escolhidas para este trabalho foram obtidas de estoques do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - SP. Apenas a linhagem 10v10 provém da indústria, Fermenta - Produtos Químicos Amália S.A, onde é utilizada na produção de ácido cítrico.

As demais, nic₁olv₃ e pab₁fwn₁, foram obtidas a partir da 10v10 através de vários passos de tratamento com mutagênicos no laboratório de Genética de Microrganismos da UNICAMP (BONATELLI JR. e col., 1983).

Os fungos Humicola sp. e Picnoporus sanguineus foram cedidos pelo grupo do Prof. Carlos Roberto Felix, do laboratório de Enzimologia, do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília - DF.

3.2 - Meios de Cultura Utilizadas

3.2.1 - Meio Mínimo - MM (PONTECORVO e col., 1953)

NaNO ₃	6,00g
KH ₂ PO ₄	1,50g
KCl	0,50g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50g
FeSO ₄	0,01g
ZnSO ₄	0,01g
Glicose	10,00g
Ágar	15,00g
Água Destilada	1000ml

O pH foi acertado para 6,8 com NaOH 1N.

3.2.2 - Meio mínimo líquido

Preparação idêntica ao MM (item 3.2.1) porém sem acrescentar ágar.

3.2.3 - Meio completo - MC, (PONTECORVO e col., 1953) modificado por AZEVEDO e COSTA (1973).

Acrescentar ao MM os seguintes nutrientes:

Caseína Hidrolisada	1,50g
---------------------------	-------

Extrato de Levedura 0,50g
Peptona 2,00g
Solução de ácidos nucleícos
de levedura (item 3.3.2) 1,00ml
Solução de Vitaminas (item 3.3.3) 1,00ml
Água destilada ... até 1000ml

O pH acertado em 6,8 com NaOH 1N.

3.2.4 - Meio completo líquido

Preparação idêntica ao MC (item 3.2.3) porém não acrescentar ágar.

3.2.5 - Meio mínimo duas vezes concentrado (MM 2xC) e meio completo duas vezes concentrado (MC 2xC)

Preparado de acordo com o meio de cultura correspondente, sendo utilizado a metade do volume de água indicado para a concentração normal.

3.2.6 - Meio YGT (GAMBINO e col., 1984)

Extrato de Levedura 5g
Glicose 20g
Tween 80 0,2%
Água destilada ... até 1000ml

3.2.7 - Meio YG

Preparação idêntica ao YGT (item 3.2.6) sem acrescentar "Tween" 80.

3.2.8 - Esterilização e conservação

Os meios foram autoclavados a 120° C por 15 minutos e guardados na temperatura ambiente ou em refrigerador.

3.3 - Preparo de Soluções para Tratamento de Conídios e Protoplastos

3.3.1 - Solução de caseína hidrolisada.

Caseína hidrolisada	100,0mg
Água destilada ... até	10,0ml

A caseína hidrolisada foi adicionada a água destilada autoclavada, após o que foi aquecida a 90° C, durante 20 minutos. Conservou-se a solução em refrigerador (4° C).

3.3.2 - Solução de ácido nucleico de levedura (AZEVEDO E COSTA, 1973)

Solução a

Ácido nucleico de levedura	2,00g
Solução de NaOH 1N	15,00ml

Solução b

Ácido nucleíco de levedura 2,00g
Solução de HCl 1N 15,00ml

As soluções a e b foram misturadas e aquecidas a 90° C por 20 minutos. Após filtração o volume foi ajustado para 40ml com água destilada esterilizada e a solução mantida em frasco escuro sobre clorofórmio a 4° C.

3.3.3 - Solução de vitaminas (AZEVEDO e COSTA, 1973)

Ácido nicotínico 100,0mg
Ácido p-aminobenzóico 10,0mg
Biotina 0,2mg
Piridoxina 50,0mg
Riboflavina 100,0mg
Tiamina 50,0mg
Água Destilada Autoclavada ... até ... 100,0ml

Esta solução foi aquecida a 90° C em banho maria por 20 minutos. A solução foi mantida em frasco escuro sobre clorofórmio e estocada a 4° C.

3.3.4 - Solução salina (0,85%)

NaCl 8,50g
Água Destilada ... até 1000ml

Foi distribuída em frascos com rosca, autoclavada a 120° C por 15 minutos e conservada a temperatura ambiente.

3.3.5 - Solução tampão fosfato 0,2M

Solução A: pH= 5,0

NaH ₂ PO ₄	24,00g
Água Destilada ... até	1000ml

Solução B: pH= 9,0

Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	71,6g
Água Destilada ... até	1000ml

Para se conseguir uma solução tampão 0,2M, pH 5,8 misturou-se uma proporção de nove para um (9:1) das soluções A e B respectivamente. O ajuste de pH foi feito com as soluções A ou B.

3.3.6 - Solução tampão fosfato 0,02M

Solução A: pH= 9,0

Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	3,56g
Água Destilada ... até	1000ml

Solução B: pH= 5,0

NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	2,76g
Água Destilada	1000ml

Para se conseguir uma solução tampão 0,02M, pH 5,6 adicionou-se uma proporção de nove para um (9:1) das soluções B e A respectivamente até o pH desejado.

3.3.7 - Solução tampão fosfato para coloração de conídios e protoplastos (FURTADO, 1968).

Solução - A

$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3,73g
Água Destilada ... até 1000ml

Solução - B

KH_2PO_4 2,40g
Água Destilada ... até 1000ml

Para obter a solução tampão no pH= 7,0 misturou-se uma proporção de sete para três (7:3) das soluções A e B respectivamente.

3.3.8 - Soluções de KCl (ISAAC, 1979)

a) Solução 1,4 M

Dissolver 104,63g de KCl em aproximadamente 333,0ml de solução A (item 3.3.5). Deixou-se no agitador magnético aquecendo até dissolução total. Levou-se ao potenciômetro e foi-se adicionando solução B até pH 5,8. Completou-se até 1000ml com tampão fosfato pH 5,8.

b) Soluções diluídas de KCl

Utilizou-se a solução acima, diluída até as concentrações desejadas (1,2M; 1,0M; 0,7M; 0,6M e 0,5M) com o tampão fosfato 0,2M pH 5,8.

Estocagem a 4° C.

3.3.9 - Solução $MgSO_4$ 1,0M (ISAAC, 1979)

a) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,0M 246,47g
H₂O Bidestilada ... até 1000ml

Dissolver 246,47g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ em um pequeno volume de solução B (item 3.3.6). Usou-se a solução A (item 3.3.6) para ajustar o pH para 5,6. Completou-se o volume final com tampão fosfato pH 5,6.

b) Solução $MgSO_4$ 0,5M

Misturar partes iguais das soluções, $MgSO_4$ 1,0M e tampão fosfato pH = 5,8 (0,02M).

3.3.10 - Solução estabilizadora de sorbitol

a) Solução de Sorbitol 1,2M
. Sorbitol 21,86g
. Tris/HCl 0,01M pH 5,8 ... até 100ml

b) Solução de Sorbitol 1,0M

. Sorbitol 18,22g
. Tris/HCl 0,01M pH 5,8 ... até 100ml

3.3.11 - Solução de Albumina 5% (ROBINOW E CATEN,
1969)

Clara de ovo 5ml
Água destilada autoclavada 100ml

Após a homogeneização dos dois componentes filtrar e estocar a 4° C.

3.3.12 - Solução fixadora para conídios (FURTADO,
1968)

A solução é uma mistura de etanol absoluto, ácido láctico e ácido acético glacial nas proporções de 6:1:1 respectivamente, preparada na hora do uso.

3.3.13 - Solução fixadora para protoplastos

Metanol absoluto mantido a temperatura ambiente.

3.3.14 - Solução de HCl 1N (37%)

HCl Concentrado 85ml
Água Destilada ... até 1000ml

Mantida a temperatura ambiente.

3.3.15 - Solução Corante Giemsa (BEÇAK e PAULETE,
1976)

Giemsa em pó	3,8g
Metanol	250ml
Glicerina	250ml

As três substâncias foram homogeneizadas na ordem apresentada, permanecendo em repouso por três dias antes do uso.

3.4 - Preparo de Soluções para Tratamento do DNA

3.4.1 - Tampão de extração de DNA de protoplastos
(pH =8,0)

Tris - HCl pH 8,0	0,02M
Na ₂ EDTA	0,02M
NaCl	0,1M
Espermidina	0,005M
Sacarose	0,25M
SDS	2%

3.4.2 - Tampões para as demais extrações

. Solução-I

Triton X-100	0,5%
--------------------	------

NaCl 0,1M
Na₂ EDTA 0,01M

Estocagem a 4' C.

. Solução-II

SDS 0,5%
NaCl 0,1M
Na₂ EDTA 0,01M

Estocagem a temperatura ambiente ou 4^o C.

3.4.3 - Solução de espermidina I (pH = 8,0) (MOR-
RIS, 1978, Modificado)

Tris-HCl pH 8,0 0,01M
Na₂ EDTA 0,10M
Sacarose 0,5M
Espermidina 0,005M

3.4.4 - Solução tampão TR (MANIATIS e col ., 1982)

Tris-HCl 0,020M
Na₂ EDTA 0,001M

Ajustou-se o pH para 7,5.

3.4.5 - Solução tampão TE (MANIATIS e col ., 1982)

Tris-HCl 0,025M
NA₂ EDTA 0,01M

Ajustou-se o pH para 8,0.

3.4.6 - Solução espermidina II - 10 x (TP) (solução
10 vezes concentrada).

Espermidina 0,04M
Na₂ EDTA 0,10M
Tris-HCl pH 8,5 0,10M
KCl 0,36M

O pH foi ajustado para 9,5.

3.4.7 - Solução espermidina II' (TP')

Solução TP 10x (item 3.4.6) 20,0ml
Sacarose(0,5M) 50,0ml
β-Mercaptoetanol(0,014M) 0,2ml
Triton X-100 (v/v) ..(0,5%) 1,0ml
Água bidestilada128,8ml

Estocagem a 4^o C até o momento do uso.

3.4.8 - Solução - TL

Tris-HCl pH 8,0	0,04M
NaCl	0,20M
Sarcosil ou SDS ... (p/v)	1,5%
Na ₂ EDTA	0,01M

Estocagem a 4° C. Elevou-se a temperatura na hora do uso, até a solução adquirir o aspecto hialino.

3.4.9 - Solução clorofane (MANIATIS e col ., 1982)

Misturou-se volumes iguais de fenol bidestilado e clorofórmio e acrescentou-se 0,05% de 8-hidroxiquinolina. Foi equilibrado a seguir com uma solução de:

Tris-HCl pH 8,0.....	0,020M
NaCl	0,100M
Na ₂ EDTA	0,001M

Estocagem a 4° C e utilizar apenas a fase fenólica (inferior).

3.4.10 - Solução de ribonuclease (RNase-A)

Em 1ml da NaAc 0.05M, pH = 4,8, foram dissolvidos 10mg de Rnase-A. Esta solução foi fervida em banho maria por 10 minutos, deixada por 20 minutos à temperatura am-

biente e em seguida foi estocada a 4° C.

3.4.11 - Solução tampão borato 10 x (10 vezes concentrada) (TEB 10x) para eletroforese (MINIATIS e col ., 1982)

Trizma base	108,0g
Ácido bórico	55,0g
Na EDTA	9,3g
Água destilada ... até	1000ml

Ajustou-se o pH para 8,3 e foi estocada a 4° C.

3.4.12 - Solução tampão para amostra de eletroforese (TA) 3x (3 vezes concentrada)

TEB 3x

Ficol (p/v)	15,0%
Azul de bromofenol (p/v)	0,1%

Solução estocada a 4° C.

3.4.13 - Solução de brometo de etídio (EtBr) a 1% (p/v) (MINIATIS e col ., 1982)

EtBr	0,10g
Solução Tampão (1x (item 3.4.11)	10,0ml

Colocou-se em frasco escuro e foi mantida a temperatura ambiente.

3.4.14 - Solução de difenilamina-DFA (GILES e MYERS, 1965)

a) Solução Reagente (SR)

- . Difenilamina 4g
- . Ácido acético glacial 100ml

b) Solução de Acetaldeído

- . Acetaldeído 0,016g
- . Solução SR 10ml

Foram preparadas na hora do uso e manuseadas em banho de gelo na capela de exaustão de gases.

c) Solução de Ácido Perclórico 10% (v/v)

- . Ácido perclórico 70% 7,15 ml
- . Água destilada até 50,00 ml

3.4.15 - Solução de Cloreto de Césio (CsCl) (MANIATIS e col., 1982)

Foram usadas quatro molaridades diferentes (6,0M; 5,0M; 4,0M e 3,5M) do sal CsCl. Pesou 1,50g; 1,26g; 1,01g, e 0,80 g, correspondente as molaridades acima para volumes definidos de 5ml. A estas soluções foram acrescentadas 15 μ l de EtBr e a seguir preparados colchões com as quatro concentrações conhecidas, em ordem decrescente de massa. Por último adicionou-se à superfície, uma amostra de 100 μ l de DNA total do Aspergillus niger em solução TR (=25 μ g de DNA).

3.4.16 - Solução tampão para enzima de restrição
(MANIATIS e col ., 1982)

Eco RI - Hind III e Pst I (alto sal)

NaCl 0,10M
MgCl₂ 0,01M
Tris-HCl ..pH 7,5 0,01M

Água bidestilada para completar o volume final.

3.4.17 - Solução tampão para o sistema de ligação
(MANIATIS e col ., 1982)

NaCl 0,100M
Tris HCl ..pH 7,4 0,010M
MgSO₄ 0,012M

3.5 - Preparo de Gel de Agarose 1% para Eletroforese
(MANIATIS e col ., 1982)

Agarose 0,5g
TEB (10x) 5ml
H₂O 45ml

A preparação do gel requer a mistura dos três componentes e aquecimento até a completa dissolução da agarose. Foi resfriado a aproximadamente 60° C e despejado sobre

placas de vidro em posição horizontal, tendo em uma de suas extremidades, um "pente" cujos dentes não tocam o fundo da placa. Foi obtido assim um gel com fendas ou "slots" onde foram depositadas as amostras e com espessura de 0,5 cm aproximadamente.

3.6 - Manutenção de Culturas

As linhagens mutantes e prototrófica foram repicadas em tubos de ensaio inclinado com meio de cultura, de seis em seis dias quando houve necessidade do uso imediato. Quanto não, depois deste tempo de incubação a 28° C, foram estocadas a 4° C em câmara fria.

3.7 - Obtenção de Protoplastos

3.7.1 - Método descrito por HAMLIN e col . (1981)

Semeou-se conídios, em tubos com MC inclinados e incubou-se à 28° C por 6 dias para obtenção de conídios. Depois desse período, os conídios foram resuspensos em salina 0,85% (p/v) e inoculados 10⁶ conídios /ml em frasco Erlenmeyer de 200-250ml, contendo 50ml de MC líquido (item 3.2.4). Após agitação de 150 rpm à 30° C por 18 horas, o micélio em estágio de crescimento exponencial foi colhido e lavado com uma solução inorgânica osmoticamente concentrada (KCl 1,2M - item 3.3.8-b ou MgSO₄ 1,0M - item 3.3.9-a).

Esse procedimento foi facilitado pelo uso de bomba

à vácuo acoplada ao funil de Büchner, contendo papel de filtro Wathman nº 1 ou 3 previamente esterilizados. O peso úmido do micélio foi determinado e montado o sistema lítico, em Erlenmeyer de 25 ml, como se segue:

- . Solução osmótica: 5ml
- . Novozym 234: 4mg/ml(Produtos da Indústria "Novo Industri")
- . Celulase CP: 4mg/ml(produto da JOHN e STURGE)
- . Micélio úmido: 120mg

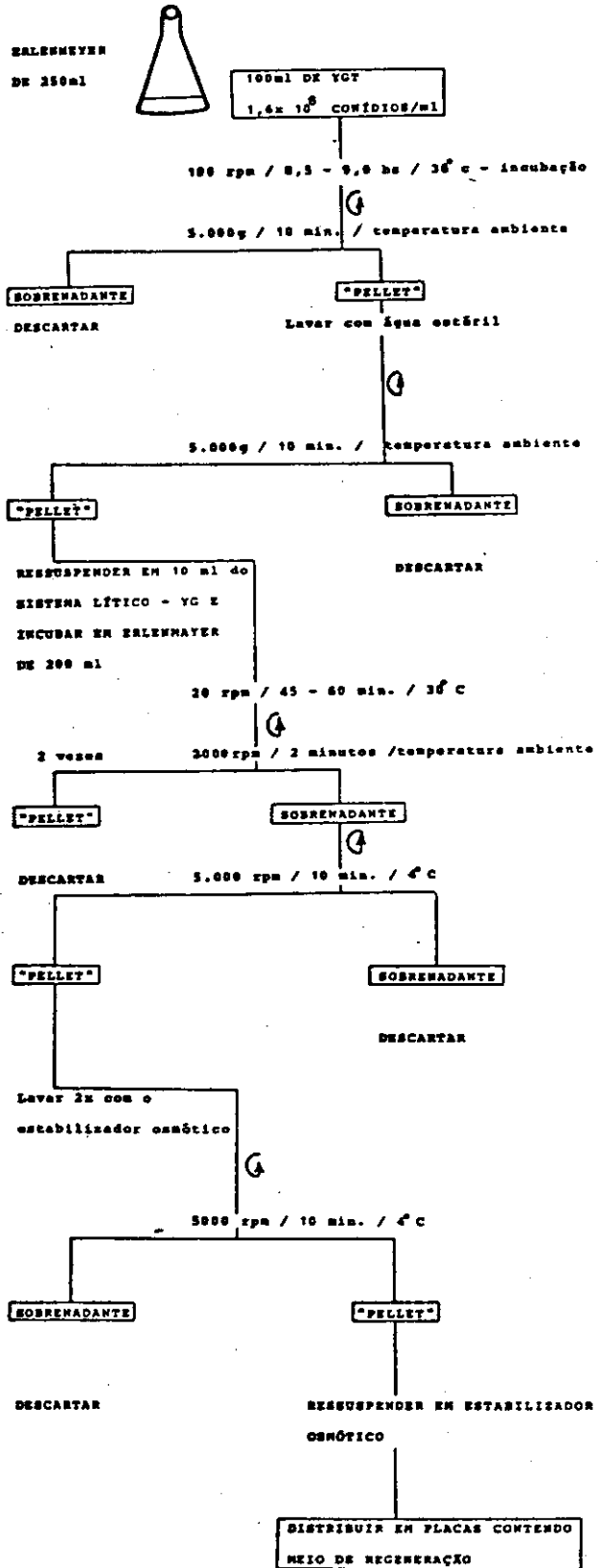
As soluções osmóticas usadas foram: KCl 0,5M; 0,6M; 0,7M; MgSO₄ 0,5M e Sorbitol 1,0M; 1,1M, 1,2M, 1,4M. Incubou-se durante 3 horas em agitador recíproco - 140 movimentos por minuto à temperatura de 28° C. Ao longo desse tempo, aliquotas foram retiradas para o acompanhamento, em microscópio óptico, das condições dos protoplastos liberados. Depois de 3 horas os mesmos foram coletados por centrifugação a 500g durante 30 segundos. O sobrenadante foi recolhido e o sedimento descartado. O sobrenadante foi centrifugado a 2.000g por 10 minutos e, o sedimento lavado duas vezes com o estabilizador em uso. A seguir os protoplastos foram res-suspendidos em solução estabilizadora e feito a contagem em câmara com retículo Neubauer (hematímetro). Os protoplastos foram plaqueados em meio de regeneração (MC + KCl 0,06M, MC + MgSO₄ 0,5M, MC + Sorbitol 1,2M) e mantidos a 28° C por 72 horas. Após esse período de incubação foi estimada a viabilidade expressa através da taxa de regeneração dos protoplastos.

3.7.2 - Método descrito por GAMBINO e col . (1984)
modificado

Este procedimento foi semelhante ao item 3.7 .1 porém, com algumas modificações referentes à substituição do MC líquido (item 3.2.4) pelo meio YGT (item 3.2.6) quando do inóculo dos conídios. O tempo de incubação foi reduzido de 18 para 9 horas. Após esse período, com agitação a 100 rpm, a 30° C, os conídios com tubos germinativos foram lavados com água estéril e colhidos para compor o seguinte sistema lítico com YG:

- . Solução osmótica 2ml
- . YG 2ml
- . Celulase CP 4mg/ml
- . Novozym 234 4mg/ml
- . Tubos germinativos 120mg

As concentrações das soluções osmóticas utilizadas (MgSO₄ 1,0M e Sobitol 2,4M acrescida de MgSO₄ 50mM) ficaram reduzidas à metade após montagem do sistema lítico. Essa etapa constitui uma modificação do método usado por GAMBINO (1984). A incubação transcorreu em 45 - 60 minutos a 30° C e 20 rpm. Após esse tempo, os protoplastos foram coletados e lavados em suas respectivas soluções estabilizadoras (MgSO₄ 0,5M ou Sorbitol 1,2M) contados em hematímetro e plaqueados em meio de regeneração.



Representação esquemática do procedimento de obtenção dos protoplastos do A. niger

3.7.3 - Técnica de coloração de protoplastos
(modificado pela autora)

Os protoplastos obtidos de acordo com o item 3.7.2 foram reduzidos a um volume de 0,5ml em solução estabilizadora. Após a concentração do material, 1 a 2 gotas dessa suspensão foram espalhadas em uma lâmina limpa, deixando-se secar à temperatura ambiente de maneira que o material ficasse aderido. Em seguida procedeu-se à FIXAÇÃO em metanol absoluto por 5 minutos. Após esse tempo retirou-se a lâmina da solução fixadora deixando-a escorrer em posição vertical. Não necessitando secar totalmente, mergulhou-se a lâmina em uma solução de HCl 1N e a HIDRÓLISE ocorreu a 56° C por 2 minutos. Depois lavou-se em água corrente e em seguida em água destilada. A COLORAÇÃO ocorreu fazendo-se um filme de tampão fosfato sobre a lâmina e gotejando-se o corante Giemsa, homogeneizando-se bem. Após 1 - 1,5 minutos retirou-se o corante com água de torneira. Depois de bem seca, uma MONTAGEM com bálsamo do Canadá foi feita sobrepondo-a em lamínula. Foram feitas observações em microscópio óptico com objetivas de 40x e 100x. Vários campos foram fotografados com 100x usando-se filme Kodak Panatomic-X.

3.7.4 - Técnica para observação nuclear em conídios
e micélio (LUNA 1985, Tese de Doutorado)

Esta técnica consistiu primeiramente no espalhamen-

to de algumas gotas de solução de albumina 5% em lâminas estéreis. Estas, depois de quase secas foram colocadas sobre uma placa com fungo fazendo-se uma leve pressão para melhor aderência dos esporos. Essa lâmina foi então imersa em solução FIXADORA (item 3.3.12) por 30 minutos. Após esse tempo procedeu-se a HIDRATAÇÃO a temperatura ambiente permanecendo 8 minutos em álcool 95%, 8 em 70% e 10 em 50%, para em seguida se submetida a hidrólise à quente. Usou-se uma solução de HCl 1N em um Becker, dentro de um banho maria previamente regulado para 63-66° C. Após 5 minutos as lâminas foram lavadas 3 vezes em água destilada durante 10 minutos e imersas em tampão fosfato (item 3.3.7) por 30 minutos. COROU-SE com Giemsa durante 20 minutos, lavando-se rapidamente com tampão fosfato para execução da MONTAGEM e observação em microscópio óptico.

3.8 - Extração de DNA Total do Fungo Filamentoso

Aspergillus niger

3.8.1 - Extração de DNA de protoplastos

Este método consistiu inicialmente da obtenção de protoplastos (item 3.7.1) na presença de estabilizadores osmóticos. A seguir, estes foram sedimentados e ressuspensos em 1 ml de tampão de extração (item 3.4.1). Essa suspensão foi mantida a 4° C e três extrações sucessivas de 1 volume de clofofane (item 3.4.9) foram realizadas centrifugando-se o material a 2.000g por 5 minutos a 4° C. A primei-

ra extração permaneceu 10 minutos em agitação branda. A fase fenólica foi descartada e recuperou-se a fase aquosa e assim sucessivamente. Ao final da terceira extração foi acertada o sal para uma concentração de 0,3M de NaCl e a fase aquosa foi precipitada com 2,5 volumes de etanol absoluto, gelado. O material foi mantido a -20°C por ± 12 horas. O precipitado que foi coletado por centrifugação a 12000g por 20 minutos a 4°C . O sobrenadante descartado e o material lavado 2 vezes com etanol gelado 70% (v/v) e seco à vacuo. O sedimento foi ressuspendido em 150 - 200 μl de tampão - TR (item 3.4.4). A estimativa da concentração de DNA foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1% (e o restante estocado a -20°C) por comparação com DNA de fago λ digerido com Eco RI/Hind III em concentração conhecida.

3.8.2 - Extração de DNA de micélio

a) Utilizando esferas de vidro

O DNA foi extraído do micélio em fase exponencial de crescimento (19 hs de cultivo) obtido a partir de 300 ml de cultura em MC a 30°C , 150 rpm. Após lavagem com uma solução de KCl 1,2M, utilizando-se uma bomba a vácuo, obteve-se o micélio. Foi avaliado o seu peso úmido, para uma estimativa do rendimento final do DNA obtido.

Baseando-se no método de extração de DNA de confídios (MORRIS, 1978) a solução de espermidina - I (item

3.4.3) foi acrescentada a 8,0g de micélio juntamente com esferas de vidro siliconizadas, na proporção de 2g de micélio para 3g de esferas. O material foi mantido em banho de gelo e submetido ao homogeneizador elétrico - "Potter", com 6 pulsos de 20 segundos dados com intervalos de 30 segundos. Esse procedimento visava romper um máximo de células sendo o material submetido a seguir a centrifugação de 2.000g por 3-5 minutos, o sedimento descartado e o sobrenadante recuperado. A extração prosseguiu a temperatura ambiente, acrescentando-se ao sobrenadante 2% de SDS e 1 volume de clorofane (item 3.4.9). Essa etapa foi repetida 3 vezes intercaladas por centrifugações de 3.000g por 10 minutos, 4° C. O terceiro sobrenadante (8ml) foi tratado com 10 µl de RNase-A (item 3.4.10) por 1ml de solução. Mais duas extrações com clorofane foram feitas antes que a concentração de NaCl fosse ajustada para 0,3M e o material precipitado com 2,5 volume de etanol absoluto, gelado. Após ficar precipitando durante a noite, o material foi submetido a 12.000g por 20 minutos, o precipitado secado a vácuo, e ressuspendido em 5ml de tampão-TR (item 3.4.4). Após um período de aproximadamente 12 horas de diálise, contra o tampão de ressuspensão diluído 10 vezes, o DNA foi transferido para tubos do tipo Corex. Novamente foi acertado o sal para 0,3M e precipitado por 12 horas com etanol absoluto a - 20° C seguindo-se centrifugação e secagem à vácuo. A ressuspensão foi no volume de 100 µl de tampão - TR e amostras de 20 µl foram aplicadas em gel de agarose 1% (p/v) para análise da mobilidade eletroforética.

b. Utilizando nitrogênio líquido e "Potter"

Esse método é semelhante ao anterior (a), apresentando algumas modificações. Inicialmente as esferas de vidro foram substituídas pelo nitrogênio líquido no processo de ruptura do micélio. Este por sua vez foi subdividido em porções para facilitar o manuseio e quando se aplicava o "Potter" na trituração acrescentava-se nitrogênio líquido sempre que necessário. Posteriormente juntou-se as porções separando-se os fragmentos de micélio por centrifugação (2000g, 10 minutos, 4° C). O sobrenadante foi recuperado e a massa triturada foi filtrada em gaze, lavada com um pouco do sobrenadante. Uma alíquota (I) de 100µl foi retirada e estocada a - 20° C para futuras comparações com outras etapas. A massa foi descartada. Os 50ml do sobrenadante ficaram sob ação do agitador magnético com um volume igual de clorofane por 20 minutos. Após a centrifugação uma segunda alíquota (II) de 500 µl foi estocada. A segunda extração com clorofane foi mantida por + 1 hora em agitação, o terceiro clorofane transcorreu rapidamente e uma terceira alíquota (III) foi estocada. Ao ajustar o NaCl para 0,3M também foi acrescentado 2ml de Tris/HCl 1M e 2,5V de etanol gelado. Após incubação de + 18 horas a -20° C fêz-se a centrifugação e secagem a vácuo do precipitado. O material foi ressuscitado em 3ml de tampão - TR do qual retirou-se 100 µl (IV alíquota). Foi realizada uma diálise contra o tampão (TR) diluído, após o que a V alíquota de 100 µl foi separada. O sal foi ajustado para 0,3M e o etanol gelado foi adi-

cionado. Depois de 3 horas a -70°C , centrifugou-se, secou-se à vácuo, ressuspendeu-se em 1ml de tampão - TR e retirou-se 10 μl (VI alíquota). Do restante, uma parte foi tratada com RNase - A por 30 minutos, a 37°C em banho-maria, seguida de duas extrações com clorofane. Este mesmo material foi testado para ação de enzima de restrição Pst I sobre o DNA obtido por esse método. Seguiu-se o procedimento normal de ajuste de sal, precipitação com etanol, secagem e dissolução em TR. A VII alíquota foi retirada do estoque de 250 μl do material não tratado com RNase - A e a VIII do estoque de 230 μl tratado com RNase - A. O DNA das alíquotas foi dosado pelo método da difenilamina (DFA) descrito mais adiante e as duas últimas (VII e VIII) foram analisadas em gel de agarose 0,8% (p/v).

c) Utilizando nitrogênio líquido

Este procedimento utilizado para extração de DNA de Aspergillus niger, foi adaptado a partir do método aplicado em plantas (LEMMERS e col ., 1980) usado pelo grupo de pesquisa do CENARGEN - EMBRAPA (Brasília - DF.). Esse protocolo nos foi cedido e várias alterações foram realizadas a cada repetição do experimento no laboratório de Biologia Molecular - UnB (Brasília - DF).

Inicialmente 1-7 gramas do micélio foram pesadas e transferidas para um almofariz. Aos poucos foi sendo acrescentado nitrogênio líquido, e as células foram trituradas.

O extrato foi ressuspenso em tampão - TP' (item 3.4.7). Essa mistura permaneceu a 4° C sob agitação magnética durante 1 hora, sendo a seguir filtrada em gaze e a massa de micélio retida descartada. O filtrado de núcleos foi recuperado, medido o volume e transferido para tubos do tipo Co-rex. Por três vezes foi centrifugado a 2.500 g, a 4° C, 10 minutos, usando-se o mesmo tampão - TP', para tratamento dos núcleos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento recuperado. O último precipitado foi ressuspenso em tampão de lise, solução TL (item 3.4.8) e transferido para "Dounce", visando a ruptura dos núcleos. Extraiu-se por três vezes com clorofane, fêz-se digestão com RNase - A por 30 minutos a temperatura ambiente e o NaCl foi ajustado para 0,3M antes que se adicionasse 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. A precipitação ocorreu por 18 horas. Coletou-se o precipitado a 12.000g, 4° C, 20 minutos que foi lavado, sem ressusensão com álcool 70%, gelado. O material foi secado a vácuo e dissolvido em 300 µl de tampão - TR (item 3.4.4). Analisou-se posteriormente o DNA, através de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) e o restante foi estocado a -20° C.

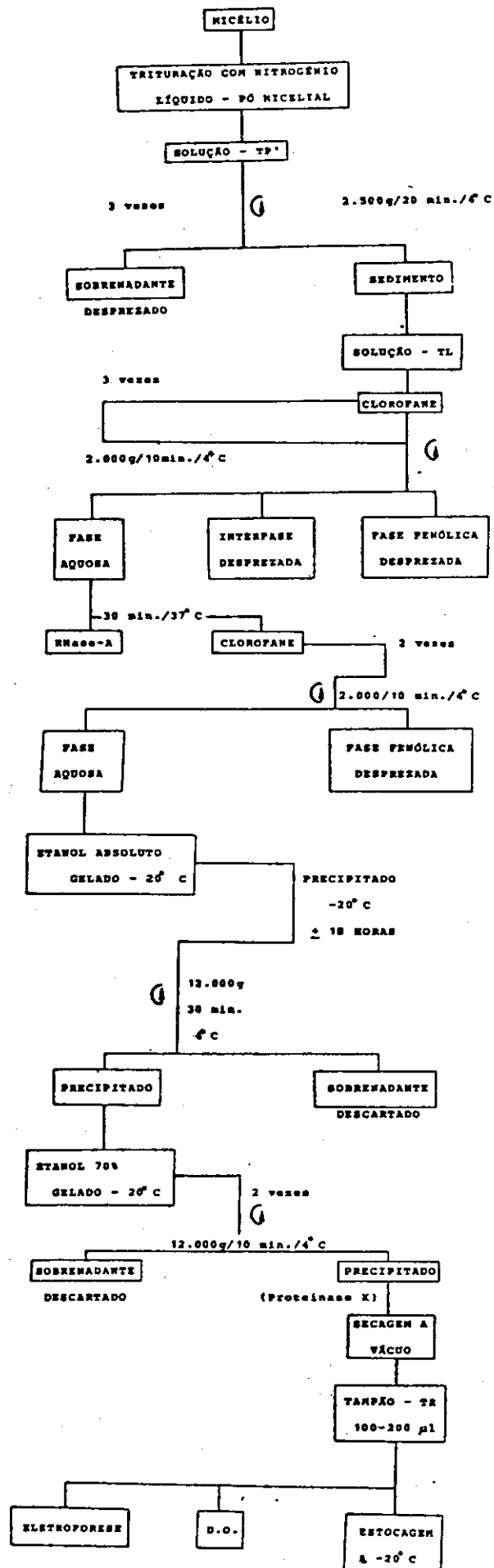
d) Modificações introduzidas no método anterior (c)

Estabelecida a etapa inicial de maceração com nitrogênio líquido, uma outra alteração foi a de se aproveitar o micélio que era descartado após filtração, na etapa de mudança da solução - TP' para a solução - TL. Simulta-

neamente o tratamento dado ao sobrenadante foi aplicado ao micélio nessa etapa visando-se aumentar o rendimento de DNA por preparação.

Em procedimentos posteriores suprimiu-se três etapas: após a quebra celular adicionou-se solução - TP', e misturando-se bem com um bastão centrífugou-se de imediato, eliminando-se o tempo de 1 hora e 45 minutos que se deixava entre uma lavada e outra, agitando-se com a barra magnética. A outra etapa suprimida se refere ao manuseio do "Dounce", após a adição da solução - TL. A última modificação introduzida consistiu em ressuspender o material em solução - TL e dar início imediatamente a extração com clorofane de todo o material.

Por fim nas últimas extrações realizadas, foram incluídas todas as modificações citadas acima, ficando estabelecido até o momento o seguinte protocolo de extração de DNA, do fungo filamentoso Aspergillus niger.



Representação esquemática da extração de DNA do fungo filamentoso *Aspergillus niger*.

3.9 - Critérios de Análise do DNA do Aspergillus niger

3.9.1 - Dosagem do DNA pelo método da difenilamina (DFA)

O DNA do Aspergillus niger obtido pelo método modificado (item 3.8.2-b) foi dosado usando-se difenilamina. Esse procedimento foi descrito por GILES e MYERS (1965) aplicando-se para o branco o seguinte esquema:

Tampão - TR	x μ l
Ácido Perclórico 10%	2,0 ml x μ l
Solução Reagente (item 3.4.14-a)	2,0 ml
Solução de Acetaldeído (item 3.4.14-b)	0,1ml

Este foi considerado o branco. As amostras dosadas propriamente ditas (item .3.8.2.-b) seguiram a proporção:

DNA a ser dosado	x μ l
Ácido perclórico 10%	2,0 ml x μ l
Solução reagente (item 3.4.14-a)	2ml
Solução de acetaldeído (item 3.4.14-b)	0,1 ml

O mesmo procedimento foi adotado na elaboração da curva de calibração (TABELA II) em que se utilizou como DNA padrão, o DNA extraído do próprio Aspergillus niger, de acordo com a representação esquemática apresentada anteriormente - pag. 52.

Depois de preparadas em tubos de ensaio, foram incubadas a 30° C em banho-maria por 20 horas. A leitura foi feita em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 595 nm e 700nm.

3.9.2 - Dosagem do DNA segundo Warburg

As dosagens por absorbância foram realizadas usando-se material obtido através do método modificado (item 3.8.2, c e d). Consistiu na retirada de 5-10 µl da preparação final de DNA, para diluição em 5 ml de água bidestilada estéril. As leituras foram feitas nos seguintes comprimento de ondas, $A = 260\text{nm}$ e $A = 280 \text{ nm}$. Para se obter a quantidade relativa de DNA utilizou-se a tabela de Warburg que define uma correlação entre absorbâncias e concentração de ácidos nucleicos e proteínas. Esses valores foram corrigidos para a diluição efetuada e o volume total estocado. O grau de pureza do DNA obtido foi averiguado através da proporção, $A_{260} : A_{280}$, onde os valores de 1,8 - 2,0 são indicativos da pureza máxima dessa molécula.

3.9.3 - Medidas do DNA/CsCl em refratômetro

A preparação do gradiente de CsCl foi realizada de acordo com o item 3.14.15 . Após ultracentrifugação (37.000 rpm, 18-25° C, 24 horas) foi feita a medida do índice de refração, (n), do DNA. Esse valor n é fornecido por uma escala no interior do refratômetro que permite o cálculo da

densidade, (ρ), dessa molécula. Esse cálculo foi feito através da fórmula

$$\rho_{25} = a n_{25} - b$$

onde a e b correspondem a valores constantes de 10,8601 e 13,4974 respectivamente para o gradiente desse sal. Dentro da temperatura de 25° C, a densidade atinge uma faixa de 1,2 a 1,9g/ml (NAGL, 1976).

3.9.4 - Sistema de eletroforese

Esse sistema requer a preparação de gel de agarose 1%, de acordo com o item 3.5. Depois de pronto, as amostras (10 ou 20 μ l) de DNA foram aplicadas em pequenas fendas ("slots") feitas no gel. As mobilidades eletroforéticas foram realizadas em cubas contendo os géis totalmente encobertos pelo tampão TEB 1x (item 3.4.11). Aproximadamente nos primeiros 15 minutos, as amostras migraram em torno de 1cm com a amperagem variando de 10-20 mA, sendo posteriormente elevada para 40-50 mA. Finalizada a eletroforese, os géis continuaram a temperatura ambiente para serem corados com uma solução de brometo de etídio (item 3.4.13), durante 10-15 minutos e descorados com o mesmo tampão por 30 minutos podendo permanecer até 24 horas em geladeira, imersos em tampão. A análise dos géis, deu-se sob luz ultravioleta, utilizando-se o transluminador GT-300-8 da Germetec Ltda. e foram tiradas fotos com filmes Kodak Panatomic-X sob proteção de filtros laranja.

3.9.5 - Sistema de digestão com enzima de restrição
Eco RI e ligação com a T4 DNA-ligase.

Esse sistema foi montado utilizando DNA de Aspergillus niger purificado em gradiente de CsCl. Todos os componentes foram colocados em tubos de "Eppendorf" guarda a seguinte ordem:

H ₂ O	6 µl
Tampão de enzima de restrição - 5 x (item 3.4.16)	14 µl
DNA (10 µg)	40 µl
<u>Eco</u> RI 17 Unidades	10 µl
Volume total	70 µl

A incubação ocorreu por 2,5 - 3,0 horas em estufa a 37° C. Após esse período, 2 alíquotas de 10 µl (1,10 µg de DNA/10 µl) foram separadas e mantidas a -20° C.

Os 50 µl restantes (7,14 µg de DNA) foram tratados com clorofane para inativar a enzima Eco RI seguindo-se a precipitação com etanol gelado (12 horas a -20° C). Após centrifugação (12.000g, 20 minutos a 4° C) o DNA digerido foi ressuspendido em 30 µl de tampão TR e usado para montar o seguinte sistema de ligação de DNA:

H ₂ O	5 µl
DNA	30 µl
Tris-MgSO ₄	5 µl

ATP	5 μ l
DTT	5 μ l
Enzima T ₄ DNA-ligase 100 Unidades	2 μ l
Volume total	50 μ l

A incubação deu-se iniciamete a 37° C por 1 hora e proseguiu a 16° C por 12 horas . Após este tempo retirou-se uma alíquota de 10 μ l (1,4 μ g de DNA) que foi guardada a -20° C enquanto o restante continuou por mais 12 horas. De pois de 24 horas, a ligação foi terminada e todas as alíquotas coletadas foram aplicadas no gel de agarose 0,7% (p/v).

Os controles usados foram 1 μ g de DNA do fago λ intacto e 1 μ g de DNA de Aspergillus niger intacto, correspondendo a 1a. e 2a. posições no gel. A 3a. posição ocupada por 1,1 μ g de DNA de A. niger digerido com Eco RI e na 4a. e 5a. posições por 1,4 μ g de DNA ligado por 12 e 24 horas respectivamente, com a enzima T₄ DNA-ligase.

4. RESULTADOS

4.1 - Protoplastos de Aspergillus niger

4.1.1 - Aspecto do micélio antes e após digestão da parede celular

As FIGURAS 1 e 2 apresentam diferenças na integridade do micélio. Foi verificada a presença de hifas multinucleadas de aspecto morfológico normal (FIGURA 1). A FIGURA 2 apresenta hifas deformadas pela digestão com enzimas líticas ocasionando a liberação dos protoplastos.

4.1.2 - Influência dos métodos e estabilizadores osmóticos no número de protoplastos

Os métodos empregados e os estabilizadores KCl, MgSO₄ e Sorbitol afetaram diferentemente a liberação dos protoplastos de Aspergillus niger, conforme se observa na TABELA I.

O número de protoplastos obtido nas preparações com KCl variou conforme a concentração do estabilizador osmótico. Na concentração de 0,6M, foi observado maior número ($8,1 \times 10^6$ /ml). Nota-se ainda que este foi também o maior número de protoplastos obtido, quando foi empregado o método de HAMLIN e cols. (1981). Observa-se também a similaridade da porcentagem de regeneração em todos os casos em que foi estudada, exceto, com $MgSO_4$, onde foi verificada inibição total da regeneração. A utilização de sorbitol 1,2M praticamente não originou protoplastos.

Usando-se o método de GAMBINO e cols. (1984) o número de protoplastos foi $6,1 \times 10^7$ /ml ou $2,1 \times 10^8$ /ml. No primeiro caso, o estabilizador utilizado foi o sorbitol 1,2M acrescido de $MgSO_4$ 50 mM, e houve regeneração tanto com $MgSO_4$ 0,5 (10%) como com sorbitol (19,6%). No segundo caso, com $MgSO_4$ 0,5 M, a regeneração ocorreu apenas quando o estabilizador osmótico foi o sorbitol.

4.1.3 - Algumas considerações sobre confídios e protoplastos.

A estimativa do número de protoplastos liberados foi feita através de observações realizadas em microscopia óptica com objetiva de 40 x. (FIGURA 2). Estes apresentam formato globoso e tamanho variado.

Os protoplastos obtidos utilizando o KCl como estabilizador osmótico, raramente apresentavam vacúolos. Os de

TABELA I - Otimização das condições de obtenção e regeneração de protoplastos de A. niger

MÉTODOS UTILIZADOS	MEIO DE CULTURA DO MICÉLIO	SISTEMA LÍTICO DE INCUBAÇÃO	CONCENTRAÇÃO DOS ESTABILIZADORES	Nº DE PROTOPLASTOS OBTIDOS x 10 ⁶ /ml	MEIOS DE REGENERAÇÃO	% DE REGENERAÇÃO
<u>HAMLIN e cols.</u> (1981)	MC líquido	item 3.7.1	KCl 0,5M	3,2	MC + KCl 0,5M	10
			KCl 0,6M	8,1	MC + KCl 0,6M	10
			KCl 0,7M	5,5	MC + KCl 0,7M	10
			Sorbitol 1,2M	< 0 01	MC + Sorbitol 1,2M	-
<u>GAMBINO e cols.</u> (1984) YGT	item 3.7.2	MgSO ₄ 0,5M	4,8	MC + MgSO ₄ 0,5M	0	
		MgSO ₄ 0,5M	210	MC + MgSO ₄ 0,5M	0	
		MgSO ₄ 50mm + Sorbitol 1,2M	61	MC + MgSO ₄ 0,5M	10	
					MC + Sorbitol 1,2M	19,6

- Regeneração não realizada.

tamanho menor eram similares a um conídio dificultando a quantificação, e os maiores, alcançavam no mínimo, o dobro do tamanho. A substituição do KCl utilizado no método de HAMLYN e col. (1981) - item 3.7.1 - pelo MgSO₄ empregado no método de GAMBINO e col. (1984) favoreceu o surgimento de vacúolos, qualquer que fosse o tamanho dos protoplastos (FIGURA 2). Essa característica e a baixa refrigência do envoltório celular permitiu uma contagem confiável na maioria dos casos.

4.1.4 - Estudo citológico dos conídios, hifas e protoplastos

Usando a técnica descrita no item 3.7.4 foi observado a presença de conídios globosos, vacuolados. Após 48 horas de incubação em meio sólido, verificou-se a germinação por emissão de um tubo germinativo (FIGURA 1a). Nos primeiros estágios de germinação, mitoses sucessivas deram origem a condição multinucleada do tubo germinativo (FIGURA 1b) que se diferenciou em hifas de segmentos multinucleados (FIGURA 1c). A proliferação intensa das hifas resultou em micélio exuberante multinucleado (FIGURA 1d).

A formação de protoplastos foi observada a partir de hifas, após 45 minutos de digestão da parede celular. A FIGURA 2a mostra hifas injuriadas apresentando liberação de protoplastos. Estes foram observados em alta frequência, em diversos tamanhos e apresentando variação de vacúolos tanto

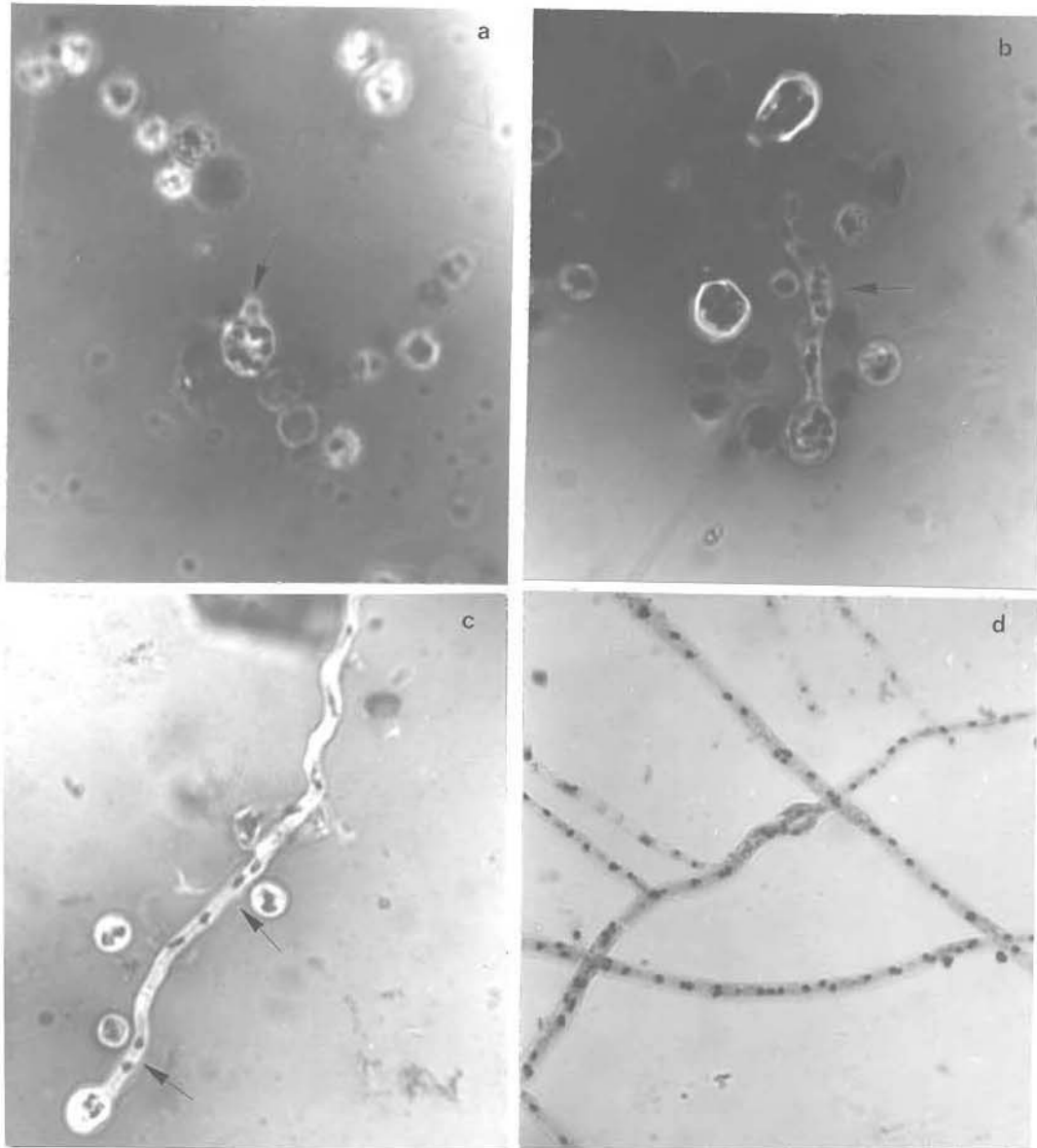


FIGURA 1 - a) Conídios globosos multinucleados, com tubo germinativo (seta). 840X.
b) Conídios multinucleados, apresentando diferenciação hifal de segmento multinucleado (seta). 840X.
c) Germinação de conídios em estágio avançado de diferenciação hifal. Segmentos bi e multinucleados.
d) Hifas de parede delgada, de segmentos multinucleados. 640X.

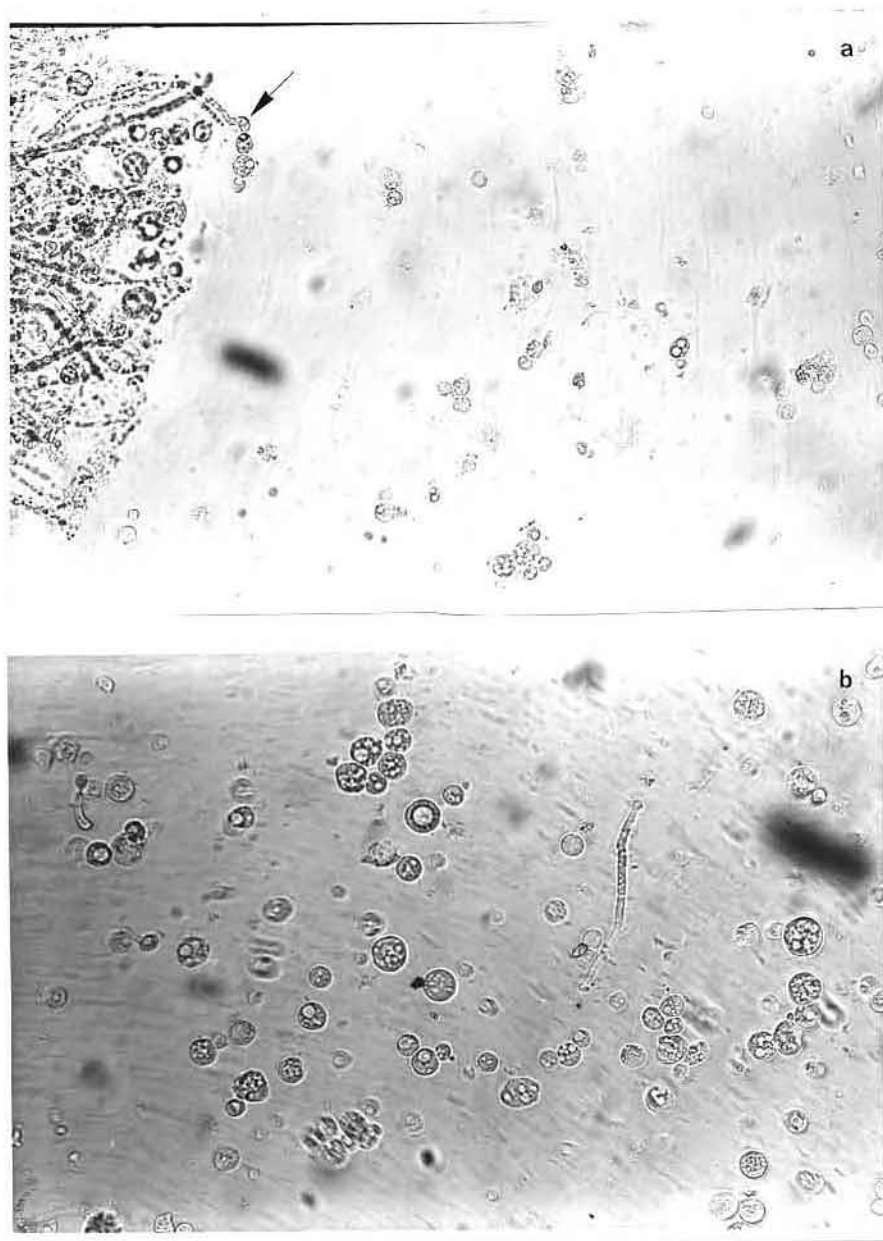


FIGURA 2 - a) Produção de protoplastos. Micélio em fase de digestão apresentando liberação de protoplastos evidenciando vacúolos (Seta).
b) Alta frequência de protoplastos (21×10^8 /ml). Sem coloração. 240X.

em número quanto em tamanho (FIGURA 4).

A técnica descrita no item 3.7.3 permitiu a visualização da condição nuclear dos protoplastos. Hifas multinucleadas (FIGURA 3a) após 45 minutos de digestão formam protoplastos multinucleados (FIGURA 3b) com grande vacúolo (FIGURA 4).

4.2 - Características do DNA obtido de protoplastos de A. niger

O perfil eletroforético do DNA extraído de protoplastos (item 3.8.1) é mostrado na FIGURA 5. Tem-se como marcador - "Slot" 1 - o DNA do fago λ digerido com Eco RI e Hind III. O "Slot" 2 mostra o DNA do Aspergillus niger. Este encontra-se bastante fragmentado, caracterizado pelo rastro ao longo do gel. A maioria dos fragmentos está concentrada na região correspondente à banda de 21,7 Kb, que é a maior obtida após a digestão do fago λ com as enzimas de restrição acima citadas.

4.3 - Característica do DNA do A. niger Obtido do Micélio

4.3.1 - Com uso de pérolas de vidro

Com o método descrito no item 3.8.2a, obteve-se micélio fragmentado utilizando-se homogeneizador tipo "Pot-

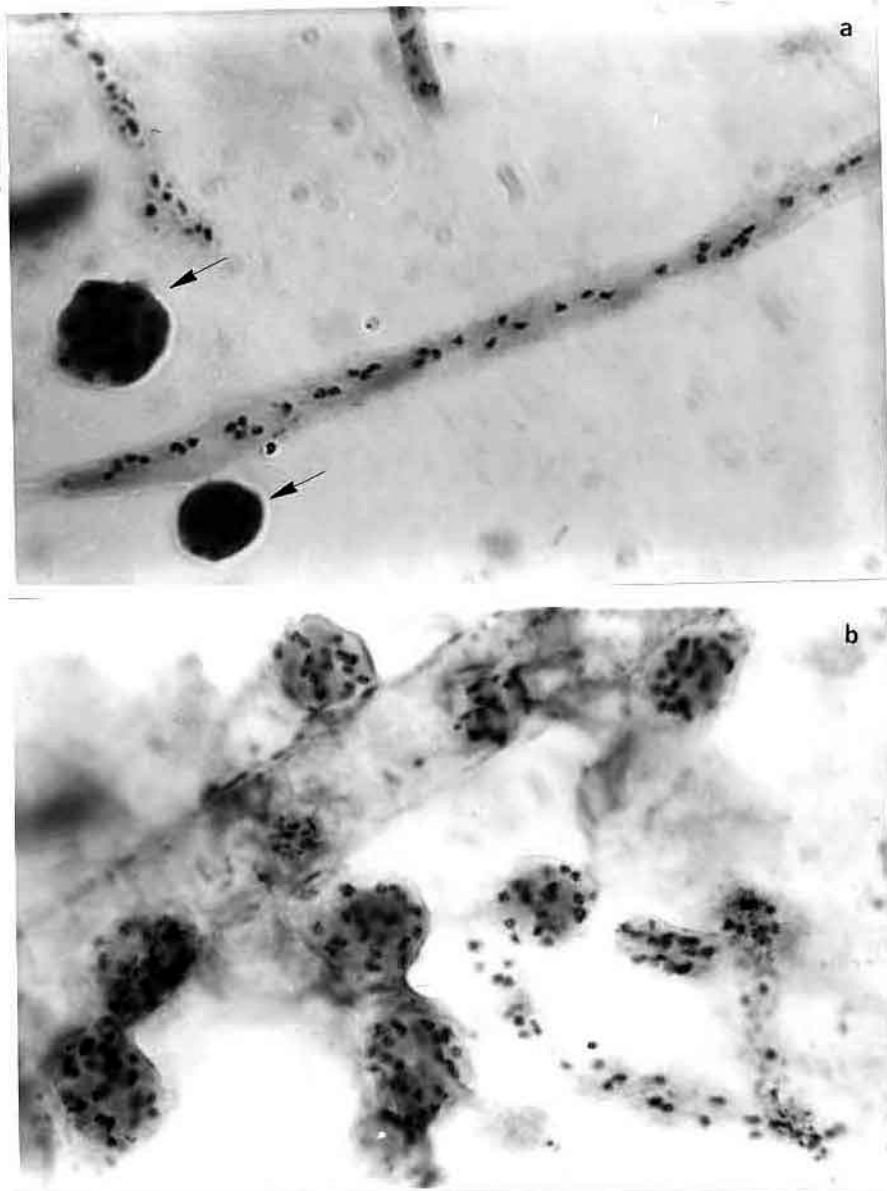


FIGURA 3 - a) Hifas multinucleadas após 45 minutos de digestão da parede celular. Presença de protoplastos (seta).

b) Presença de protoplastos multinucleados.

1200 x.

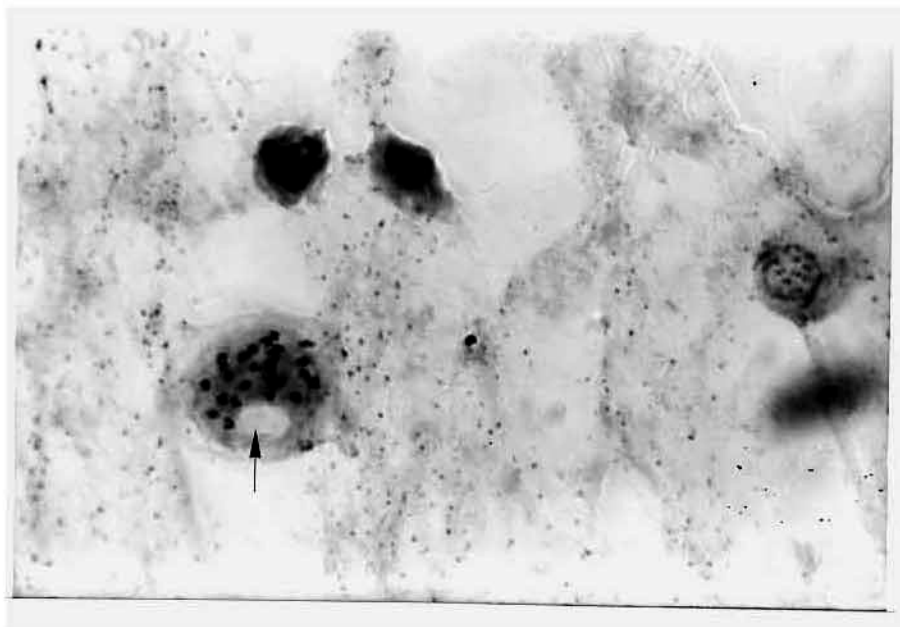
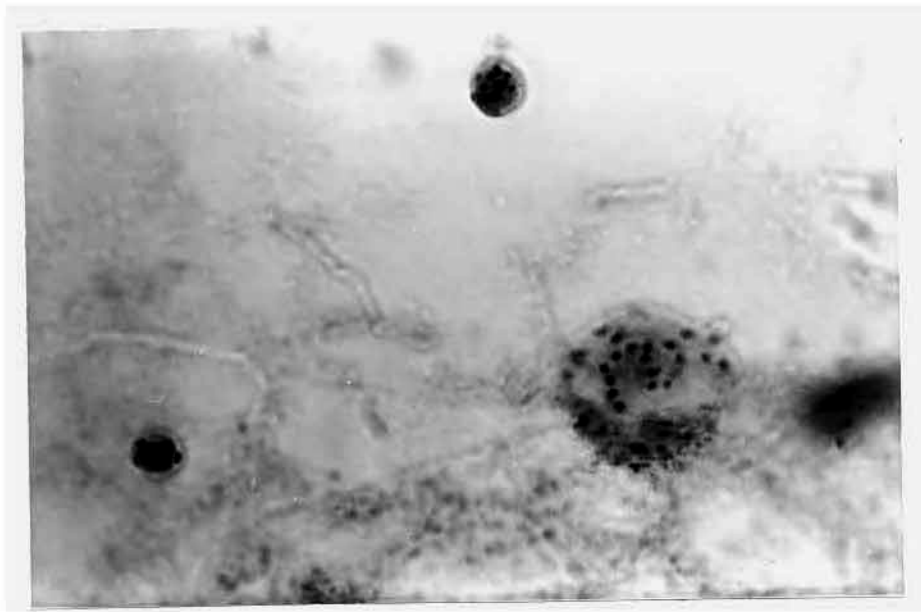


FIGURA 4 - Protoplastos multinucleados, evidenciando 20 núcleos e vacúolo (seta). 1.200 X.

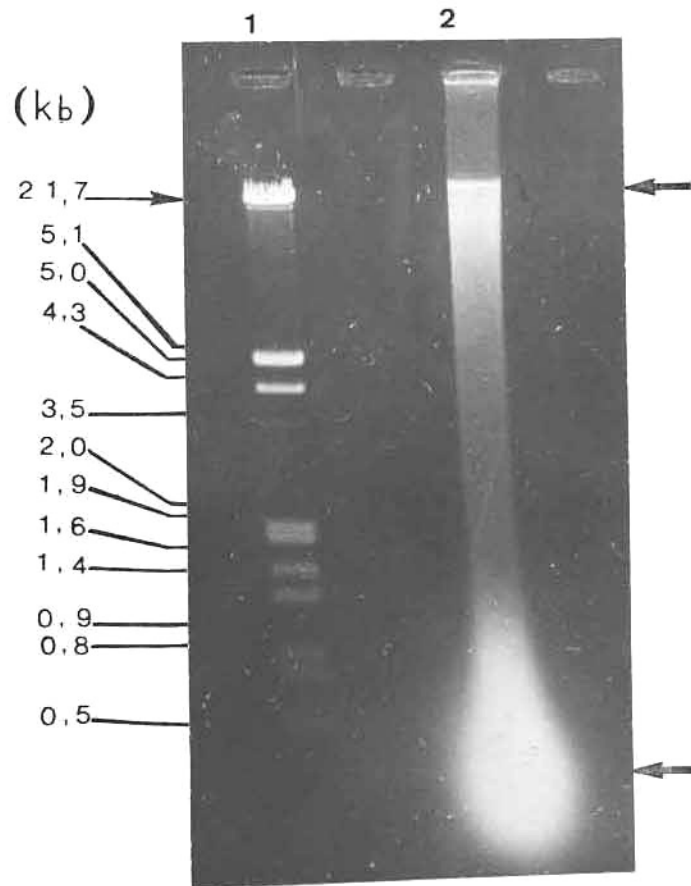


FIGURA 5 - Análise através de eletroforese em gel de agarose 1% de DNA total extraído do fungo filamentoso Aspergillus niger. "Slot" 1: DNA de fago λ digerido com Eco RI e Hind III. "Slot" 2: DNA extraído de protoplastos do A. niger. A seta superior indica os fragmentos de 21,7 Kb correspondente a primeira banda do fago λ , digerido com Eco RI e Hind III cujos fragmentos menores estão indicados pelo número de Kb correspondente. A seta inferior indica que a amostra encontra-se contaminada com RNA.

ter" e pérolas de vidro. Na fase final, ao se acrescentar etanol e, mesmo depois de algumas horas a -20° C, nenhum precipitado visível indicou presença de DNA. Após a centrifugação e ressuspensão em tampão TR, foi verificado que o perfil eletroforético do DNA isolado apresentou as mesmas características do obtido de protoplastos (FIGURA 5).

4.3.2 - Com uso de nitrogênio líquido

A eletroforese em gel de agarose 0,8% mostra o perfil do DNA obtido pela metodologia do item 3.8.2 - b (FIGURA 6). Observa-se a presença de RNA na primeira amostra e sua eliminação na amostra tratada com RNase-A. Verifica-se que o DNA é de alto peso molecular ao ser comparado com o DNA do padrão. O rastro prolongado de DNA ao longo do gel indica que a preparação contém fragmentos de menor peso molecular. O "slot" 4 evidencia que o DNA é passível de sofrer digestão com a enzima de restrição Pst I, mesmo não tendo sido a amostra tratada com RNase - A ("slot" 5).

A intensidade de fluorescência observada no gel mostra que a quantidade de DNA obtida é grande. Verificou-se através do método da difenilamina (item 3.9.1) que são necessários 8g (peso úmido) de micélio para se obter 0,7804 mg de DNA. A estimativa do rendimento do método (item 3.8.2 -b) ficou em torno de 35,98% considerando a concentração inicial de DNA de 2,1690 mg detectada na V alíquota dialisada. As demais alíquotas isoladas, nas outras etapas, não

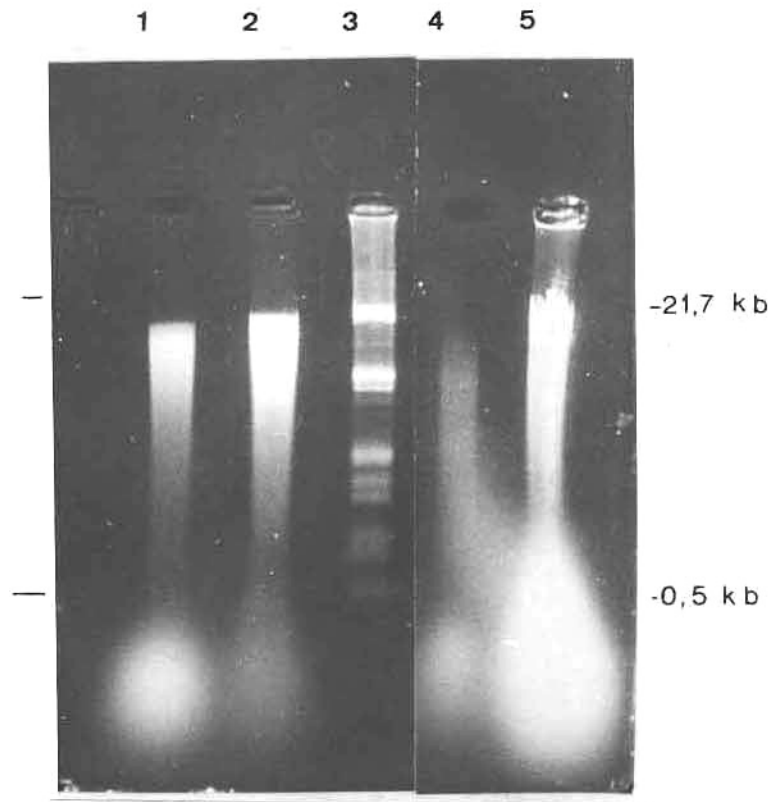


FIGURA 6 - Análise através de eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA total de linhagens de Aspergillus niger. "Slot" 1 e 2: DNA da linhagem nic₁olv₃ não tratada com RNase-A. "Slot" 3: DNA de fago λ digerido com Eco RI e Hind III. "Slot" 4: DNA da linhagem 10v10 digerido com Pst I. "Slot" 5: DNA da linhagem 10v10 não tratado com enzima de restrição nem com RNase-A.

evidenciaram a presença de DNA por este método de dosagem colorimétrico. Estas quantidades foram obtidas utilizando-se a curva padrão de DNA da TABELA II. A tabela mostra as leituras de absorvância em dois comprimentos de onda da faixa do visível (595 e 700 nm). A diferença entre elas forneceu valores (Y) que juntamente com as quantidades de DNA conhecidas (X) serviram para o ajuste da reta representada pela seguinte equação:

$$\hat{Y} = 0,0002.X + 0,0113$$

Todas as dosagens posteriores de DNA foram feitas utilizando-se estes cálculos, onde 0,0485 µg/ml representam o limite de detecção (LD) por esse método.

4.3.3 - Com uso de nitrogênio líquido e redução do tempo de manipulação

A substituição do homogeneizador tipo "Potter" pelo almofariz (item 3.8.2 - c) permitiu um melhor rompimento celular pela redução do micélio a pó e uma redução do tempo de manipulação. O DNA obtido foi analisado por eletroforese onde se observa através da FIGURA 7A, o mesmo padrão de DNA conseguido até então. Foi evidenciado uma fragmentação menos intensa dessa molécula após alteração dessa etapa inicial. A FIGURA 7B representa o perfil de amostras de DNA após purificação em CsCl e os fragmentos menores observados na FIGURA 7A não são perceptíveis na FIGURA 7B.

Após introdução de todas as modificações citadas no item 3.8.2 - d o tempo de extração de DNA ficou padronizado

TABELA II - Curva padrão do DNA de Aspergillus niger

CONCENTRAÇÃO DE DNA (g/ml)	ABSORBÂNCIA (A) EM DOIS COMPRIMENTOS DE ONDA (nm)	DIFERENÇA DAS (A)	VALOR EXPERIMEN- TAL (A-B)	Y CALCU- LADO	DESVIO PADRÃO	COEF. DE VAR. (%)	
X	595	700	595 - 700	Y	\hat{Y}	S	CV
BRANCO (B)	0,060	0,017	0,043	-	-	0,0022	5,20
6,25	0,086	0,020	0,066	0,023	0,024	0,0110	16,11
12,50	0,101	0,020	0,081	0,037	0,036	0,0057	7,00
25,00	0,124	0,019	0,105	0,061	0,061	0,0035	3,40
37,50	0,154	0,021	0,133	0,090	0,086	0,0028	2,13
50,00	0,176	0,022	0,154	0,110	0,111	0,0156	10,10

$$L_D = X_B + 2,5 S_B \quad L_D = 0,0485 \mu\text{g/ml} \quad \hat{Y} = 0,002 x + 0,0113 \quad r^2 = 0,99$$

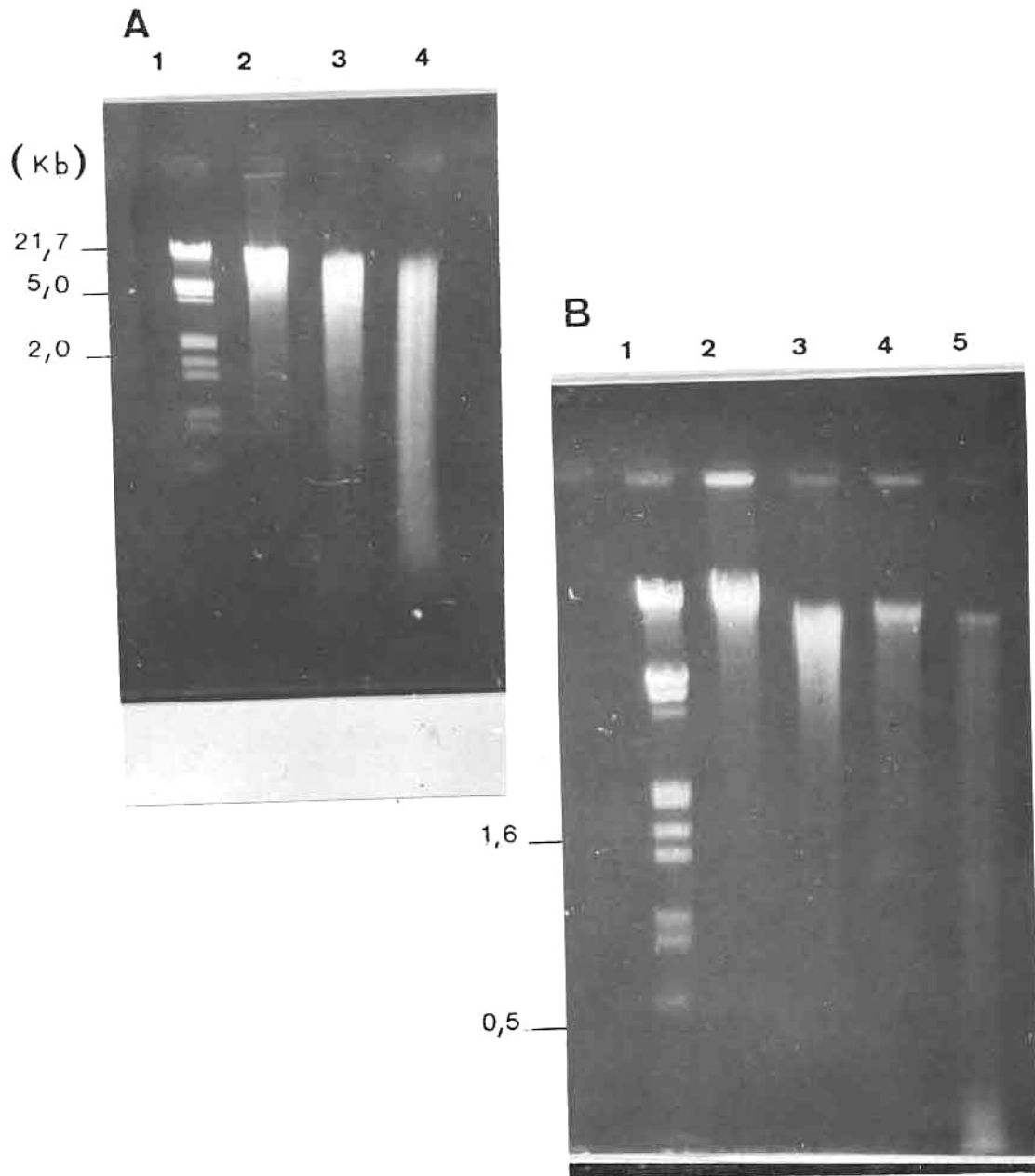


FIGURA 7 - Análise através de eletroforese em gel de agarose 1% de DNA total do A. niger. A - Amostras não purificadas em CsCl. "Slot" 1: DNA de fago λ digerido com Eco RI e Hind III. "Slots" 2, 3 e 4: extraído das linhagens nic₁ olv₃ (2;3) e 10v10 (4). B - Amostras purificadas em CsCl. "Slot" 1: DNA de fago λ digerido com Eco RI e Hind III. "Slot" 2: DNA da nic₁ olv₃. "Slot" 3 e 4: DNA da 10v10. Amostra 5: DNA da nic₁ olv₃ e 10v10.

para 3,5 horas até o momento em que se consegue enrolar estas moléculas em bastão de vidro. O perfil eletroforético deste DNA é representado no "Slot" 2 (FIGURA 10). Foi observado peso molecular de 50 Kb em comparação ao do marcador, fago λ também com 50 Kb ("Slot" 1).

4.3.4 - Aplicação da metodologia padronizada na extração de DNA de outros fungos filamentosos

Na FIGURA 8 observa-se os perfís eletroforéticos em gel de agarose do DNA extraído de outros fungos filamentosos como o Humicola sp. ("Slot" 1) e Picnoporus sanguineus ("Slot" 2). Os "Slots" 3, 4 e 5 são da linhagem 10v10 de Aspergillus niger. Observando o controle ("Slot" 6) verifica-se que estas amostras apresentam um peso molecular acima de 21,7 Kb além de fragmentos menores.

4.3.5 - Variação do grau de pureza do DNA ao longo do procedimento de extração

A metodologia padronizada de extração de DNA do A. niger (item 3.8.2 - d) nos forneceu na etapa inicial, logo após a primeira extração com clorofane, um grau de pureza de 1,2 a 1,5 definido pela seguinte relação

$$A_{260} : A_{280}$$

Após diálise exaustiva desta mesma amostra, a absorção nestes comprimentos de onda forneceu um grau de pureza diferente: de 1,9 a 2,0.

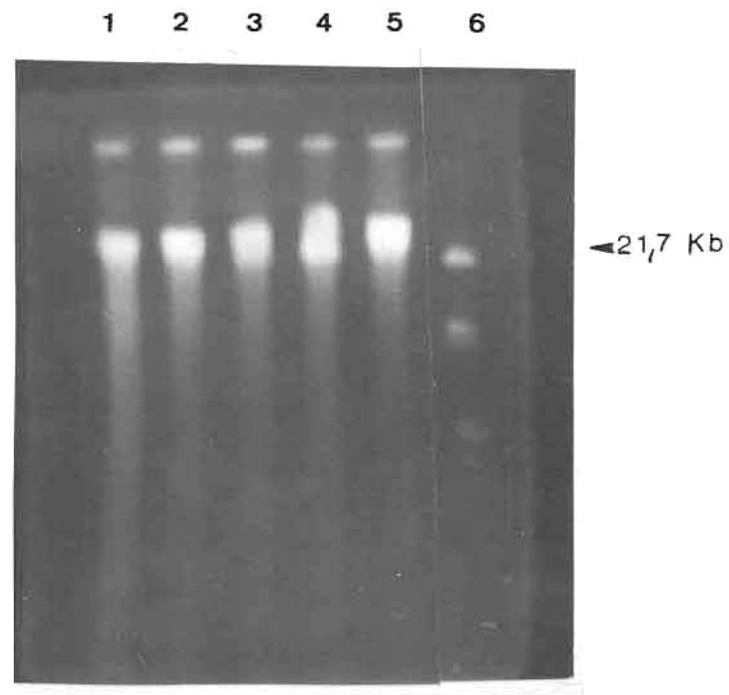


FIGURA 8 - Análise de eletroforese em gel de agarose 1% de DNA total extraído de alguns fungos filamentosos. "Slot" 1: DNA de Humicola sp. "Slot" 2: DNA de Picnoporus sanguineus (IBDF). "Slots" 3, 4 e 5: DNA de A. niger (10v10). "Slot" 6: DNA de fago λ digerido com Eco RI e Hind III.

4.3.6 - Dosagem e medida de recuperação do DNA através do método de difenilamina

As amostras caracterizadas no item 4.3.5 foram quantificadas pelo método de difenilamina. A TABELA III fornece a média da quantidade de DNA obtido no início e no final de quatro repetições do procedimento do item 3.8.2 - d.

A dosagem pela difenilamina detecta inicialmente 0,507mg de DNA, e 0,351mg na etapa final de extração dessa molécula. Esses valores evidenciaram uma recuperação de 70% e um rendimento de 175 ug de DNA por grama de micélio fresco.

4.3.7 - Purificação por cloreto de céσιο (CsCl)

O sistema de purificação em colchões de CsCl (item 3.14.15) permitiu a formação de uma banda única de DNA de Aspergillus niger após ultracentrifugação (FIGURA 9). Esta banda corresponde a um índice de refração de 1,395 com uma densidade de 1,6524 g/cm.

4.3.8 - Perfil de restrição e ligação do DNA de A. niger

As alíquotas de DNA de Aspergillus niger foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,7%. O marcador de peso molecular foi o DNA do fago intacto, representado por uma banda única de 50 Kb, no "Slot" 1 da FIGURA 10. No

TABELA III - Dosagem do DNA, extraído do A. niger, pelo método colorimétrico da difenilamina

	\bar{x}	S	CV (%)
CONCENTRAÇÃO INICIAL DE DNA (mg/ml)	0,507	0,077	10,2
CONCENTRAÇÃO FINAL DE DNA (mg/ml)	0,351	0,051	14,5
RECUPERAÇÃO (%)	70,900	17,090	24,3
mg DNA/g MICÉLIO	0,175	-	-

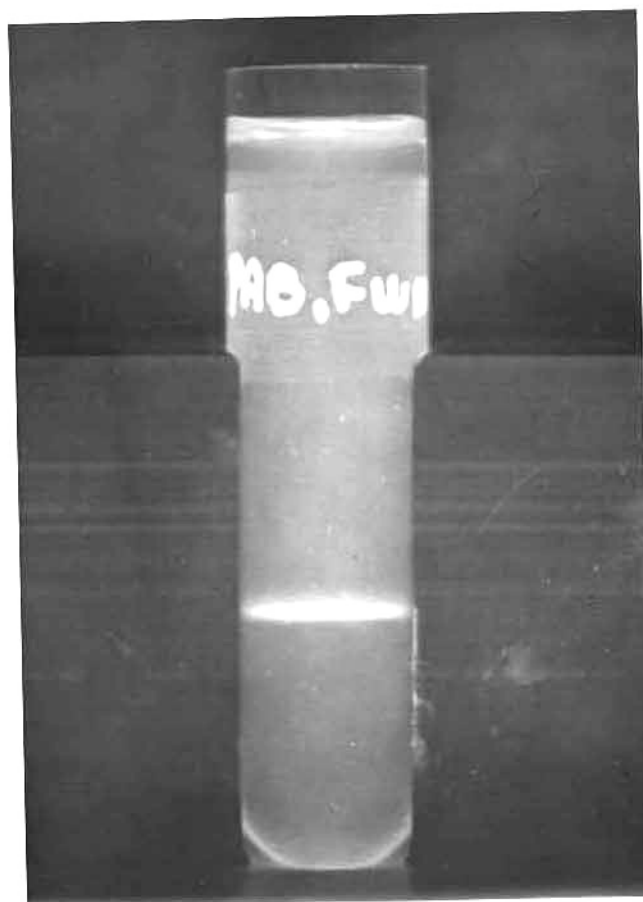


FIGURA 9 - Tubo de CsCl mostrando a formação de uma banda de DNA total de Aspergillus niger após de ultracentrifugação, (Rotor AH 650, 37.000 rpm, 20° C, por 24 horas). A posição da banda foi iluminada com luz ultra violeta de comprimento de onda longo, em tubo de centrífuga de 5,5ml.

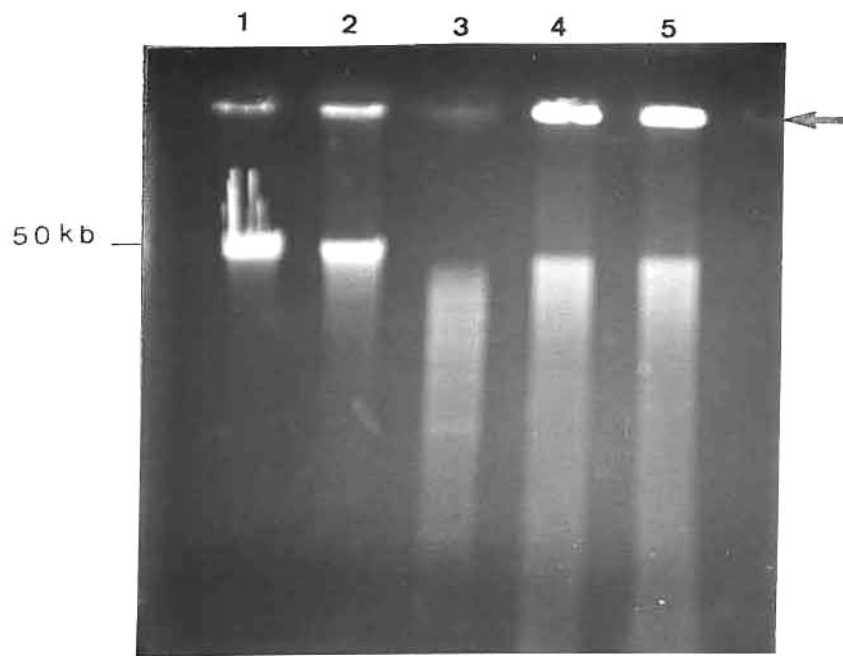


FIGURA 10 - Análise através de eletroforese em gel de agarose 1%, de DNA de A. niger digerido com Eco RI e religado com T_4 DNA-ligase. "Slot" 1: $1\mu\text{g}$ de DNA do fago λ não digerido, cuja única banda corresponde 50 Kb. "Slot" 2: $1\mu\text{g}$ de DNA de fungo não tratado com enzimas de restrição (intacto). "Slot" 3: $1,4\mu\text{g}$ de DNA da amostra do "slot" anterior, digerido com Eco RI. "Slots" 4 e 5: $1,4\mu\text{g}$ de DNA religado com T_4 DNA-ligase por 12 e 24 horas respectivamente. A seta no canto direito, indica que parte das amostras 2, 4 e 5 não migraram, ficando retidas no local de aplicação.

"Slot" 2 o DNA intacto do fungo pode ser visto como uma banda nítida, correspondendo ao mesmo nível da banda do λ . Nota-se também que parte do material fica retida no ponto de origem. No "Slot" 3, observa-se que o mesmo material após digestão com Eco RI, migra através do gel deixando um rastro de fragmentos de peso molecular variado, sem nenhuma presença de DNA no ponto de aplicação correspondente. Os "Slots" 4 e 5 mostram os resultados obtidos após religação dos fragmentos do DNA com a enzima T_4 DNA-ligase. Nota-se que após 12 e 24 horas grande parte do material foi religado, retornando ao peso molecular inicial.

5. DISCUSSÃO

5.1 - Obtenção e Regeneração de Protoplastos

Pela comparação dos resultados da TABELA I fica evidente que a metodologia de GAMBINO e col. (1984) foi a mais eficiente em relação ao número de protoplastos obtidos, bem como na regeneração dos mesmos. Pode-se propor então, para esta metodologia, a existência de um possível mecanismo que favoreça o aumento da produção de protoplastos na presença de $MgSO_4$ como estabilizador. Em concentrações da ordem de 0,5M, foram constatados 60 vezes mais protoplastos em relação ao método de HAMLIN e col. (1981) quando o estabilizador é o KCl. Para concentrações menores de sulfato de magnésio (50 mM) ainda se observa o favorecimento da produção de protoplastos, embora, a associação com o sorbitol tenha reduzido em pelo menos 3 vezes o número total de protoplastos. O efeito do sorbitol na queda de produção de protoplastos pode ser notado também no método de HAMLIN e col. (1981).

É importante ressaltar a complexidade da parede celular para o processo de protoplastização. Devido a esta complexidade muitas vezes se faz necessário a combinação adequada de enzimas líticas associadas à ação de detergentes fracos, durante e/ou após os períodos de germinação dos conídios para que se tenha uma melhor eficiência da produção de protoplastos. Assim sendo, o aspecto que deve ser destacado aqui, e que certamente favoreceu a protoplastização é que o micélio da linhagem 10v10 de A. niger foi desenvolvido na presença do Tween 80, o que pode ter contribuído para a redução do tempo de tratamento necessário para a liberação dos protoplastos pelo método de GAMBINO e col. (1984). Deve-se ressaltar que as enzimas líticas utilizadas foram as mesmas para ambos os métodos.

Com relação a regeneração dos protoplastos, o efeito drástico da presença isolada de sulfato de magnésio, é notado para ambos os métodos quando este estabilizador é utilizado simultaneamente para obtenção e regeneração. A presença de sorbitol quer seja na fase de produção ou de regeneração estimula significativamente a regeneração. Na metodologia de HAMLIN e col. (1981) a regeneração é altamente prejudicada para protoplastos produzidos e regenerados em sorbitol. No entanto, o mesmo não se verifica quando se utiliza o método de GAMBINO e col. (1984) e a associação de sorbitol com sulfato de magnésio em concentração baixa. Neste caso, ocorre inclusive uma duplicação da taxa de regeneração tendo sido estes os melhores resultados

constatados.

Em relação a utilização de estabilizadores orgânicos e inorgânicos, resultados similares foram relatados por SIETSMA e BOER (1973) que verificaram serem os estabilizadores inorgânicos mais eficientes na etapa de produção de protoplastos de Pythium enquanto que os orgânicos foram mais eficazes para a regeneração. Entretanto estes dados divergem dos de MACEDO (1986) que observou protoplastos de Humicola sp. regenerando melhor em $MgSO_4$ do que em sorbitol.

Pode-se surgir que, se os protoplastos a serem obtidos destinam-se à fusão ou à transformação genética, a adaptação do método de GAMBINO e col. (1984) deve ser a de preferência, pois origina número adequado de protoplastos em tempo reduzido com uma taxa melhor de regeneração. Evidentemente, estes são aspectos que devem ser testados em futuros experimentos. Resta-nos comentar que os resultados obtidos pelo método de HAMLIN e col. (1981) para a linhagem 10v10 de A. niger foram inferiores aos relatados por estes autores para diferentes linhagens de Aspergillus.

5.2 - Estudo Citológico dos Protoplastos

O estudo citológico dos protoplastos de A. niger demonstra que além de apresentarem-se globosos, estes contêm vacúolos de tamanhos variados, semelhantes aos observa-

dos em A. nidulans (PEBERDY, 1979) Penicillium pinophilum (BROWN e col., 1986) e A. niger (ROKEM e col., (1986). A maioria desses protoplastos apresentou elevado número de núcleos, facilmente evidenciados após a coloração de Giemsa (FIGURAS 3 e 4). A utilização do MgSO₄ na concentração de 0,5M promoveu turgescência celular permitindo a contagem em um só plano de até 32 núcleos, superando em 3 vezes a estimativa de núcleos para protoplastos de A. nidulans (PEBERDY, 1979).

O intenso metabolismo característico desse estágio multinuclear poderia favorecer, a recuperação da parede celular, embora outros fatores como a limitação no número e/ou funcionamento de organelas essenciais pudesse afetar a regeneração destes protoplastos.

O fato de apresentarem esse fenômeno osmótico faz com que haja um aumento do diâmetro dos protoplastos, o que os torna mais disponíveis para experimentos de micromanipulação.

5.3 - Extração de DNA Total de Aspergillus niger

Um marco importante para o desenvolvimento da metodologia de extração de DNA de microrganismos teve início com o trabalho de MARMUR (1961) que discute o desempenho de cada reagente utilizado na purificação dessa molécula. Entretanto, não menciona a resistência da parede celular

apresentada pelos fungos filamentosos, o que constitui um obstáculo na extração de DNA desses microrganismos. Em vista disto, foram utilizados inicialmente protoplastos de Aspergillus niger e, posteriormente, o micélio para o isolamento de DNA. Os resultados demonstraram que na etapa da lise dos fragmentos do micélio ocorria uma alta viscosidade, fato este não perceptível após a lise dos protoplastos. A viscosidade apresentada no início da preparação é, segundo MARMUR (1961), um indicativo de bom rendimento de extração desta macromolécula. Analisando a FIGURA 5, observa-se que o DNA de protoplastos é de PM elevado, embora ainda fragmentado. Desta forma as hifas deste fungo foram utilizadas como fonte de DNA total, nas extrações posteriores. Uma situação similar foi verificada por MORRIS (1978) em A. nidulans, o qual recuperou mais DNA de conídios que de protoplastos. Quanto à resistência da parede celular à quebra mecânica foram utilizadas várias estratégias para se vencer esta dificuldade, visando elevar o rendimento e preservar o alto peso molecular do DNA. Numa primeira etapa os experimentos foram realizados por homogeneização do micélio com pérolas de vidro, de acordo com o procedimento de MORRIS (1978). Entretanto, este método mostrou-se ineficaz na ruptura do micélio, mesmo com tempos prolongados, impedindo desta forma, uma atuação eficiente dos reagentes durante a extração do DNA, contribuindo assim para o baixo rendimento obtido. Em consequência disto, fêz-se a substituição das pérolas de vidro pelo nitrogênio líquido (GEALT e col., 1976) visando uma ruptura mais eficaz do micélio. Com esta

metodologia - nitrogênio líquido mais homogeneização em "Potter" - obteve-se um rendimento de 35,9% bem como DNA de alto peso molecular (FIGURA 6). Nota-se ainda a presença de DNA fragmentado o que provavelmente decorreu do longo tempo dispendido, desde o início até o final do procedimento, favorecendo a degradação do DNA pela ação de nucleases. Prosseguiu-se então no sentido de minimizar o tempo de exposição do DNA às nucleases visando a adequação do método de extração. Uma vez superado estas dificuldades, a metodologia demonstrou reprodutividade e pode ainda, de maneira generalizada, ser aplicada para extração de DNA de outros fungos filamentosos tais como Humicola sp. e Picnoporus sanguineus (FIGURA 8).

A quantificação do DNA obtido e, a análise de sua pureza, foram os principais critérios adotados na avaliação do método de extração do DNA do fungo. Apesar das preparações fornecerem DNA relativamente puro, considerou-se a necessidade do tratamento em gradiente de cloreto de césio (FIGURA 9). Estes cuidados foram tomados com o objetivo de se eliminar qualquer vestígio de contaminantes, que pudessem interferir no perfeito desempenho de enzimas de restrição e ligação. Além disso, outras informações podem ser obtidas com a aplicação dessa técnica, tais como o cálculo de densidades e determinação da percentagem de G + C (SCHILDKRAUT e col., 1962).

O DNA obtido após purificação em CsCl apresenta uma relação de A_{260}/A_{280} na faixa de 1,9 - 2,0 demonstrando seu

alto grau de pureza. Este material mostrou-se acessível à digestão com a enzima de restrição Eco RI (FIGURA 10) bem como, os fragmentos produzidos foram reconhecidos pela enzima de ligação T_4 DNA-ligase, evidenciando a ausência de contaminantes que pudessem interferir nestas reações enzimáticas. Após ligação dos fragmentos de DNA, com a enzima T_4 DNA-ligase observou-se a reconstituição de moléculas de alto peso molecular ficando algumas, inclusive, impedidas de migrarem durante a eletroforese em gel de agarose, na concentração de 0,8%.

A avaliação quantitativa, relativa ao rendimento obtido no final da preparação, foi feita através da utilização do método da difenilamina (GILES e MYERS, 1965) que mostrou-se um método de alta precisão e sensibilidade adequada ($L_D = 0,0485 \mu\text{g/ml}$). A reação direta da difenilamina com o açúcar desoxirribose do DNA, resulta na formação de um cromóforo azul, característico deste método colorimétrico (BURTON, 1956). A ausência de traços de clorofane e a eliminação de interferentes de baixo PM, após diálise, permitiram a quantificação adequada do DNA obtido inicialmente. Esta etapa foi crítica na capacidade de detecção do DNA, quando utilizado o método da difenilamina. Estes interferentes provavelmente foram capazes de impedir a formação do cromóforo, diminuindo a sensibilidade do método. A determinação das quantidades de DNA nas etapas durante o processo de isolamento foram feitas por utilização de uma curva de calibração construída com DNA purificado de A.

niger (TABELA II). Aos pontos experimentais desta curva foi ajustada uma função linear, a qual passou a ser utilizada posteriormente nos cálculos das concentrações de DNA inicial e final. Em ambas foram obtidas quantidades de DNA expressas pela média de quatro extrações (TABELA III). Em cada uma das etapas, o coeficiente de variação mostrou-se dentro dos limites de 15% refletindo, provavelmente, uma variação no grau de hidratação do micélio no momento da determinação do peso úmido. A reprodutividade do método de extração foi determinado pelo desvio da média (S) da recuperação das quatro extrações ficando em $70\% \pm 18$. O coeficiente de variação de 25% entre uma extração e outra provavelmente deveu-se à complexidade do material biológico bem como à alterações na manipulação durante o processo de isolamento do DNA. Mesmo assim, esse procedimento apresentou uma recuperação média (70%) superior a outros métodos de obtenção de DNA de microrganismos (TABELA IV).

TABELA IV - Comparação entre as percentagens de recuperação de DNA de Aspergillus niger e outros microorganismos

MICROORGANISMOS	RECUPERAÇÃO DE DNA (%)	REFERÊNCIAS
<u>Aspergillus niger</u>	70,9	(este trabalho)
<u>Neurospora crassa</u>	46,0	HSIANG e COLE (1973)
<u>Sacharomyces cerevisiae</u>	46,7	BHARGAVA e HALVORSON (1971)
<u>Sacharomyces cerevisiae</u>	36,0	WINTERSBERGER e cols. (1973)
<u>Sacharomyces cerevisiae</u>	24,0	DOI e DOI (1974)
<u>Aspergillus nidulans</u>	18,8	GEALT e cols. (1976)

Percentagens calculadas, pelas quantidades de DNA dosadas, através do método colorimétrico da difenilamina.

6. CONCLUSÕES

Em relação ao trabalho por nós executado, com a linhagem 10v10 de A. niger podemos concluir:

- 1 - O melhor rendimento relativo à produção de protoplastos foi obtido com o uso de Tween 80 durante a formação de micélio e uso de $MgSO_4$ 0,5M como estabilizador.
- 2 - A presença de sulfato de magnésio em baixas concentrações associado ao sorbitol como estabilizador foi a melhor condição para a regeneração dos protoplastos.
- 3 - O sorbitol foi um bom estabilizador durante a fase de regeneração mas, apresentou o efeito contrário na etapa de produção de protoplastos. Situação inversa se verificou para o sulfato de magnésio.

4 - A escolha da metodologia de GAMBINO e col. (1984) se fêz em função da obtenção de elevado número e boas condições de regeneração dos protoplastos, o que não foi possível obter com o método de HAMLIN e col. (1981). O aspecto morfológico dos protoplastos favoreceu à uma análise citológica que permitiu visualizar elevado número de núcleos.

5 - O DNA obtido pela metodologia desenvolvida preenche os seguintes requisitos referentes à sua utilização pela Tecnologia do DNA Recombinante:

- a) alto grau de pureza ($A_{260} : A_{280} = 1,8$ a $2,0$)
- b) alto PM
- c) bom rendimento
- d) susceptibilidade à endonucleases de restrição e enzima de ligação.

6 - A medida da recuperação do DNA através desta metodologia, foi feita utilizando-se o método da difenilamina (DFA). Os dados mostraram uma eficiência de recuperação de DNA em torno de 70%, o que representa o dobro do valor obtido quando esta metodologia ainda não se encontrava totalmente ajustada (35,9%).

7 - Deve-se ressaltar que a metodologia de extração

de DNA ajustada para o A. niger tem mostrado alta reprodutibilidade mesmo quando aplicado para outros fungos filamentosos.

7. RESUMO

Foram estabelecidas neste trabalho, duas metodologias para linhagens de Aspergillus niger com o interesse voltado para sua utilização na Tecnologia do DNA Recombinante (TDR).

A primeira delas teve por objetivo o melhoramento da técnica de produção de protoplastos para esta linhagem, assim como a definição de melhores condições de regeneração. As melhores preparações de protoplastos provieram do micélio desenvolvido na presença de Tween 80. Durante a produção foi possível obter até $2,1 \times 10^8$ protoplastos/ml quando o sulfato de magnésio 0,5M foi utilizado como estabilizador nesta etapa. A associação do sorbitol ao $MgSO_4$ em baixa concentração (50 mM) possibilitou um aumento significativo da taxa de regeneração (de até, aproximadamente 20%) quando o sorbitol foi mantido como único estabilizador. Os protoplastos obtidos pelo método de GAMBINO e col. (1984) por nós adaptado, apresentaram-se túrgidos e permitiram uma análise citológica com visualização de numerosos núcleos.

A segunda metodologia objetivou a melhoria do procedimento da extração de DNA deste fungo resultando em uma preparação rápida (3,5 horas de manipulação) em que o DNA apresentou as seguintes características:

- peso molecular elevado (50Kb) quando comparado ao marcador fago λ .
- alto grau de pureza ($A_{260} : A_{280} = 1,8 - 2,0$)
- susceptibilidade à ação de enzimas de restrição (Eco RI e Pst I) e de ligação (T_4 DNA-ligase)

A determinação da quantidade de DNA obtido após extração, utilizando-se a metodologia desenvolvida durante o trabalho, foi feita por dosagem colorimétrica da difenilamina (DFA). A recuperação do DNA extraído foi de 70% e sua alta reprodutibilidade permitiu inclusive, a utilização desta metodologia para extração desta macromolécula de outros fungos filamentosos.

8. SUMMARY

This research was done aiming the improvement of two methods of great relevance to the Recombinant DNA Technology (RDT) in Aspergillus niger.

Firstly, the method of production and regeneration of protoplasts was improved. The best protoplasts preparations (2.1×10^8 protoplasts/ml) were obtained when the mycelium was grown in medium containing Tween 80 and magnesium sulphate 0.5M, the latter used as an osmotic stabilizer. However, regeneration could only be significantly improved when magnesium sulphate was used at a lower concentration (50 mM) associated with sorbitol (1.2 M) during the production of protoplasts. Cytological analysis with protoplasts isolated by using the method of GAMBINO et alii (1984) revealed that up to 32 nuclei can be counted per protoplast.

The method for isolation of DNA from this species was also improved. The final procedure is rapid (3.5 hours

of manipulation before cesium chloride - ethidium bromide gradient) and DNA isolated has showed the following characteristics:

- high molecular weight; approximately 50 Kb.
- low level of proteic contamination ($A_{260}:A_{280} = 1.8-2.0$)
- susceptibility to restriction (Eco RI and Pst I) and ligation (T_4 DNA - ligase) enzymes.

The DFA method was applied to estimate the recovery of DNA by using this improved procedure. DNA yields as high as 70% (ratio between final and inicial DNA concentrations) were obtained.

The improved procedure has also proved to be suitable for extraction of DNA from others species of filamentous fungi.

9. BIBLIOGRAFIA

- ACHA, I.G. e J.R. VILLANUEVA, 1963. Differences in the mode of action of Strepzyme and Helix pomatia enzyme preparation on Trichotecium roseum spores. NATURE, 200: 1231.
- AGUIRRE, M.J., I.G. ACHA, e J.R. VILLANUEVA, 1964. Formation of protoplasts of Fusarium culmorum by strepzyme. ANTONIE VAN LEEUWENHOEK, 30: 33 - 44.
- AGUIRRE, M.J.R. e J.R. VILLANUEVA, 1962. Production of protoplast - like structures from various species of fungi. NATURE, 196: 693 - 694.
- AHN, J.S. e M.Y. PACK, 1985. Use of liposomes in transforming yeast cells. BIOTECHNOLOGY LETTERS, 7: 553 - 556.

- ANNÉ, J., J.F., PEBERDY, 1976. Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with poliethylene glycol. JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, 92: 413 - 417.
- AZEVEDO, J.L. e S.O.P. COSTA, 1973. Exercícios práticos de genética. São Paulo. Cia. Editora Nacional, 288 p.
- BACHMANN, B.J. e D.M. BONNER, 1959. Protoplasts from Neurospora crassa. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 78: 550.
- BALL, C., A.J. LAWRENCE, J.M. BUTLER e K.B. MORRISON, 1978. Improvement in amyloglucosidase production following genetic recombination of Aspergillus niger strains. EUROPEAN JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 5: 95 - 102.
- BALLANCE, D.J., F.P. BUXTON e G. TURNER, 1983. Transformation of Aspergillus nidulans by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of Neurospora crassa. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 112: 284 - 289.
- BANKS, G.T., F. BINNS e R.L. CUTCLIFFE, 1976. Recent developments in the production and industrial applications of amylolytic enzymes derived from filamentous fungi. PROGRESS IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, 6: 95 - 139.

- BEÇAK, W. e J. PAULETE, 1976. Técnicas de Citologia e Histologia. Rio de Janeiro, livros Técnicos e Científicos S.A., v.2, 305 p.
- BEGGS, J.D., 1978. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. NATURE 275: 104 - 109.
- BERGEN, L.G. e N.R. MORRIS, 1983. Kinetics of the nuclear division cycle of Aspergillus nidulans. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 156: 155 - 160.
- BHARGAVA, M.M. e H.O. HALVORSON, 1971. Isolation of nuclei from yeast. JOURNAL OF CELL BIOLOGY, 49: 423 - 429.
- BIBB, M.J., J.M. WARD e D.A. HOPWOOD, 1978. Transformation of plasmid DNA into Streptomyces at high frequency. NATURE, 274: 398 - 400.
- BONATELLI, JR., R., J.L. AZEVEDO e G.U. VALENT, 1983. Parasexuality in a citric acid producing strain of Aspergillus niger. REVISTA BRASILEIRA DE GENÉTICA, 6: 399 - 405.
- BROWN, A.J., K. OGAWA e T.M. WOOD, 1986. Studies on the preparation and regeneration of protoplasts from the cellulolytic fungus Penicillium pinophilum. ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, 9: 527 - 532.

- BURTON, K., 1956. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. THE BIOCHEMICAL JOURNAL, 62: 315 - 323.
- BUXTON, F.P., D.I. GWYNNE e R.W. DAVIES, 1985. Transformation of Aspergillus niger using the arg B gene of Aspergillus nidulans. GENE, 37: 207 - 214.
- CHANG, L.T. e C.A. TERRY, 1973. Intergenic complementation of glucoamylase and citric acid production in two species of Aspergillus. APPLIED MICROBIOLOGY, 25: 890 - 895.
- CASE, M.E., M. SCHWEIZER, S.R. KUSHNER e N.H. GILES, 1979. Efficient transformation of Neurospora crassa by utilizing hybrid plasmid DNA. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY SCIENCES, USA, 76: 5259 - 5263.
- COLE, G.T. e L.M. POPE, 1981. Surface wall components of Aspergillus niger conidia. In: G. Turian e H. R. Hohl ed. THE FUNGAL SPORE: morphogenetic controls. London. Academic Press. p. 195 - 215.
- DAGERT, M. e S.D. EHRLICH, 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. GENE, 6: 23 - 28.

- DAS, A. e Z. ILCZUK, 1978. Spontaneous segregation of a heterozygous diploid of Aspergillus niger. FOLIA MICROBIOLOGICA, 23: 362 - 365.
- DAVIS, R.W., M. THOMAS, J. CAMERON, T.P. St. JOHN, S. SCHERER e R.A. PADGETT, 1977. Rapid DNA isolations for enzymatic and hibridization analysis. In: Colowick, S.P. e N.O. Kaplan, ed. METHODS IN ENZYMOLOGY. New York and London. Academic Press. v. 65, p. 404 - 411.
- DOI, K. e A. DOI, 1974. Isolation of nuclei from a tetraploid strain of Sccharomyces cerevisiae. JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, 75: 1017 - 1026.
- DOOIJEWAAARD - KLOOSTERZIEL, A.M.P., J.H. SIETSMA e J.T.M. WOUTERS, 1973. Formation and Regeneration of Geotrichum candidum protoplasts. JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, 74: 205 - 229.
- EDELMAN, M., 1975. Purification of DNA by affinity chromatography: removal of polysaccharide contaminants. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 65: 293 - 297.
- EMERSON, S., M.R. EMERSON, 1958. Production, reproduction and reversion of protoplasts - like structures in the osmotic strain of Neurospora crassa. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, USA, 44: 668.

FAWCETT, P.A., P.B. LODER, M.J. DUCAN, T.J. BEESLEY e E.P. ABRAHAM, 1973. Formation and properties of protoplasts from antibiotic-producing strains of Penicillium chrysogenum and Cephalosporium acremonium. JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, 79: 293 - 309.

FELDEN, A.R., M.M. SANDERS e N.R. MORRIS, 1976. Presence of histones in Aspergillus nidulans. THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, 68: 430 - 439.

FODOR, K. e L. ALFOLDI, 1976. Fusion of protoplasts of Bacillus megaterium. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, USA, 73: 2147 - 2150.

FREIFELDER, D., 1967. The use of NaClO₄ to isolate bacteriophage nucleic acids. In: Colowick, S.P. e N.O. Kaplan, ed. METHODS IN ENZYMOLOGY, New York and London Academic Press. v. XII, p. 550 - 554.

FURTADO, J.S., 1968. Basidial cytology of Exidia nucleata. MYCOLOGIA, 60: 9 - 15.

GAMBINO, J., L.G. BERGEN e N.R. MORRIS, 1984. Effects of mitotic and tubulin mutations on microtubule architecture in actively growing protoplasts of Aspergillus nidulans. THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, 99: 830 - 838.

GARBER, R.C. e O.C. YODER, 1983. Isolation of DNA from filamentous fungi and separation into nuclear, mitochondrial, ribosomal and plasmid componentes. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 135: 416 - 422.

GEALT, M.A., G. SHEIR-NEISS e N.R. MORRIS,- 1976 The isolation of nuclei from the filamentous fungus Aspergillus nidulans. JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, 94: 204 - 210.

GILES, K.W. e A. MYERS, 1965. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. NATURE, 3: 93.

GUNGE, N., 1983. Yeast DNA plasmids. ANNUAL REVIEWS OF MICROBIOLOGY, 37: 253 - 276.

HAMILTON, J.G. e J. CALVET, 1964. Production of protoplasts in osmotic mutant of Neurospora crassa without added enzyme. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 88: 1084 - 1086.

HAMLIN, P.F., R.E. BRADSHAW, F.M. MELLON, C.M. SANTIAGO, J.M. WILSON e J.F. PEBERDY, 1981. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY 3: 321 - 325.

HASEGAWA, S. e J.H. NORDIN, 1969. Enzymes that hydrolyze fungal cell wall polysaccharides. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 244: 5460 - 5470.

HAUTALA, J.A., B.H. CONNER, J.W. JACOBSON, G.L. PATEL e N.H. GILES, 1977. Isolation and characterization of nuclein from Neurospora crassa. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 130: 704 - 713.

HINNEN, A., J.B. HICKS e G.R. FINK, 1978. Transformation of yeast. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, USA, 75: 1929 - 1933

HOLUBOVÁ, I., Z. JANDOVÁ, P. TICHY, J. HUBÁČEK e J. LUDVÍK, 1985. Transfer of liposome - encapsulated plasmid DNA to Bacillus subtilis protoplasts and calcium - treated Escherichia coli cells. FOLIA MICROBIOLOGICA, 30: 97 - 100.

HOPWOOD, D.A., 1981. Genetic studies with bacterial protoplasts. ANNUAL REVIEWS OF MICROBIOLOGICAL, 35: 237 - 272

HOPWOOD, D.A., H.M. WRIGHT, M.J. BIBB e S.N. COHEN, 1977. Genetic recombination through protoplast fusion in Streptomyces. NATURE, 268: 171 - 174.

HSIANG, M.W. e R.D. COLE, 1973. The isolation of histones from Neurospora crassa. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 248: 2007 - 2013.

ISAAC, S., - 1979. Isolation and ultrastructure of protoplasts from fungi. In: Peberdy, J.F., ed. PROTOPLASTS - APLICATIONS IN MICROBIAL GENETICS. A Handbook of Experimental Methods. UNIVERSITY OF NOTTINGHAM, cap. 4, p. 17.

ISAAC, S. e J.F. PEBERDY, 1979. Production of mycolytic enzymes. In: Peberdy, J.F. ed. PROTOPLASTS - APLICATIONS IN MICROBIAL GENETICS. A Handbook of Experimental Methods. UNIVERSITY OF NOTTINGHAM, cap. 3 p. 12.

ISAAC, S. e V. GOKHALE, 1982. Autolysis: a tool for protoplasts production from Aspergillus nidulans. TRANSACTIONS OF THE BRITISH MYCOLOGICAL SOCIETY, 78: 389 - 394.

JOHN, M.A. e J.F. PEBERDY, 1984. Transformation of Aspergillus nidulans using the argB gene. ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, 8: 386 - 389.

JOHNSTON, I.R., 1965. The composition of the cell wall of Aspergillus niger. BIOCHEMICAL JOURNAL, 96: 651 - 658.

KALF, G.F. e M.A GRÉCE, 1967. The isolation of DNA from mitochondria. -In: Colowick, S.P. e N.O. Kaplan ed. METHODS IN ENZYMOLOGY. New York and London. Academic Press. v.XII, p. 533 - 538.

KELLY, J.M. e M.J. HYNES, 1985. Transformation of Aspergillus niger by the amd S gene of Aspergillus nidulans. EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION, JOURNAL, 4: 475 - 479.

KEVEI, F., J.F. PEBERDY, 1984. Further studies on protoplast fusion and interspecific hybridization within the Aspergillus nidulans group. JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, 130: 2229 - 2236.

KLETT, R.P. e M. SMITH, 1968. Isolation of deoxyribonucleate from invertebrates. In: Colowick, S.P. e N.O. Kaplan ed. METHODS IN ENZYMOLOGY. New York and London. Academic press. v.XII, p. 112 - 115.

LAHOZ, R., R. HUERTOS e B.M. IBARRETA, 1970. Stability of the cell walls of Neurospora crassa during autolysis. ANNALS OF BOTANY, 34: 625 - 629.

LEMMERS, M., M.D. BEUCKELEER, M. HOLSTERS, P. ZAMBRYSKI, A. DEPICKER, J.P. HERNALSTEENS, M. VAN MONTAGU e J. SCHELL, 1980. Internal organization, boundaries and integration of Ti-plasmid DNA in nopaline crown gall tumours. JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, 144: 353 - 376.

LHOAS, P., 1967. Genetic analysis by means of the parasexual cycle in Aspergillus niger. GENETICAL RESEARCH, 10: 45 - 61.

LOCKWOOD, L.B., 1975. Organic acid production. In: Smith, J.E. e D.R. Berry ed. THE FILAMENTOUS FUNGI. London. Edward Arnold v. I p. 140 - 157.

LUNA, E.A., 1985. Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin. Rio de Janeiro. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO. 240p. (Tese de Doutorado).

LURQUIN, P.F., G. TSHITENGE, G. DELAUNOIT e L. LEDOUX, 1975. Isolation of DNA from plant cells by gel filtration on agarose. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 65: 1 - 10.

- MACEDO, J.M.B., 1986. Avaliação do comportamento de Humicola sp. com vistas ao melhoramento genético para produção de celulases. Rio de Janeiro. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - Escola de Química. 90 p. (Tese de Mestrado).
- MANDEL, M. e A. HIGA, 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, 53: 159 - 162.
- MANIATIS, T., E.F. FRITSCH e J. SAMBROOK, 1982. MOLECULAR CLONING: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, NY. 545 p.
- MARMUR, J., 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, 3: 208 - 218.
- MORRIOTT, A.C., S.A. ARCHER e K.W. BUCK, 1984. Mitochondrial DNA in Fusarium oxysporum is a 46.5 Kilobase pair circular molecule. JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, 130: 3001 - 3008.
- MORRIS, N.R., 1978. Preparation of large molecular weight DNA from the fungus Aspergillus nidulans. JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, 106: 387 - 389.

MUSÍLKOVÁ, M., Z. FENCL, 1968. Some factors affecting the formation of protoplasts in Aspergillus niger. FOLIA MICROBIOLOGICA, 13: 235 - 239.

MUSÍLKOVÁ, M. Z. FENCL e O. SEICHERTOVÁ, 1969. Release of Aspergillus niger protoplasts by Penicillium purpurogenum enzymes. FOLIA MICROBIOLOGICA, 14: 47 - 50.

NAGL, W., 1976. ZELLKERN UND ZELLZYKLEN. Stuttgart. Eugen Ulmer GmbH e Co., Ulmer, p.22

NOLL, H. e E. STUTZ, 1968. The use of sodium and lithium dodecyl sulfate in nucleic acid isolation. In : Colowick, S.P. e N.O. Kaplan, ed. METHODS IN ENZYMOLOGY. New York and London. Academic Press. v. XII, p. 129 - 155.

PAIETTA, J. e MARZLUF, G.A., 1985. Plasmid recovery from transformants and the isolation of chromosomal DNA segments improving plasmid replication in Neurospora crassa. CURRENT GENETICS, 9: 383 - 388.

PEBERDY, F.J., 1979. Wall biogenesis by protoplasts. In : Buernett e Trinci, ed. FUNGAL WALLS and HYPHAL GROWTH. British Mycological Society. Cambridge University Press. chap. 3 p. 71.

PENTTILA, M.E., K.M.H. NEVALAINEN, A. RAYNAL e J.K.C. KNOWLES, 1984. Cloning of Aspergillus niger genes in yeast. Expression of the gene coding Aspergillus β -glucosidase. MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, 194: 494-499.

PONTECORVO, G., J.A. ROPER e E. FORBES, 1953. Genetic recombination without reproduction in Aspergillus niger. JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, 8: 198 - 210.

RAO, T.R. e C.A. REDDY, 1984. DNA sequences from ligninolytic filamentous fungus Phanerochaete chrysosporium capable of autonomous replication in yeast. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMUNICATIONS, 118: 821- 827.

RADFORD, A., S. POPE, A. SAZEI, M.J. FRASER, e J.H. PARISH, 1981. Liposome - mediated genetic transformation of Neurospora crassa. MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, 184: 567 - 569.

REYES, F. e R. LAHOZ, 1976. Liberation of protoplasts from mycelium of Neurospora crassa by means of enzymes obtained from autolyzed cultures of this fungus. ANTONIE VAN LEEUWENHOEK, 42: 457 - 460.

REYMOND, P., P. VEAU e M. FEVRE, 1986. Production by protoplast fusion of new strains of Penicillium caseicolum for use in the dairy industry. ENZYME AND

MICROBIAL TECHNOLOGY, 8: 45 - 47.

REYMOND, P. e M. FEVRE, 1986. Recombination following protoplast fusion of Penicillium strains used in the dairy industry. ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, 8: 41 - 44.

ROBINOW, C.F. e C.E., CATEN, 1969. Mitosis in Aspergillus nidulans. JOURNAL OF CELL SCIENCE, 5: 403 - 431.

ROKEM, J.S., D. KLEIN, H. TODER e E. ZOMER, 1986. Degradation of fungal cell walls taking into consideration the polysaccharide composition. ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, 8: 588 - 592.

SCHAEFFER, P. B. CAMI e R.D. HOTCHKISS, 1976. Fusion of bacterial protoplasts. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, USA, 73: 2151 - 2155.

SCHILDKRAUT, C.L., J. MARMUR e P. DOTY, 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl. JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, 4: 430 - 443.

SIETSMA, J.H. e W.R. BOER, 1973. Formation and regeneration of protoplasts from Pythium PRL 2142. JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, 74: 211 - 217.

- SILVEIRA, W.D. e J.L. AZEVEDO, 1987. Protoplast fusion and genetic recombination in Metarhizium anisopliae. ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, 9: 149-151.
- SMITH, D. e H.O. HALVORSON, 1967. The isolation of DNA from yeast. In: Colowick, S.P. e N.O. Kaplan, ed. METHODS IN ENZYMOLOGY. New York and London. Academic Press. v.XII, p. 538 - 541.
- SPECHT, C.A., C.C. DIRUSSO, C.P. NOVOTNY e R.C. ULLRICH, 1982. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 199: 158 - 163.
- STERN, H., 1968. Isolation and purification of plant nucleic acids from whole tissues and from isolated nuclei. In: Colowick, S.P. e N.O. Kaplan, ed. METHODS IN ENZYMOLOGY. New York and London. Academic Press. v.XII, p. 100 - 112.
- STEVENSON, I., 1985. Protoplast formation from submerged mycelium and from spore germinants of Streptomyces coelicolor. AUSTRALIAN JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES, 38: 175 - 182.
- TEIXEIRA, S.M.R., 1985. Clonagem de sequências de replicação autônoma (ARS) de Trypanosoma cruzi. Brasília - DF. UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA. 97 p. (Tese de Mestrado).

VAN TUYL , J.M., 1977. Genetics of fungal resistance to systemic fungicides. Netherland, Mededelingen Landbouwhogeshool Wageningen. 136 p.

VRIES, O.M.H. e J.G.H. WESSELS, 1972. Release of protoplasts from Schizophyllum commune by a lytic enzyme preparation from Trichoderma viride. JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, 73: 13 - 22.

WEEKS, D.P., N.BEERMAN e O.M. GRIFFITH, 1986. A small - scale five - hour procedure to isolations from mammalian , insect, higher plant, algal, yeast and bacterial sources. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 152: 376 - 385.

WINTERSBERGER, V., P. SMITH e K. LETNANSKY, 1973. Yeast chromatin. Preparation from isolated nuclei, histone composition and transcription capacity. EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, 33: 123 - 130.

YELTON, M.M., J.E. HAMER e W.E. TIMBERLAKE, 1984. Transformation of A. nidulans by using a trp C plasmid. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, USA, 81: 1470 - 1474.