

**BC/15451**

**IB/80921**

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE ASPERGILLUS NIGER  
COM UM GENE HETERÓLOGO PARA  
RESISTÊNCIA AO BENOMIL

ADLANE VILAS BOAS FERREIRA

Orientador: Prof. Dr. Renato Bonatelli Junior

Tese apresentada ao Instituto  
de Biologia - UNICAMP, como  
requisito para a obtenção do  
título de Mestre em Ciências  
Biológicas, área de Genética

CAMPINAS - SP

1991

T/UNICAMP

F414<sub>t</sub>

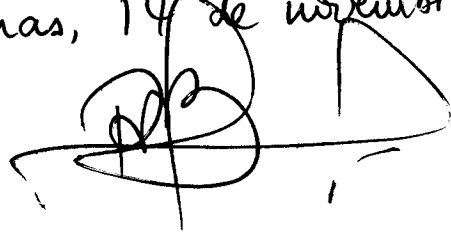
UNICAMP

UNIDADE	IB
N. CHAMADA	T/1126 E 4147
V.	EX
TOMBO BCI	1545.1
PROC.	215/92
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PRECO	R\$ 20.000,00
DATA	22-1-92
N.º CPD	

CM-00019409-1

Este exemplar corresponde à Redação  
Final da Tese defendida pela cãndi-  
data ADLANE VILAS BOAS FERREIRA E  
APROVADA PELA Comissão Julgadora

Campinas, 14 de novembro de 1999

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a horizontal stroke across the middle.

Se temos de ver uma sombra, vamos  
tentar simplesmente, humildemente,  
fazer com que ela não fique muito  
deformada pela passagem por nossa  
retina, tentar não confundir realidade  
com verdade, esta última só tendo  
valor para quem a formula.

Henri Laborit

Às minhas irmãs-amigas Adelaide e  
Mirian por participarem, de  
perto, dos meus sonhos e ajudarem  
para que eles sempre aconteçam.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Renato Bonatelli Junior, pela valiosa orientação durante este trabalho.

À minha família, pelo apoio, carinho e amor com os quais pude sempre contar.

À Fernanda e Mirian, pela amizade fraterna que nos une e nos faz sempre crescer.

Ao Niltinho, pela amizade, estímulo e pela ajuda na confecção da tese.

À Márcia e Rê, pela amizade, carinho e companheirismo que foram crescentes durante a nossa convivência.

Aos amigos do laboratório Alfredo, Ingrid e Ju, às amigas Cyntia, Gisa, Maria e Rachel, pelas gostosas horas de convivência, que tornaram o trabalho mais prazeroso.

Ao Alexandre, pelas fotos, à Júnia, pelo desenho e à Paula, pela força em alguns experimentos.

Aos amigos do Coral da Cultura Inglesa, pelos momentos de descontração compartilhados.

Aos profs. Elza Fernandes de Araújo, João Lúcio de Oliveira e Yoko Bomura Rosato, pela atenção na leitura da tese e pelas valiosas sugestões.

Ao Dr. Barry W. Glickman, pela oportunidade de estagiar em seu laboratório, bem como no apoio para execução de vários experimentos.

Ao pessoal do Lab. de Genética Vegetal- CBMEG, pela colaboração em alguns experimentos.

Às "meninas" da secretaria do Depto. Genética e Evolução, pela atenção e colaboração.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado, e ao FAEP-UNICAMP, pela concessão do auxílio-ponte.

# ÍNDICE

CONTEÚDO	página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. O fungo <i>Aspergillus niger</i> .....	3
2.2. Transformação genética.....	4
2.2.1. Transformação em leveduras.....	6
2.2.2. Transformação em fungos filamentosos.....	7
2.2.3. Frequências de transformação em <i>Neurospora crassa</i> .....	8
2.2.4. Frequências de transformação em <i>A. nidulans</i> .....	13
2.2.5. Frequências de transformação em <i>A. niger</i> .....	16
2.3. Replicação autônoma X integração de plasmídios em fungos filamentosos.....	20
2.4. $\beta$ -tubulinas e resistência ao benomil.....	24
2.5. Nucleases e transformação genética.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Linhagens utilizadas.....	29
3.1.1. <i>A. niger</i> .....	29
3.1.2. <i>A. nidulans</i> .....	29
3.1.3. <i>E. coli</i> .....	29
3.2. Meios de cultura para <i>Aspergillus</i> .....	30
3.2.1. Meio Mínimo. MM - (PONTECORVO et al., 1953b).....	30
3.2.2. Meio Completo - MC - (PONTECORVO et al., 1953 b,	

modificado de acordo com AZEVEDO e COSTA,1973).....	30
3.2.3.Meio Completo Simplificado - MCS - HAMLYM et al., 1981.....	31
3.2.4.Solução de vitaminas.....	31
3.3.Meios de cultura para <i>E. coli</i> .....	31
3.3.1.Meio LB (SAMBROOK et al.,1989).....	31
3.4.Esterilização.....	32
3.5.Temperaturas de incubação das linhagens.....	32
3.6.Teste de sensibilidade ao benomil.....	32
3.6.1.Soluções de benomil.....	32
3.6.1.1.Solução aquosa.....	32
3.6.1.2.Solução etanólica.....	33
3.6.2.Inoculação por ponto.....	33
3.6.3.Plaqueamento de conídios e protoplastos.....	33
3.7.Transformação.....	33
3.7.1.Descrição do plasmídio utilizado - pBT6.....	33
3.7.2.Transformação de <i>E. coli</i> .....	34
3.7.3.Extração do plasmídio.....	36
3.7.3.1.Soluções.....	36
3.7.3.2.Mini-preparação de plasmídios (Mini-prep).....	36
3.7.3.3.Preparação de plasmídio em larga escala.....	37
3.7.4.Transformação de <i>A. niger</i> .....	39
3.7.5.Modificações testadas ao longo do trabalho em experimentos separados.....	41
3.8. Teste do nível de resistência dos transformantes ao benomil, na presença de diferentes estabilizadores osmóticos.....	42
3.8.1.Plaqueamento de protoplastos.....	42
3.8.2.Inoculação por ponto.....	42
3.9.Digestão de DNA com enzimas de restrição.....	43



3.10. Eletroforese.....	43
3.11. Análise de transformantes através de hibridização.....	44
3.11.1. Extração de DNA dos transformantes.....	44
3.11.1.1. RAEDER & BRODA (1985).....	44
3.11.1.2. SAMBROOK et al (1985).....	45
3.11.2. Hibridização por "Southern blot".....	48
3.11.2.1. Transferência do DNA para membranas de nylon.....	46
3.11.2.2. Marcação do plasmídeo pelo método Random-Priming.....	47
3.11.2.3. Hibridização.....	47
3.11.3. Isolamento do fragmento contendo o gene <i>tub-2</i> de <i>N. crassa</i> .....	48
3.12. Teste de estabilidade mitótica dos transformantes.....	49
3.13. Teste para detecção de nucleases.....	50
3.13.1. Halo de hidrólise em placa, modificado de JEFFRIES et al., 1957.....	50
3.13.2. Hidrólise em placa de microtitulação.....	50
3.13.3. Hidrólise em tubo seguida de eletroforese.....	52
4. RESULTADOS.....	53
4.1. Teste de sensibilidade da linhagem Igp 73 ao benomil.....	53
4.1.1. Inoculação por ponto.....	53
4.1.2. Inoculação "pour plate" de conídios em MC.....	53
4.1.3. Inoculação "pour plate" de protoplastos em MC.....	54
4.1.4. Determinação da sensibilidade de protoplastos da Igp 73 ao benomil na presença de KCl e sorbitol como estabilizadores osmóticos.....	54
4.2. Transformação de <i>A. niger</i> .....	56
4.2.1. Frequências de transformação.....	56
4.2.2. Nível de resistência dos transformantes.....	59

4.2.3. Inoculação da lgp 73 e de transformantes, por ponto em MC e MC + KCl.....	62
4.3. Sensibilidade da linhagem recipiente e de transformantes ao benomil, na presença de KCl e sorbitol, como estabilizadores osmóticos.....	65
4.3.1. Inoculação por ponto em meios contendo diferentes preparações de estabilizadores osmóticos.....	65
4.4. Análise dos transformantes através de hibridização por "Southern Blot".....	69
4.4.1. Extração de DNA cromossomal de <i>A. niger</i> .....	69
4.4.2. Hibridização de DNA intacto com o plasmídeo pBT6.....	69
4.4.3. Hibridização de DNA digerido com o gene <i>tub-2</i> .....	74
4.5. Teste de estabilidade mitótica.....	74
4.6. Teste de detecção de nucleases.....	75
4.6.1. Halo de hidrólise em placa.....	75
4.6.2. Hidrólise de DNA em placa de microtitulação.....	75
4.6.3. Hidrólise de DNA em intervalos de tempo.....	78
4.6.4. Nucleases e transformação.....	82
5. DISCUSSÃO.....	84
5.1. Sensibilidade da linhagem lgp 73 ao benomil e influência dos estabilizadores osmóticos na sensibilidade e no crescimento.....	84
5.2. Detecção de nucleases.....	87
5.3. Eficiência de transformação.....	91
5.3.1. Nucleases e eficiência de transformação.....	94
5.4. Análise dos transformantes através de hibridização por "Southern blot".....	96

5.5. Estabilidade mitótica dos transformantes.....	101
6. CONCLUSÕES.....	103
7. RESUMO.....	104
8. ABSTRACT.....	105
9. BIBLIOGRAFIA.....	107
10. ABREVIATURAS.....	118

## 1. INTRODUÇÃO

Os fungos representam um grupo de grande importância para estudos genéticos e bioquímicos, pois apresentam o nível de complexidade de um eucarioto combinado com a facilidade de manipulação de um microrganismo. Além desse fato, muitas espécies são usadas na indústria, como produtoras de metabólitos primários e secundários; na agricultura, como agentes de controle biológico, ou são estudadas pelo impacto econômico que causam como patógenos de plantas.

Dentre os fungos filamentosos, o gênero *Aspergillus* tem sido bastante explorado por sua capacidade de produzir altos níveis de proteínas extracelulares. Além disso, as espécies *A. niger* e *A. nidulans* são apontadas como microrganismos de escolha para o desenvolvimento de sistemas de expressão e secreção de proteínas heterólogas, pois além da disponibilidade de vários mutantes nestas duas espécies, a sua genética é relativamente bem conhecida (VAN BRUNT, 1988; WARD, 1989; DEVCHAND e GWYNNE, 1991). Muitas proteínas humanas de potencial terapêutico, como o  $\alpha$ -interferon, o hormônio de crescimento, o fator de crescimento epidérmico, entre outras, assim como a quimosina bovina, uma lipase e proteases fúngicas e uma endoglucanase bacteriana, já foram secretadas em *Aspergillus* (Revisão em DEVCHAND e GWYNNE, 1991).

No entanto é ainda necessário o conhecimento de fatores envolvidos na manipulação genética destes microrganismos, para que sejam atingidos melhores níveis de expressão dos produtos de interesse. Dentre estes fatores estão o desenvolvimento de linhagens

hospedeiras, seja por métodos de melhoramento clássicos ou de engenharia genética; construção de vetores de expressão apropriados e desenvolvimento de sistemas de transformação eficientes para as diferentes linhagens.

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver um sistema de transformação eficiente para uma linhagem de *A. niger* do Laboratório de Genética de Microrganismos Industriais - UNICAMP e o estudo de alguns fatores envolvidos no processo. O gene escolhido foi o *tub-2* de *Neurospora crassa*, que codifica para uma  $\beta$ -tubulina mutante e confere resistência ao fungicida benomil. A escolha baseou-se, principalmente no fato de não ser necessário a introdução de outras mutações auxotróficas na linhagem recipiente.

Outro objetivo específico do trabalho foi a caracterização dos transformantes obtidos, quanto a:

- nível de resistência;
- tipo de evento ocorrido a nível molecular;
- estabilidade mitótica.

## 2 . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1.0 FUNGO *Aspergillus niger*

Segundo RAPER e FENNEL (1965), o fungo *Aspergillus niger* é o organismo tipo do grupo niger, e apresenta conídios pretos, globosos, de aspecto rugoso, com equinulações descontínuas, medindo de 4 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro na maturidade. O conidióforo desta espécie tipo tem duas séries de esterigmas.

O *A. niger* é uma espécie de grande interesse na indústria, por ser boa secretora de proteínas (van BRUNT,1986), além de acumular vários tipos de metabólitos (SMITH e PATEMAN,1977). Outro aspecto importante é a sua classificação como GRAS (Generally Recognized As Safe) pelo Food and Drug Administration, EUA, o que tem estimulado a sua utilização como produtor de proteínas heterólogas (WARD,1989;

Nessa espécie não existe ou não foi evidenciado o ciclo sexual, o que a classifica na subdivisão Deuteromicotina, e a alternativa de análise genética é o ciclo parassexual descrito em *A. nidulans* (PONTECORVO e ROPER,1952). Os trabalhos iniciais de PONTECORVO (1952) e PONTECORVO et al.(1953a), evidenciaram a presença do ciclo parassexual em *A. niger*, que, atualmente, tem constatados 8 grupos de ligação, tanto por análise genética (DEBETS et al.,1990a) como por cariótipo eletroforético (DEBETS et al.,1990b). Além da análise genética formal, o ciclo parassexual foi utilizado no melhoramento de linhagens industriais produtoras de glicoamilase (BALL et al.,1978) e ácido cítrico (BONATELLI JR. e AZEVEDO,1982) entre outros exemplos.

A transformação do *A. niger*, constatada por KELLY e HYNES (1985), abriu a possibilidade de estudos de mecanismos de expressão de vários genes nesta espécie, assim como o melhoramento de linhagens para uso industrial, como foi o caso do aumento na produção de glicoamilase por incremento do número de cópias do gene (FINKELSTEIN et al., 1989). Além disso, alguns genes de *A. niger* vem sendo usados na construção de vetores de expressão de proteínas heterólogas para aumento do nível de expressão (DEVCHAND e GWYNNE, 1991).

## 2.2. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

A Tecnologia do DNA Recombinante só pode ser aplicada totalmente a um grupo de microrganismos, se existe um sistema de transformação genética que permita a introdução e expressão de genes na célula recipiente.

A transformação genética em qualquer microrganismo envolve três passos básicos:

- 1-preparação de células competentes (células capazes de incorporar DNA exógeno);
- 2-indução da incorporação de DNA pelas células competentes;
- 3-aplicação de pressão seletiva às células, de maneira que, somente aquelas que incorporaram o DNA e são capazes de expressá-lo, se desenvolvam.

Em fungos a competência é adquirida, em parte, pela remoção da parede celular, que é uma barreira física à entrada de DNA. As células resultantes são chamadas esferoplastos ou protoplastos e precisam ser

mantidas na presença de alta concentração de sal ou açúcar, que funciona como estabilizador osmótico. A remoção da parede é feita enzimaticamente, por misturas complexas de enzimas, disponíveis comercialmente, tais como:

-Glusulase (extrato enzimático de intestino de moluscos, da Endo Laboratories);

- $\beta$ -glucuronidase (extrato enzimático de intestino de moluscos, da Sigma);

-Novozym 234 (complexo enzimático produzido pelo fungo *Trichoderma harzianum*, da Novo Industries).

No entanto, alguns fungos requerem mais de um tipo de complexo enzimático, de fontes diferentes para terem a parede celular removida (CHAMLYM et al.,1981) ou se tornarem competentes (RAMBOSEK e LEACH,1987).

Para a incorporação de DNA, os protoplastos são tratados com cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) e polietilenoglicol (PEG). Sabe-se que o PEG pode causar a fusão de membranas, e que o DNA precipitado por  $\text{CaCl}_2$  pode ser internalizado durante este processo. Porém, o exato mecanismo de ação destes compostos na transformação não é conhecido.

A seleção dos transformantes depende exclusivamente do gene contido no plasmídeo empregado, e pode ser dividida em dois tipos: o primeiro tipo envolve a complementação de uma mutação auxotrófica, com o respectivo gene do tipo selvagem; o outro tipo de seleção emprega marcadores dominantes e pode ser usado em linhagens do tipo selvagem (RAMBOSEK e LEACH,1987).



Devido a diferenças existentes entre os diversos grupos de organismos e a diferenças entre linhagens ("backgrounds" diferentes), é necessário o desenvolvimento de sistemas de transformação específicos, que sejam eficientes para os fins propostos.

### 2.2.1. Transformação em leveduras

As primeiras clonagens de genes de *Saccharomyces cerevisiae* foram feitas através de complementação de mutantes auxotróficos de *Escherichia coli* (CLARK e CARBON, 1978). Usando um plasmídeo contendo o gene *leu 2*, clonado por essa metodologia, foi possível transformar mutantes *leu<sup>-</sup>* de *S. cerevisiae* (CHINNEN et al., 1978; BEGGS, 1978). O método de transformação foi baseado em protocolos utilizados para plantas e células de mamíferos, e consistiu, basicamente, no tratamento de células sem parede celular (esferoplastos ou protoplastos) com polietilenoglicol na presença de cloreto de cálcio.

A clonagem de genes por complementação em *E. coli*, funcionou para vários genes, mas não teve sucesso para outros, possivelmente pela diferença nas sequências promotoras da bactéria e da levedura (não sendo reconhecida pelas RNA polimerases bacterianas) e, pela incapacidade da *E. coli* de retirar os introns do gene da levedura.

Por esse motivo, a transformação em levedura em alta frequência, permitindo a complementação de mutantes auxotróficos (BEGGS, 1978), representou um grande avanço em direção à clonagem de genes de fungos, o que veio ampliar os conhecimentos gerados pela genética clássica.

## 2.2.2. Transformação em fungos filamentosos

Os primeiros fungos filamentosos onde a transformação genética teve sucesso foram os ascomicetos *Neurospora crassa* e *Aspergillus nidulans* (CASE et al., 1979; BALLANCE et al., 1983).

O protocolo de transformação, seguiu basicamente aqueles desenvolvidos para *S. cerevisiae* (BEGGS et al., 1978; HINNEN et al., 1978), com pequenas variações. A *N. crassa* e o *A. nidulans* tem em comum com *S. cerevisiae* o fato de que seus sistemas genéticos são bem caracterizados através da genética clássica. Após o estabelecimento de metodologia de transformação nestes fungos, ganharam atenção os fungos de interesse industrial e agrícola. Sistemas de transformação para diversos fungos vem sendo desenvolvidos, desde então. Há também um número cada vez maior de vetores disponíveis que tem sido amplamente utilizados para estudos de expressão gênica nos mais variados sistemas genéticos. KELLY e HYNES (1985) foram os primeiros a relatar a transformação do *A. niger*, sendo que foi usado um gene heterólogo, dominante, de *A. nidulans*. Outros exemplos, são os patógenos vegetais, *Glomerella cingulata* (RODRIGUEZ e YODER, 1987) e *Pseudocercospora herpotrichoides* (BLAKEMORE et al., 1989), o *Penicillium chrysogenum* (BULL et al., 1988), a *Podospora anserina* (FERNANDEZ-LARREA e STAHL, 1989), o *Metarhizium anisopliae* (BERNIER et al., 1989; GOETTEL et al., 1990) dentre vários outros.

A alta frequência de transformação (número de transformantes por  $\mu\text{g}$  de DNA ou por número de protoplastos viáveis) é uma característica essencial quando o propósito é a clonagem direta de genes por complementação de mutantes. Em alguns fungos, como *N. crassa* e *A.*

*nidulans* as frequências de transformação são relativamente altas, o que permite o uso da clonagem de genes por complementação direta nestes fungos.

### 2.2.3. Frequências de transformação em *Neurospora crassa*

CASE et al. (1979) desenvolveu o primeiro sistema de transformação para fungos filamentosos, usando o ascomiceto *N. crassa*. Seguindo basicamente os protocolos usados para levedura (CHINNEN et al., 1978; BEGGS, 1978) uma suspensão de conídios de *N. crassa* foi incubada por 4 horas permitindo a germinação destes; em seguida a parede celular foi removida através de tratamento com glucilase (Endo Laboratories). Os esferoplastos resultantes foram tratados com  $\text{CaCl}_2$  50 mM, PEG 4000 40% e DMSO 1 %, na presença do DNA plasmidial. O plasmídio usado, pVK88, contém o gene  $qa-2^+$  de *N. crassa* (que codifica para deidroquinase catabólica) clonado por complementação em *E. coli* no plasmídio pBR322. Foram observados transformantes numa frequência de 5 a 30 transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA. Tais transformantes mostraram portar o DNA plasmidial integrado em mais de um sítio no genoma de *N. crassa*.

Com a finalidade de se aumentar a eficiência de transformação foram feitas modificações no protocolo de CASE et al. (1979) e desta maneira foi possível a clonagem do conjunto de genes envolvidos na produção de ácido quínico, diretamente em *N. crassa* (SCHWEIZER et al., 1981). As principais modificações consistiram no tratamento do DNA plasmidial com heparina e de variações na temperatura e tempo de incubação dos esferoplastos com o DNA.

Também baseado em um protocolo de transformação para leveduras (ITO et al., 1983), DHAWALE et al. (1984) desenvolveram um sistema de transformação rápido e eficiente para *N. crassa*. O plasmídeo usado, pSD10 é um derivado do pVK57 (CASE et al., 1979) e também contém o gene  $qa-2^+$ . Conídios germinantes foram tratados com acetato de lítio 0,1 M e, em seguida, foi adicionado o DNA e uma solução de PEG 4000 a 40%. A frequência de transformação situou-se entre 0,7 e 9 transformantes/ $\mu$ g de DNA.

CASE (1982) relata a ocorrência de frequência de 5000 transformantes/ $\mu$ g de DNA em *N. crassa* usando o gene  $qa-2^+$ . Mas, de acordo com BUXTON e RADFORD (1984), esta diferença pode ser devida à contagem dos chamados transformantes abortivos, os quais não se desenvolvem no primeiro repique em meio seletivo, por terem, possivelmente, uma expressão transitória do gene introduzido.

A fim de otimizar a transformação em *N. crassa*, BUXTON e RADFORD (1984) variaram diversos parâmetros e obtiveram até 100 transformantes/ $\mu$ g de DNA, usando plasmídios contendo o gene  $qa-2^+$  e  $pyr-4^+$ , que codifica para orotidina 5'-fosfato decarboxilase (BUXTON e RADFORD, 1983). O primeiro parâmetro testado foi a obtenção de maior número de protoplastos a partir de micélio digerido com Novozym 234 (Novo Industries). Como era impossível variar todos os parâmetros independentemente, estes eram manipulados até o seu ótimo, e, a partir daí, outro parâmetro era avaliado. Alguns destes parâmetros foram: concentração e volume de DNA adicionado; concentração de heparina e de DMSO; tempos de incubação e meios de regeneração dos protoplastos. A base do protocolo foi o tratamento com solução de PEG 4000 a 40% e

CaCl<sub>2</sub> 50 mM. A heparina foi adicionada ao DNA antes da adição dos protoplastos. As maiores frequências aconteceram na ausência de DMSO.

AKINS E LAMBOWITZ (1985), usando um protocolo de transformação derivado de SCHWEIZER et al.(1981), obtiveram transformantes na frequência de 10.000 a 20.000/ $\mu$ g de DNA, com o plasmídeo pRAL, portador do gene  $\alpha$ -2<sup>+</sup>. Neste método, conídios germinantes foram incubados com Novozym 234 para remoção da parede celular. Aos esferoplastos, ressuspensos em tampão contendo sorbitol com estabilizador osmótico, foram adicionados DMSO e uma solução de PEG 4000 40% e CaCl<sub>2</sub> 50 mM. O DNA plasmidial foi pré-tratado com heparina e adicionado aos esferoplastos. De acordo com os autores, o fator limitante para altas frequências de transformação, é a qualidade da enzima usada para digestão da parede celular. Vários tipos de enzimas foram testados [glusulase (Sigma); Zymolase (Seikagaku Kogio) e Novozym 234]. Um lote específico de Novozym 234 (PPM 1035) foi identificado como o melhor para a produção de células competentes. Com lotes diferentes, a eficiência foi bastante menor (400 a 4000 transformantes/ $\mu$ g de DNA). Este protocolo permitiu o estabelecimento de um método de clonagem para *N. crassa*, por "Sib Selection", que consiste em vários ciclos de transformação, com subdivisões de uma biblioteca genômica.

O primeiro marcador seletivo dominante utilizado em *N. crassa* foi o de resistência ao fungicida benomil (ORBACH et al.,1986). O plasmídeo pBT3 contém um gene mutante para  $\beta$ -tubulina (*tub-2*) de *N. crassa*, clonado no vetor pUC12. As frequências de transformação com este plasmídeo situaram-se em torno de 1.000 transformantes/ $\mu$ g de DNA

e o protocolo usado foi o descrito por SCHWEIZER et al.(1981).

VOLLMER e YANOFSKY (1986) obtiveram frequências de 8.000 a 25.000 transformantes/ $\mu$ g de DNA usando o plasmídeo pBT3 (ORBACH et al.,1986) ou cosmídios também contendo a marca de resistência ao benomil em *N. crassa* . O procedimento adotado se baseou em protocolos descritos anteriormente (CASE et al.,1979) com leves modificações. Os esferoplastos foram obtidos através de digestão de conídios germinantes, com Novozym 234. Com esse método foi possível a clonagem do gene *trp-3* (para triptofano sintetase).

Na Tabela 2.1. estão resumidos os principais trabalhos de transformação feitos com *N. crassa*.

TABELA 2.1 - FREQUÊNCIAS DE TRANSFORMAÇÃO EM *Neurospora crassa*

AUTOR/ANO	FREQUÊNCIA (transf./ $\mu$ g DNA)	GENE/PLASMÍDIO
CASE et al.(1979)	5-30	$qa^{2+}$ (pVK 88)
CASE (1982)	5.000	$qa^{2+}$
DHAWALE et al.(1984)-	0,7-9	$qa^{2+}$ (pSD10)
BUXTON e RADFORD (1984)	10-100	$qa^{2+}$ (pVK57)
		$pyr4^{+}$ (pFB14)
AKINS e LAMBOWITZ (1985)	10.000-50.000	$qa^{2+}$ (pRAL)
VOLLMER e YANOFSKY (1986)	15.000	$tub-2$ (pBT3)
AVALOS et al.(1989)	60-1920	$bar$ (pJA4)
	800-6000	$tub-2$ (pBT3)
ALIC et al.(1990)	50-150	$ade-2^{+}$ (pADE3)

#### 2.2.4. Frequências de transformação em *A. nidulans*

BALLANCE et al.(1983) usando o plasmídio pFB6, contendo o gene *pyr4*<sup>+</sup> de *N. crassa* (BUXTON e RADFORD,1984), obtiveram os primeiros transformantes de *A. nidulans*. A frequência foi de 0,3 a 0,6 transformantes/ $\mu$ g de DNA, similar às obtidas para *S. cerevisiae* e *N. crassa* nos relatos iniciais. Os protoplastos foram obtidos a partir de digestão do micélio com Novozym 234. O estabilizador osmótico usado foi KCl 0,6 M e o tratamento para indução de incorporação de DNA foi feito com  $\text{CaCl}_2$  50 mM e PEG 6000 a 25%.

Usando protocolo semelhante ao de BEGGS et al.(1978), TILBURN et al.(1983) obiveram frequências 5 a 10 vezes maiores que as relatadas anteriormente para *A. nidulans*. No entanto, foi usado neste caso um gene homólogo: *amdS*<sup>+</sup>, que codifica para acetamidase, clonado no plasmídio pBR322. Mutantes para esta enzima, foram capazes de crescer em meio contendo somente acetamida como fonte de nitrogênio, após serem transformados. Os protoplastos foram obtidos usando-se Novozym 234 e helicase (Industrie Chimique Française) na presença de  $\text{MgSO}_4$  1,2 M, como estabilizador osmótico. Foi usada uma solução de PEG 4000 a 25% e  $\text{CaCl}_2$  10 mM.

YELTON et al.(1984) construíram um plasmídio contendo o gene *trpC*<sup>+</sup> de *A. nidulans*, que codifica para fosforibosilantranilato isomerase, e faz parte da via biossintética do triptofano. Este plasmídio foi usado para transformar mutantes auxotróficos para triptofano, desta mesma espécie. Seguindo basicamente um protocolo de transformação de leveduras (HINNEN et al.,1978) os protoplastos, obtidos por digestão de micélio com  $\beta$ -glucuronidase e Novozym 234,



foram tratados com PEG 4000 a 60% e  $\text{CaCl}_2$  10 mM. O estabilizador osmótico usado para regeneração dos protoplastos foi sorbitol 1,2 M. A frequência de transformação foi maior que 20 transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA.

A eficiência de transformação em *A. nidulans* se mostrou maior quando foi incluída no plasmídio pFB6 (BUXTON e RADFORD, 1984), uma sequência cromossomal de *A. nidulans*, denominada *ans1* (BALLANCE e TURNER, 1985). Esta sequência, de 3,8 Kb, foi isolada com base na sua atividade replicativa em *S. cerevisiae*. Apesar de não haver evidência para replicação autônoma em *A. nidulans*, com o uso de *ans1*, parece ser esta sequência a responsável pelo aumento na eficiência de transformação. Com o pFB6, o mesmo plasmídio usado por BALLANCE et al. (1983), foram obtidas frequências de 50 a 150 transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA. Quando, a esse vetor, foi adicionada a sequência *ans1*, a frequência foi de aproximadamente  $5 \times 10^3$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA. O protocolo se diferencia do publicado anteriormente (BALLANCE et al., 1983) em alguns aspectos, principalmente em variações nos volumes das soluções de PEG e no aumento da concentração de ágar no meio de regeneração de protoplastos, de 0,9 para 2 % (o que aumentou em 3 a 4 vezes a frequência de transformação).

O gene que codifica para a subunidade 9 da ATP sintetase de mutantes de *A. nidulans* resistentes à oligomicina, *oliC 31*, foi clonado e usado para transformar linhagens sensíveis (WARD et al., 1986). Um dos plasmídios construídos, pMW2, continha o gene *pyr-4*<sup>+</sup> de *N. crassa* além do gene acima. As frequências de transformação situaram-se entre 10 e 70 transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA, independente do tipo de seleção usado. O método de transformação seguido foi o descrito por BALLANCE e

TURNER (1985). Genes que conferem resistência a drogas não haviam sido usados para transformação de *A. nidulans*. Este tipo de marcador seletivo oferece a vantagem de não ser necessário o uso de mutantes auxotróficos como recipientes na transformação.

Outro gene para resistência a drogas foi empregado para transformar *A. nidulans* (PUNT et al., 1987). O plasmídeo pAN7-1, contém o gene *hph*, que codifica para higromicina B fosfotransferase de *E. coli*, flanqueado pelas sequências promotora do gene *gpd* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e terminadora do *trpC*<sup>+</sup>, de *A. nidulans*. Transformantes resistentes à higromicina apareceram na frequência de 3 a 20/ $\mu$ g de DNA. O método de transformação foi descrito por YELTON et al. (1984).

Vários outros genes de *A. nidulans* foram clonados diretamente por complementação, como o *acu D*, para isocitrato liase (Ballance e Turner, 1986). O gene que confere resistência a selenato foi clonado para uso em transformação de espécies de *Aspergillus* (BUXTON et al., 1989). O gene *sC* codifica para adenosina trifosfato sulfurilase e pôde ser expressado tanto em *A. nidulans* como *A. niger*. As frequências de transformação foram de 200 e 1 transformantes/ $\mu$ g de DNA, respectivamente. O *A. nidulans* foi transformado de acordo com BUXTON et al. (1987).

Recentemente, foi relatada a construção de um vetor contendo o gene *arg B*, que codifica para ornitina carbamoil transferase de *A. nidulans*, e uma sequência de aproximadamente 8 Kb, que funciona como uma estrutura de replicação autônoma, e aumentou em 250 vezes a frequência de transformação em *A. nidulans* (GEMS et al., 1991).

Na tabela 2.2., encontram-se os principais experimentos de transformação com *A. nidulans*.

### 2.2.5. Frequências de transformação em *Aspergillus niger*

Pelo fato das espécies *A. niger* e *A. nidulans* serem consideradas relacionadas, pelos taxonomistas, os primeiros trabalhos de transformação com *A. niger* foram baseados em protocolos descritos para *A. nidulans*, assim como foram utilizados plasmídios contendo genes heterólogos desta mesma espécie.

O plasmídio p3SR2, contendo o gene *amdS*<sup>+</sup> de *A. nidulans* (TILBURN et al., 1983) foi usado para transformar uma linhagem de tipo selvagem de *A. niger* (KELLY e HYNES, 1985). Esta primeira transformação em *A. niger* teve frequências em torno de 3 transformantes/ $\mu$ g de DNA. O protocolo utilizado foi o de TILBURN et al. (1983).

BUXTON et al. (1984) transformaram uma linhagem mutante de *A. niger* com o plasmídio pDG3, derivado do pBB116 (BERSE et al., 1983). Este plasmídio contém o gene *argB*<sup>+</sup> de *A. nidulans*. Cerca de 4 transformantes/ $\mu$ g de DNA apareceram em cada experimento de transformação.

Uma das tentativas de se aumentar a frequência de transformação em *A. niger*, foi feita, usando um sistema de vetor com gene homólogo (GOOSEN et al., 1987). Foi usado o gene *pyr4*<sup>+</sup> de *N. crassa* como sonda, na clonagem do gene *pyrA*<sup>+</sup> de *A. niger*, que também codifica para orotidina 5'-fosfato decarboxilase. O plasmídio resultante, pGW813, foi utilizado para transformar dois diferentes mutantes *pyrA*<sup>-</sup> de *A.*

TABELA 2.2. FREQUÊNCIAS DE TRANSFORMAÇÃO EM *Aspergillus nidulans*

AUTOR/ANO	FREQUÊNCIA transf./ $\mu$ g DNA	GENE/PLASMÍDIO
BALLANCE et al. (1983)	0,3 - 0,8	<i>pyr 4<sup>+</sup></i> (pFB6)
TILBURN et al. (1983)	3,2	<i>amdS<sup>+</sup></i> (p3SR2)
YELTON et al. (1984)	> 20	<i>trpC<sup>+</sup></i> (pHY201)
BALLANCE e TURNER (1986)	50 - 150	<i>pyr 4<sup>+</sup></i> (pFB6)
	8.000	<i>pyr4<sup>+</sup> + ans1</i> (pDJB2)
WARD et al. (1986)	10-70	<i>oliC 31</i> (pMW2 e pMW11)
PUNT et al. (1987)	8 - 20	<i>hph</i> (pAN7-1)
BUXTON et al. (1989)	200	<i>sC<sup>+</sup></i> (pFB 95)
GEMS et al. (1991)	88.000	<i>arg B<sup>+</sup> + AMA 1</i> (ARp1)

*niger*. As frequências de transformação foram consideravelmente maiores que nos relatos anteriores: 30 a 50 e 8 a 10 transformantes/ $\mu$ g de DNA, respectivamente. O protocolo seguido envolve tratamento dos protoplastos com PEG 8000 60% e  $\text{CaCl}_2$  10 mM; o estabilizador osmótico usado foi sorbitol.

O gene para orotidina-5'-fosfato decarboxilase foi também clonado no plasmídeo pUC19, resultando no plasmídeo pAB4-1 (van HARTINGSVELDT et al., 1987). Foi obtida uma frequência de 40 transformantes/ $\mu$ g de DNA, semelhante à relatada por GOOSEN et al. (1987). A metodologia de transformação para *A. niger* foi a mesma usada para *A. nidulans* (YELTON et al., 1984).

O plasmídeo contendo o gene para resistência à higromicina foi usado para transformar *A. niger* (PUNT et al., 1987). Foram obtidas frequências de 5 a 20 transformantes/ $\mu$ g de DNA. As transformações foram feitas de acordo com YELTON et al. (1984).

Tentativas de transformação de *A. niger* com o gene *oliC* 31 de *A. nidulans* (WARD et al., 1986), sugeriram que este gene não poderia ser usado como marcador nesta espécie, já que não foram obtidos transformantes com este gene heterólogo. Os genes que codificam para a subunidade 9 da ATP sintetase de *A. nidulans* e de *N. crassa* foram usados como sonda para a clonagem do gene correspondente, *oliC* 3, de *A. niger* (WARD et al., 1988). A metodologia de transformação descrita por BALLANCE e TURNER (1985) foi seguida, com pequenas modificações. Ácido aurintricarboxílico, um inibidor de nucleases foi adicionado aos protoplastos, antes da adição da solução de PEG. As frequências de transformação foram baixas, até 2 transformantes/ $\mu$ g de DNA. No

entanto, frequência de até 4 transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA foram alcançadas com o mesmo sistema, quando foi usado o método de transformação por eletroporação.

Foi desenvolvido um sistema de transformação baseado na utilização de nitrato, onde se obteve uma frequência de até 100 transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA (UNKLES et al.,1989). O vetor construído, pSTA10, consiste do gene *niaD*<sup>+</sup> de *A. niger*, que codifica para a enzima nitrato redutase, clonado no plasmídeo pUC8. O protocolo de transformação se baseou em métodos desenvolvidos para *A. nidulans* e modificados para *A. niger* (BALLANCE e TURNER,1983; TILBURN et al.,1983; YELTON et al.,1984). As modificações estão nos volumes e concentrações das soluções de PEG e no uso do vetor linearizado por uma enzima de restrição (dando frequências de 50 e 100 transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA com plasmídeo não cortado e linear, respectivamente). Com o mesmo sistema de transformação CAMPBELL et al.(1989) obtiveram até 1.100 transformantes estáveis em *A. niger*. A razão para este grande aumento na frequência não é clara, mas parece ser devida a ligeiras modificações no protocolo anterior, no sentido de melhorar as condições de viabilidade ou competência dos protoplastos, diminuindo o tempo de exposição a enzima Novozym 234 e ao PEG.

A fim de otimizar a expressão gênica e eficiência de transformação em *A. niger*, foi construído um vetor contendo a porção 5' do gene *pcbC* de *Cephalosporium acremonium*, que codifica para isopenicilina N sintetase, flanqueando o gene *hph* de *E.coli* (KUCK et al.,1989). O sistema de transformação mostrou ser altamente eficiente, com as frequências girando em torno de 10.000

transformantes/ $\mu$ g de DNA. Os procedimentos adotados para a transformação foram descritos anteriormente (TILBURN et al., 1983; van HARTINGSVELDT et al., 1987).

Houve um aumento em 25 vezes na frequência de transformação em *A. niger*, com o plasmídeo ARp1, chegando-se a obter 3.400 transformantes/ $\mu$ g de DNA (GEMS et al., 1991). Da mesma maneira que em *A. nidulans*, este plasmídeo não se integra no genoma do *A. niger*.

Um resumo com os principais experimentos de transformação em *A. niger* encontra-se na tabela 2.3..

### 2.3. REPLICAÇÃO AUTÔNOMA X INTEGRAÇÃO DE PLASMÍDIOS, EM FUNGOS FILAMENTOSOS

A transformação em fungos pode envolver a integração do plasmídeo no genoma ou a sua replicação independente do DNA cromossômico.

A maneira mais clara para se evidenciar a forma na qual o plasmídeo se encontra na célula transformada, é através de análises de hibridização por "Southern Blot". A hibridização de DNA não digerido por enzimas de restrição, de células contendo plasmídeo de replicação autônoma, revela a presença de bandas correspondentes a plasmídios superenrolados (ou círculos abertos) de tamanho monomérico. Por outro lado, em análises semelhantes, com DNA de células que contém plasmídios integrados, mostram que eles estão contidos apenas na porção de alto peso molecular, correspondente ao DNA cromossômico. Quando este tipo de análise é feita com DNA digerido com enzimas de

TABELA 2.3. FREQUÊNCIAS DE TRANSFORMAÇÃO EM *Aspergillus niger*

AUTOR/ANO	FREQUÊNCIA transf./ $\mu$ g DNA	GENE/PLASMÍDIO
KELLY e HYNES (1985)	> 3	<i>amdS</i> <sup>+</sup> (p3SR2)
BUXTON et al. (1985)	0,8 - 4	<i>argB</i> <sup>+</sup> (pDG1 e pDG3)
GOOSEN et al. (1987)	50	<i>pyrA</i> <sup>+</sup> (pGW613)
PUNT et al. (1987)	5 - 20	<i>hph</i> (pAN7-1)
vanHARTINGSVELDT (1987)	4 - 100	<i>pyr G</i> <sup>+</sup> (pAB4-1)
WARD et al. (1988)	< 2	<i>oli C3</i> (pab 1)
UNKLES et al. (1989)	7 - 108	<i>niaD</i> <sup>+</sup> (pSTA10)
CAMPBELL et al. (1989)	1.178	<i>niaD</i> <sup>+</sup> (pSTA10)
KÜCK et al. (1989)	10.000	<i>hph</i> + sequências de <i>pcb C</i> (pMW 1)
BUXTON et al. (1989)	0,4	<i>sC</i> <sup>+</sup> (pFB 95)
GEMS et al. (1991)	1.700 - 3.400	<i>argB</i> <sup>+</sup> + <i>AMA1</i> (ARp1)



restrição, que tem apenas um sítio de clivagem no plasmídio, é revelada a presença de uma banda que tem o tamanho do plasmídio original, no caso de plasmídio de replicação autônoma. Para transformantes que contém o plasmídio integrado, o número e o tamanho das bandas reveladas depende dos sítios de clivagem de sequências adjacentes ao plasmídio no DNA cromossomal, resultando em múltiplas bandas. Se o plasmídio se integrou de forma repetitiva ("in tandem") poderá ser observada a presença de uma banda correspondente ao tamanho do plasmídio original (revisão em RAMBOSEK e LEACH,1987).

Em fungos filamentosos, no entanto, a transformação ocorre por integração, com raras exceções de replicação autônoma em *Podospora anserina* e *Neurospora crassa* (TUDZYNSKY et al.,1980; STOHL e LAMBOWITZ, 1983) e em algumas espécies de *Aspergillus*, segundo o recente relato de GEMS et al.(1991). A integração pode se fazer em sítios homólogos ou heterólogos. De acordo com modelo desenvolvido para leveduras (HINNEN et al.,1978) são três os tipos de eventos envolvidos na integração de DNA em fungos filamentosos:

Tipo I - integração do vetor em um locus homólogo através de um evento de recombinação simples. A ocorrência de múltiplas cópias do plasmídio podem ser resultado de recombinação antes ou depois da integração.

Tipo II - integração do vetor em sítios de fraca homologia ao acaso, através de um evento de recombinação simples. As recombinações que ocorrem dentro de um gene podem levar à sua inativação.

Tipo III - integração no locus homólogo através de uma dupla recombinação, resultando em uma conversão gênica. Neste caso, as sequências bacterianas do plasmídio não são detectadas.

Em *A. niger* a transformação se dá quase que exclusivamente por integração. Há um exemplo de um plasmídeo com replicação autônoma (RAMBOSEK e LEACH,1987), em que existem dúvidas se esses transformantes não passariam de algo relacionado com transformantes abortivos. Ao contrário, GEMS et al.(1991), comprovaram a replicação autônoma do plasmídeo ARp1 em *A. niger*, através de hibridizações por "Southern Blots" e mostrou também que os transformantes são bastante instáveis.

Análises de transformantes de *A. niger* revelam que a integração nesta espécie não requer extensa homologia (KELLY e HYNES,1985; BUXTON et al.,1985; KUCK et al.,1989). Por este motivo sítios múltiplos de integração são comuns em *A. niger*.

Foram também feitas, análises de transformantes de *A. niger* contendo plasmídios com extensa homologia (RAMBOSEK e LEACH,1987; GOOSEN et al.,1987; van HARTINGSVELDT et al.,1987; WARD et al.,1988; UNKLES et al.,1989). Com exceção de um plasmídeo contendo os genes para  $\beta$ -tubulina e para glucoamilase de *A. niger*, onde os três tipos de integração ocorreram, com prevalência para o tipo I (RAMBOSEK e LEACH,1987), todas as outras análises demonstram integração preferencial no locus do gene residente.

Existe uma tendência para integração de múltiplas cópias dos plasmídios "in tandem" no genoma de *A. niger*. KELLY e HYNES (1985) relatam a ocorrência de mais de 100 cópias do gene *amdS*<sup>+</sup> em um mesmo locus e BUXTON et al.(1985) também relatam a presença de grande número de cópias do gene *argB*<sup>+</sup> em transformantes de *A. niger*.

#### 2.4. $\beta$ -TUBULINAS E RESISTÊNCIA AO BENOMIL

BORCK E BRAYMER (1974) mostraram em estudos com *N. crassa* que a resistência ao fungicida benomil é dominante em heterocários formados entre linhagens resistentes e de tipo selvagem. Em *N. crassa*, e em outros fungos como *A. nidulans*, *Schizosaccharomyces pombe* e *S. cerevisiae*, muitas mutações conferindo resistência ao benomil mapearam nos genes estruturais da  $\beta$ -tubulina (ORBACH et al., 1986).

O benomil é um composto da classe dos benzimidazóis, os quais, por sua ação anti-microtúbulos, em várias espécies, tem aplicação na agricultura, medicina e veterinária. Estudos genéticos e bioquímicos mostraram que a aplicabilidade do benomil é decorrente do fato de que há inibição da função dos microtúbulos do fungo, sem alteração significativa no organismo hospedeiro (JUNG e OAKLEY, 1990).

ORBACH et al. (1986) demonstraram que a mudança de um único par de base na sequência de nucleotídeos do gene para  $\beta$ -tubulina de *N. crassa*, resultando em na troca de fenilalanina por tirosina na posição 167 da proteína, foi responsável pela resistência ao benomil. O sequenciamento de um gene para  $\beta$ -tubulina de um mutante resistente ao benomil de *A. flavus*, indicou a presença de também uma tirosina na posição 167 da molécula (SEP et al., 1990). Mudanças na região codificadora do aminoácido 165 de uma  $\beta$ -tubulina de *A. nidulans* causaram maior sensibilidade ao benomil e resistência ao tiobendazol (um benzimidazol) em dois diferentes mutantes. Este fato parece indicar que esta porção da molécula de  $\beta$ -tubulina está envolvida com a interação o grupo R2 dos compostos benzimidazólicos (JUNG e

OAKLEY,1990).

O *A.nidulans* possui múltiplos genes para  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulinas (WEATHERBEE et al.,1984). Os genes *benA* e *tubC* que codificam para duas  $\beta$ -tubulinas com funções diferentes, divergem em tamanho e em número e posição dos introns. Os polipeptídeos codificados diferem em 78 aminoácidos (MAY et al.,1987).

Genes mutantes de  $\beta$ -tubulina que conferem resistência ao benomil em *N. crassa*, *A. niger*, *A. flavus* e *A.nidulans* foram clonados (ORBACH et al.,1986; RAMBOSEK e LEACH, 1987; SEIP et al.,1990; JUNG e OAKLEY, não publicado) e foram usados como marcadores dominantes para seleção, na transformação de vários fungos filamentosos.

O plasmídeo pBT6,contendo o gene *tub-2*, que confere resistência ao benomil de *N. crassa* foi usado na transformação de *Gaeumannomyces graminis* e *Podospora anserina*, com a frequência até 5 transformantes/ $\mu$ g de DNA nas duas espécies (HENSON et al.,1988; FERNANDEZ-LARREA e STAHL,1989). O nível de resistência dos transformantes de *G.graminis* é bem próximo do limite de sensibilidade da linhagem recipiente, enquanto que,em *P. anserina* foram detectados vários níveis de resistência. O choque térmico durante a transformação de *P.anserina* com o gene *tub-2*, aumentou a frequência para 14 transformantes/ $\mu$ g de DNA (BERGÈS e BARREAU, 1989). *Metarhizium anisopliae* foi transformado com este mesmo gene com uma frequência de 4 transformantes por 50  $\mu$ g de DNA; 3  $\mu$ g de benomil/ml era o limite de resistência na linhagem recipiente e nos transformantes este variou de 5 a 10  $\mu$ g/ml (BERNIER et al.,1989). A mesma linhagem de *M. anisopliae* foi transformada com o gene *benA3* de *A.nidulans* que é o correspondente

ao *tub-2* de *N. crassa* (GOETTEL et al.,1990). A frequência foi de 9 transformantes por 50 µg de DNA e estes cresceram em concentrações de benomil cerca de 10 vezes maiores que o tipo selvagem.

O gene *tub-2* foi usado em experimentos de co-transformação em *Septoria nodorum* com frequência similar ao do gene selecionado; a faixa de resistência dos transformantes foi bastante estreita ao contrário do que é observado em mutantes resistentes ao benomil (COOLEY et al.,1990).

## 2.5. NUCLEASES E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

As enzimas com atividade nucleolítica desempenham diversos papéis biológicos. As funções variam entre nutricional, como as enzimas pancreáticas; de proteção, como as enzimas de restrição ou podem estar envolvidas em processos de reparo, recombinação e transporte de DNA.

As nucleases podem representar um grande inconveniente em técnicas de manipulação genética. Na transformação genética a eficiência pode diminuir se houver algum tipo de nuclease que degrade o DNA a ser introduzido na célula.

MINK et al.(1990) relatam o aumento na frequência de transformação em *S. cerevisiae* e *A. nidulans*, quando os protoplastos foram obtidos através de um complexo enzimático livre de endonucleases.

DEKEYSER et al.(1990) observaram a influência de nucleases em

experimentos de manipulação genética em arroz. Com o intuito de obter a expressão transitória de genes em tecidos vegetais, um vetor foi introduzido no tecido da base de folhas de plântulas de arroz, através de eletroporação. Eles tiveram a expressão do gene introduzido aumentada em 25 vezes quando a adição do vetor foi feita após uma série de lavagens do tecido, com o tampão de eletroporação. Este fenômeno de liberação de nucleases de bases de folhas também foi observado em experimentos com cevada (GALSTON et al.,1979).

*Serratia marcescens* é uma enterobactéria que secreta uma potente nuclease além de outras enzimas (JEFFRIES,1957). PALOMAR et al. (1990) tentaram relacionar a baixa eficiência de transformação nesta bactéria com o efeito desta nuclease. No entanto, através de transformação de um mutante deficiente para a nuclease e de uma linhagem de *E. coli* contendo o gene para a referida enzima, foi visto que a causa da baixa eficiência de transformação em *S. marcescens* deve estar relacionada com outros fatores, que não a produção de nucleases extracelulares.

Vários compostos inibidores de nucleases vem sendo usados, visando aumentar a frequência de transformação em vários grupos. Em fungos filamentosos foram usados heparina (SCHWEIZER et al.,1981), espermina e espermidina (AKINS e LAMBOWITZ,1985), ácido aurintricarboxílico (WARD et al.,1988). Alguns destes compostos aumentaram em até 5 vezes a frequência de transformação (WARD et al.,1988).

A espermidina foi usada na eletroporação de arroz, aumentando em 3 vezes a expressão do gene introduzido (DEKEYSER et al.,1990). O uso de protamina e cloroquina difosfato, na transformação de células de

animais, aumentou a eficiência do processo (WIENHUES et al. 1987; LUTHMAN e MAGNUSSON,1983), porém não teve efeitos em tecidos de arroz (DEKEYSER et al.,1990).

### 3 . MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. LINHAGENS UTILIZADAS

##### 3.1.1. *Aspergillus niger*

-lgp 73 - (*pabA*<sub>1</sub>, *nicA*<sub>1</sub>, *olvA*<sub>3</sub>, *lgpB*<sub>73</sub>) - deficiente para a síntese de ácido p-aminobenzóico e ácido nicotínico; produz confídios verde-oliva e tem menor produção de glicoamilase (VALENT,1985).

-350 - linhagem do tipo selvagem (cedida por M. Devchand, Allelix Inc., Canadá).

##### 3.1.2. *Aspergillus nidulans*

-T580 - (*pyrG*) - deficiente para síntese de uridina (cedida por M. Devchand, Allelix Inc., Canadá).

-*biA*<sub>1</sub> *methG*<sub>1</sub> - (*biA*<sub>1</sub> *methG*<sub>1</sub>) - deficiente para a síntese de biotina e metionina (Laboratório de Genética de Microrganismos - UNICAMP).

##### 3.1.3. *Escherichia coli*

DH1 (F<sup>-</sup>, *endA*<sub>1</sub>, *hsdR*<sub>17</sub> (*r*<sub>k</sub><sup>-</sup>, *m*<sub>k</sub><sup>+</sup>), *supE*<sub>44</sub>, *thi*-1, λ<sup>-</sup>, *recA*<sub>1</sub>, *gyrA*<sub>96</sub>, HANAHAN,1983)



### 3.2. MEIOS DE CULTURA PARA *Aspergillus*

#### 3.2.1. Meio Mínimo- MM - (PONTECORVO et al., 1953b)

Nitrato de sódio-----	6,00 g
Cloreto de potássio-----	0,52 g
Sulfato de magnésio-----	0,52 g
Fosfato dihidrogenado de potássio-----	1,52 g
Sulfato de ferro-----	traços
Sulfato de zinco-----	traços
Glicose-----	10,00 g
Água destilada-----	q. s. p. 1 l
Ágar*-----	15,00 g

O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH 1 N.

\* Em todos os plaqueamentos "pour plate" , foi usado o ágar da Merck, que tem o ponto de solidificação em torno de 25°C.

#### 3.2.2. Meio Completo - MC - (PONTECORVO et al., 1953b, modificado de acordo com AZEVEDO e COSTA, 1973).

A 1 litro de meio mínimo, acrescentar:

Peptona-----	2,00 g
Caseína hidrolisada-----	1,50 g
Extrato de levedura-----	0,50 g
Solução de vitaminas**-----	1,00 ml

O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH 1 N.

\*\* A solução de vitaminas está descrita no item 3.2.4.

### 3.2.3. Meio Completo Simplificado - MCS- (HAMLYM et al.,1981)

Acrescentar a 1 l de meio mínimo, com exceção do ágar:

Caseína hidrolisada-----	2,00 g
Extrato de levedura-----	5,00 g

Foram adicionados os requerimentos nutricionais da linhagem em estudo, numa concentração final de 5 µg/ml, a partir das soluções estoque.

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

### 3.2.4. Solução de vitaminas

Biotina -----	0,2 mg
Ácido p-aminobenzóico-----	10,0 mg
Tiamina-----	10,0 mg
Piridoxina-----	50,0 mg
Ácido nicotínico-----	100,0 mg
Riboflavina-----	100,0 mg
Água destilada-----	q. s. p. 100 ml

Esterilizar por tindalização (3 dias a 60°C).

## 3.3. MEIOS DE CULTURA PARA *Escherichia coli*

### 3.3.1. Meio LB (SAMBROOK et al.,1989)

Peptona-----	10,00 g
Extrato de levedura-----	5,00 g
Cloreto de sódio-----	10,00 g

Água destilada-----q.s.p. 1 l

Quando meio sólido é desejado, acrescentar 15,00 g de ágar.

O pH foi ajustado para 7,5 com NaOH.

### 3.4. ESTERILIZAÇÃO

Todos os meios e soluções foram esterilizados através de autoclavagem, a 121°C e 1 atm., durante 15 min., a menos que seja mencionado de outra maneira.

### 3.5. TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO DAS LINHAGENS

*A. niger*-----30°C

*A. nidulans*-----37°C

*E. coli*-----37°C

### 3.6. TESTE DE SENSIBILIDADE AO BENOMIL

#### 3.6.1. Soluções de benomil

##### 3.6.1.1. Solução aquosa

O produto usado foi o benlate, que é o preparado comercial contendo benomil (Metil- 1 (butil-carbamoil) - 2-benzimidazole - carbamato) e veículo, na proporção de 1:1. Por ser pouco solúvel em água (2 ppm), para se fazer a solução aquosa, o pó (60 mg) foi dissolvido em acetona (1% do volume total) e em seguida, 100 ml de água destilada esterilizada foram adicionados. A concentração final de benomil na solução estoque foi de 300 µg/ml

### 3.6.1.2. Solução etanólica

A solubilidade do benlate em etanol é de 0,4 % a 25 °C, não sendo necessário a adição de acetona ao pó, para a dissolução inicial da substância. Assim, 30 mg de benlate foram diretamente adicionados a 100 ml de etanol absoluto, resultando na concentração final de 150 µg/ml. As soluções foram estocadas a 4°C.

### 3.6.2. Inoculação por ponto

-6 placas com concentrações variando entre 0 e 25 µg de benomil/ml de MC foram inoculadas com a linhagem lgp 73.

### 3.6.3. Plaqueamento "pour plate" de conídios e protoplastos

-200 ou  $10^6$  conídios (ressuspendidos em Tween 80 0,1%) foram inoculados em MC contendo de 0 a 5 µg/ml de benomil.

-As mesmas concentrações de benomil foram usadas para o inóculo de cerca de  $10^5$  protoplastos (preparados segundo o item 3.7.4.), em MC contendo KCl 0,8 M.

## 3.7. TRANSFORMAÇÃO

3.7.1. Descrição do plasmídeo utilizado - pBT6 (derivado de ORBACH et al., 1986)

Este plasmídeo, de 5,8 Kb, contém o gene *tub-2*, que codifica para uma  $\beta$ -tubulina da linhagem *Bml511* de *Neurospora crassa* e confere resistência ao fungicida benomil, em um fragmento de 3,1 Kb, clonado

vetor pUC12 de *E. coli*, e apresenta um sítio adicional para *Bgl* II, na região do "polylinker" que o diferencia do plasmídeo original, pBT3. (Ver mapa de restrição na figura 3.1.)

### 3.7.2. Transformação de *E. coli* (CHUNG et al., 1989)

1-Células de *E. coli* foram incubadas a 37°C com agitação (225 rpm) em meio LB até que a densidade óptica a 600 nm estivesse entre 0,3 e 0,4.

2-Adicionou-se um vol. de TSS 2X gelado [TSS consiste em meio LB, acrescentado de PEG (3350 ou 8000) 10 %; DMSO 5 %; MgSO<sub>4</sub> (ou MgCl<sub>2</sub>) 20-50 mM pH 6,5].

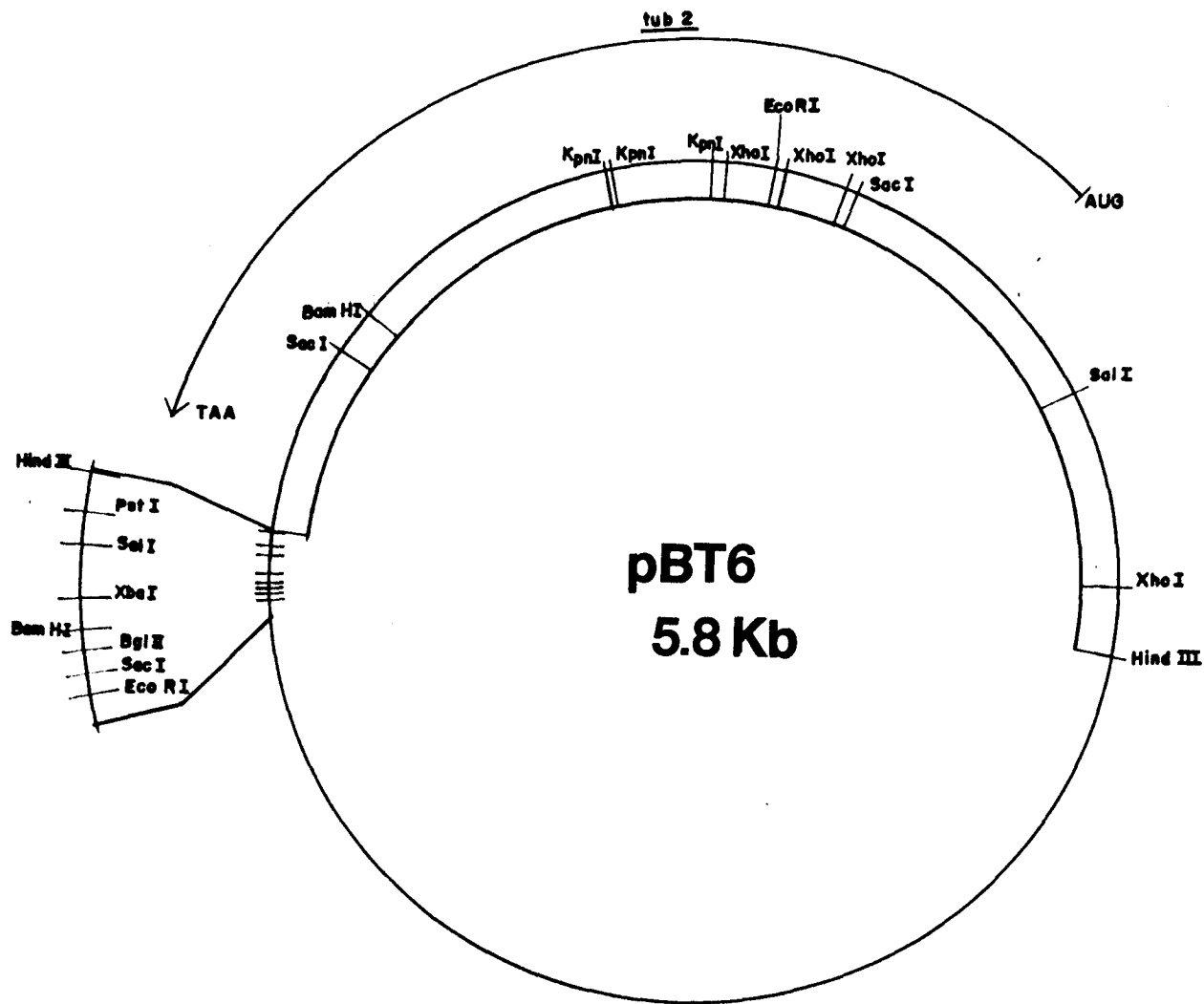
3-Retirou-se uma alíquota de 100 µl da suspensão de células e acrescentou-se a um tubo de polipropileno contendo 100 pg de DNA plasmidial, em 1 µl de TE (Tris-Cl 100 mM; EDTA 1 mM).

4-Misturou-se suavemente a suspensão de células/DNA e incubou-se de 5 a 60 min. a 4°C.

5-Adicionou-se 0,9 ml de TSS (ou meio LB) contendo glicose, na concentração de 20 mM, e incubou-se a 37°C por 1 hora, com agitação (225 rpm).

6-Selecionou-se os transformantes através de plaqueamento em ágar L contendo de 50 a 100 µg de ampicilina/ml.

7-Colônias isoladas foram testadas para presença do plasmídeo, através de Mini-Prep (item 3.7.3.).



— pUC 12  
 = DNA de *N. crassa*

Figura 3.1 - Mapa de Restrição do plasmídeo pBT6

### 3.7.3. Extração de plasmídios

#### 3.7.3.1. Soluções

<u>Solução I</u>	<u>Solução II</u>	<u>Solução III</u>
Tris-Cl 25 mM pH 8	NaOH 0,2 N	Acetato de
EDTA 10 mM	SDS 1 %	Potássio 3 M
Glicose 50 mM		pH 4.8

#### 3.7.3.2. Mini-preparação de plasmídios (Mini-Prep)

Foi utilizado o método de lise alcalina descrita por ISH-HOROWICZ e BURKE (1981):

1-Uma colônia de *E. coli*, após ter sido transformada segundo o item 3.7.2., foi crescida por 18 hs. em 2 ml de meio LB contendo 50 a 100 µg de ampicilina/ml.

2-Um ml da cultura foi centrifugado em microcentrífuga (13.000 g) por 15 seg..

3-Depois a remoção de todo o sobrenadante, o "pellet" de bactérias foi ressuscitado em 100 µl de solução I, e misturado com a ajuda de um Vortex.

4-Foram adicionados 200 µl da solução II. Misturou-se como no item anterior e o tubo foi mantido em banho de gelo por 5 min..

5-Adicionou-se 150 µl da solução III, previamente resfriada a 4°C. Após misturar, o tubo foi novamente mantido em banho de gelo.

6-Centrifugou-se em microcentrifuga (13.000 rpm) por 90 seg..

7-0 sobrenadante foi transferido para novo tubo, e em seguida adicionou-se, 2 volumes de etanol absoluto, e o tubo foi mantido à temperatura ambiente, por 2 min..

9-Centrifugou-se por 90 seg. em microcentrifuga.

10-0 sobrenadante foi retirado completamente e foi lavado uma vez com 500  $\mu$ l de etanol 70% (60 seg. a 13.000 rpm).

11-0 etanol foi removido cuidadosamente e secou-se o "pellet" de DNA a 37°C por 1 h ou a vácuo por 2 min..

12-0 DNA foi ressuscitado em 20  $\mu$ l de TE pH 8.

13-0 DNA foi submetido a digestão com enzimas de restrição e eletroforese, de acordo com os itens 3.9. e 3.10., respectivamente.

### 3.7.3.3. Preparação de plasmídios em larga escala

Foi utilizado o método de lise alcalina descrita em SAMBROOK et al. (1989).

1-Inoculou-se 500 ml de meio LB com 5 ml de uma cultura recente de células de *E. coli* transformadas, contendo de 50 a 100  $\mu$ g de ampicilina/ml. Incubou-se por 18 horas a 37°C, com forte agitação, (300 rpm).

2-Centrifugou-se por 5 min. a 7.000 rpm em rotor Beckman JA-20 (ou similar), a 4°C.

3-Ressuspendeu-se o "pellet" em 5 ml da solução I. Adicionou-se



10 mg de lisozima e incubou-se por 30 min., em banho de gelo.

4-Adicionou-se 10 ml da solução II e misturou-se lentamente por inversão. Incubou-se por 5 min., em banho de gelo.

5-Adicionou-se 7,5 ml de solução III. Incubou-se de 30 min. a 1 hora em banho de gelo.

6-Centrifugou-se a 15.000 rpm em rotor Beckman JA-14 (ou similar), por 40 min., a 4°C.

7-O sobrenadante foi removido, e a ele adicionou-se 1 volume de isopropanol ou dois volumes de etanol. Incubou-se a -20°C por 1 hora.

8-Centrifugou-se a 10.000 rpm por 10 min. a 4°C.

9-Ressuspendeu-se o "pellet" em 5 ml de TE pH 8 e centrifugou-se a 5.000 rpm por 5 min..

10-Purificou-se em gradiente de cloreto de cézio (CsCl), conforme o que se segue:

a-adicionou-se 1 g de CsCl para cada ml de solução. Adicionou-se 800 µl de uma solução de brometo de etídio 10 mg/ml, para cada 10 ml. É recomendado uma centrifugação prévia da solução (4.000 rpm, por 10 min.) antes da transferência para tubo de ultracentrifugação.

b-centrifugou-se em rotor vT180 a 80.000 rpm por 20 hs. a 20°C.

c-coletou-se a banda inferior com seringa adaptada a agulha de grosso calibre (40 X 1,2 mm).

d-removeu-se o brometo de etídio com um volume de álcool isoamílico, por tantas vezes quanto fosse necessário, até que ambas as fases estivessem claras.

e-dialisou-se contra 1 l de TE por 24 hs. (com 2 trocas) a 4°C ou diluiu-se com 3 volumes de água, seguindo-se de precipitação com 2 volumes de etanol.

f-recuperou-se o "pellet" de DNA, como no item 8, e depois de seco este foi ressuspendido em 100 µl de TE. Quantificou-se o DNA plasmidial através de espectrofotômetro, a 260 nm.

#### 3.7.4. Transformação de *A. niger*

Foi utilizado essencialmente o protocolo de BALLANCE et al. (1983) com modificações descritas a seguir:

1-Foram inoculados diretamente no meio MCS, cerca de 10<sup>9</sup> conídios, obtidos de uma placa de Petri, incubada por 7 dias.

2-O micélio, obtido após 16 horas de incubação, com agitação de 180 rpm, foi filtrado em papel de filtro (Whatman 1) e lavado 2 vezes com KCl 0,6 M (preparado em tampão fosfato 0,2 M, pH 5,8).

3-Cerca de 400 mg de micélio foram ressuspendidas em 10 ml da mesma solução, contendo 2,5 mg/ml de Novozym 234 (Novo Industries-Lote PPM 1523) e de Celulase CP (John and E. Sturge Ltd.).

4-A digestão da parede celular ocorreu em um período de 1 a 3 horas a 30°C, sob agitação suave (40 rpm) e a produção de protoplastos

era monitorada ao microscópio, em intervalos de tempo, de aproximadamente 40 min..

5-Centrifugou-se por 15 a 20 seg. a 500 rpm na centrífuga Excelsa Baby ou filtrou-se a solução por uma tela de nylon (100  $\mu$ m), para remoção dos restos de micélio.

6-Centrifugou-se o sobrenadante por 10 min. a 2.000 rpm, para obtenção do "pellet" de protoplastos.

7-Lavou-se o "pellet" duas vezes com KCl 0,6 M e uma vez com "KCa" (KCl 0,6 M; CaCl<sub>2</sub> 50 mM). As centrifugações foram realizadas da mesma maneira descrita no item anterior.

8-Os protoplastos foram contados em hematímetro e ressuspensos em "KCa", de maneira que, 200  $\mu$ l contivessem, no mínimo, 10<sup>6</sup> protoplastos.

9-A 200  $\mu$ l da suspensão, adicionou-se de 3 a 10  $\mu$ g do DNA plasmidial (em no máximo 20  $\mu$ l de TE ). Em uma preparação controle, o DNA plasmidial foi substituído por igual volume de TE .

10-Acrescentou-se 50  $\mu$ l de "PCT" (PEG 8000 25%; CaCl<sub>2</sub> 50 mM; Tris-Cl 10 mM, pH 7,5) vagarosamente. Conservou-se em gelo por 20 min..

11-Adicionou-se 2 ml de "PCT" bem lentamente. Incubou-se por 5 min. à temperatura ambiente.

12-Diluiu-se com 4 ml de "KCa" e o tubo foi mantido em gelo, até

o momento de plaquear.

13-Plaqueou-se em, no mínimo, 2 placas de MC + KCl 0,8 M. O agente seletivo, benomil foi adicionado somente à camada inferior do meio (dobro da concentração seletiva).

14-Incubou-se a 30°C. Os transformantes puderam ser observados dentro de 48 a 96 horas.

15-Foram feitos plaqueamentos de diluições da preparação de protoplastos em meios com e sem estabilizador osmótico (KCl 1,2 M, em geral), para contagem de protoplastos viáveis.

3.7.5. Modificações testadas ao longo do trabalho em experimentos separados:

1-uso de PEG 4000 ao invés de PEG 6000.

2-diminuição na concentração de  $\text{CaCl}_2$  de 50 para 10 mM.

3-uso das seguintes soluções ao invés de "PCT":

Solução 1

PEG 4000 50 ou 10 %; DMSO 5%;  $\text{CaCl}_2$  50 mM; Tris-Cl 10 mM pH 7,5.

Solução 2

PEG 4000 10 %; DMSO 5%;  $\text{MnCl}_2$  45 mM;  $\text{CaCl}_2$  10 mM; Tris-Cl 10 mM pH 7,5.

Solução 3

PEG 4000 10 %;  $\text{CaCl}_2$  10 mM;  $\text{MnCl}_2$  45 mM;  $\text{HACoCl}_3$  3 mM; RbCl 100 mM; K-MES 10 mM pH 8,2.

Estas soluções foram adaptadas de protocolo de transformação para *E. coli*, e foram utilizadas para substituir o "PCT", baseado na sua capacidade de aumento de eficiência de transformação nesta bactéria.

4-Substituição de "KCa" por STC (Sorbitol 1,2 M; Tris-Cl 10 mM  
pH 7,5; CaCl<sub>2</sub> 50 mM)

5-Usos de novos lotes das enzimas Novozym 234 (Lysing  
Enzymes, Sigma, lote 89F1017) e celulase de *Trichoderma harzianum*  
(Sigma).

### 3.8. TESTE DO NÍVEL DE RESISTÊNCIA DOS TRANSFORMANTES AO BENOMIL NA PRESENÇA DE DIFERENTES ESTABILIZADORES OSMÓTICOS

#### 3.8.1. Plaqueamento de protoplastos

-10<sup>4</sup> protoplastos da linhagem lgp 73 foram plaqueados na  
presença de 0,0; 0,50; 0,75; 1,00 µg de benomil/ml de MC, contendo os  
seguintes estabilizadores osmóticos:

-KCl 0,6 M em tampão fosfato 0,01 M pH 5,8

-KCl 0,6 M em tampão fosfato 0,2 M pH 5,8

-Sorbitol 0,6 M pH 5,5

-Sorbitol 1,2 M pH 5,5

As placas foram incubadas por 48 hs..

#### 3.8.2. Inoculação por ponto

-Foram feitas inoculações por ponto da linhagem lgp73 e de  
linhagens transformadas com pBT6, com as mesmas concentrações de  
benomil e estabilizadores osmóticos citados no item 3.8.1..

As placas foram incubadas por 4 dias.

### 3.9. DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Toda digestão de restrição foi feita de acordo com as instruções dos fabricantes.

-Para o plasmídeo pBT8, foram usadas cerca de 2  $\mu\text{g}$  de DNA em cada reação. As enzimas utilizadas foram *Pst* I, que lineariza o plasmídeo, e *Hind* III, que corta o plasmídeo em dois sítios ( ver figura 3.1.).

-Para digestão de DNA cromossômico, foram usadas cerca de 20  $\mu\text{g}$  de cada amostra, e a enzima usada foi *Pst* I.

Em ambos os casos, as reações foram feitas na presença de excesso de enzima, ou seja, mais que 1 U/ $\mu\text{g}$  de DNA.

### 3.10. ELETROFORESE

O tampão de eletroforese usado foi o TAE, que consiste em:

-Tris 40 mM

-Acetato de Sódio 5 mM

-EDTA 1 mM

pH 7,6

A concentração dos géis variou de 0,8 a 1,0 % de agarose, e o brometo de etídio era adicionado ao próprio gel, antes da eletroforese, na concentração de 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

A voltagem variou de 0,3 a 1 V/cm, de uma eletroforese para outra.

### 3.11. ANÁLISE DE TRANSFORMANTES ATRAVÉS DE HIBRIDIZAÇÃO POR "SOUTHERN BLOT"

#### 3.11.1. Extração de DNA dos transformantes

-Linhagens analisadas:

-lgp 73, t11, t12, t13, t14, t291, t42, t43, t44, t45.

3.11.1.1. A princípio foi utilizado o protocolo descrito por RAEDER e BRODA (1985), que tem rendimento menor que 10 µg de DNA:

1- O micélio, crescido por 4 dias em MCS, sem agitação, foi liofilizado.

2- Em tubo tipo eppendorf foram colocadas 50 mg de micélio e 500 µl de tampão de extração (Tris-Cl 200 mM pH 8,5; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0,5 %).

3- Ao homogeneizado, acrescentou-se 350 µl de fenol (equilibrado com tampão de extração).

4- Após homogeneizar, acrescentou-se 150 µl de clorofórmio.

5- Centrifugou-se em microcentrífuga (13.000 rpm) por 1 hora.

6- Transferiu-se a fase aquosa para tubo contendo 25 µl de RNAase (20 mg/ml, preparada em tampão Tris-Cl 10 mM pH 7,5; NaCl 15 mM e fervida por 10 min.). Incubou-se a 37°C por 5 a 10 min.

7- Extraiu-se com 1 volume de clorofórmio e centrifugou-se por 10 min..

8-A fase aquosa foi transferida cuidadosamente para novo tubo e precipitou-se o DNA com 0,54 volume de isopropanol. O tubo foi mantido à temperatura ambiente por 15 min..

9-Centrifugou-se por 90 segs. e o sobrenadante foi descartado.

10-O "pellet" de DNA foi lavado 1 X com etanol 70%.

11-Depois de seco a 37°C, o DNA foi ressuspendido em 100 µl de TE pH 8.

3.11.1.2. O segundo protocolo usado permitiu o uso de maior quantidade de micélio (>1 g), aumentando o rendimento de DNA. É uma adaptação de protocolo para extração de DNA de células de mamíferos, descrito em SAMBROOK et al.(1989).

1- O micélio, crescido por 2 dias sob agitação (180 rpm), foi recolhido por filtração e macerado na presença de N<sub>2</sub> líquido, com gral e pistilo.

2-O pó resultante foi, aos poucos, adicionado a 15 ml de tampão de extração (Tris-Cl 10 mM pH 8; EDTA 100 mM; RNAase 20 µg/ml; SDS 0,5 %). Incubou-se a 37°C por 1 hora.

3-Adicionou-se proteinase K (100 µg/ml). Incubou-se a 50°C por 2 a 3 horas.

4-Foram feitas duas extrações com fenol (equilibrado com Tris-Cl 1 M pH 8) e uma com clorofórmio.

5-Adicionou-se 1/10 do volume de NaCl 5 M e precipitou-se o DNA com 2 volumes de etanol, por 18 horas, a -20°C.



6-Depois de centrifugar-se por 5 min. a 5000 g, o sobrenadante foi descartado e o "pellet" de DNA foi lavado com etanol 70%.

7-O DNA foi ressuspendido em 1 ml de TE pH 8 e quantificado através de espectrofotômetro a 260 nm.

### 3.11.2. Hibridização por "Southern Blot"

#### 3.11.2.1. Transferência do DNA para membranas de nylon

1-Cerca de 5 a 10 µg de DNA, intacto ou digerido com *Pst* I, das linhagens citadas no item 3.11.1., foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%. Em seguida, este foi mergulhado nas seguintes soluções, sob leve agitação:

-HCl 0,25 M por 15 min.

-NaOH 0,4 M; NaCl 0,6 M por 30 min.

-NaCl 1,5 M; Tris-Cl 0,5 M pH 7,5 por 30 min.

2-Molhou-se a membrana de nylon (Hybond N) em água, por capilaridade e, em seguida, em SSC 10X, por 15 min.. (a solução SSC é feita 20X concentrada e consiste em NaCl 3 M; Citrato de Sódio 0,3 M).

3-Transferiu-se por 16 a 20 horas, de acordo com esquema descrito em SAMBROOK et al. (1989).

4-A membrana foi mergulhada em:

-NaOH 0,4 M por 60 seg.

-Tris-Cl 0,2 M pH 7,5; SSC 2X por 3 min., sob leve agitação.

5-Depois de seca, a membrana foi embrulhada em plástico tipo

Magipack e exposta a luz UV de transiluminador, por 5 min..

### 3.11.2.2. Marcação isotópica do plasmídeo pelo método Random Priming (kit da Boehringer-Manheim)

Em tubo eppendorf, foi adicionado:

-2  $\mu$ l da sonda de DNA (80 ng) previamente fervido e resfriado

-1  $\mu$ l de cada dNTP (0,5 mM)

-2  $\mu$ l do tampão de reação

-5  $\mu$ l de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP (50  $\mu$ Cl)

-7  $\mu$ l de água destilada esterilizada

-1  $\mu$ l de enzima Klenow (2 U/ $\mu$ l)

Incubou-se a 37°C por 30 min. e a reação foi paralizada através de incubação a 65°C por 10 min..

### 3.11.2.3. Hibridização

1-A membrana (item 3.11.2.1) foi pré-hibridizada em saco plástico selado, por 2 hs. a 65°C na seguinte solução:

-Sulfato de Dextran ----- 10%

-SDS----- 1%

-DNA de esperma de arenque 1,25 mg/ml (fragmentado, denaturado a 100°C e resfriado)

-NaCl----- 0,9 M

2-Adicionou-se a sonda marcada (item 3.11.2.2.) e denaturada (100°C, por 10 min.).

3-Hibridizou-se a 65°C por cerca de 20 horas, sob agitação.

4-Lavou-se com as seguintes soluções;

-SSC 2X - duas vezes em 5 min., à temperatura ambiente.

-SSC 2X; SDS 1% - 2X em 30 min., a 65°C.

-SSC 0,1 % - 2X em 30 min. a 65°C.

5-A membrana foi embrulhada em plástico tipo Magipack e exposta a filme de raio-X (KODAK, X-OMAT).

6-A revelação foi feita em tempos variáveis, de acordo com a eficiência da marcação.

### 3.11.3. Isolamento do fragmento contendo o gene *tub-2* de *N. crassa*

1-Cerca de 6 µg do plasmídio pBT6 foram digeridas com a enzima *Hind* III (que tem dois sítios de clivagem no plasmídio, ladeando o fragmento de 3,1 Kb, que contém o gene *tub-2*).

2-Os fragmentos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão 1%, a 4°C. O gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5%, após a eletroforese.

3-O fragmento de 3,1 Kb, contendo o gene, foi localizado com a ajuda de um transiluminador de luz UV, e a região do gel de agarose onde ele estava contido, cortada.

4-Ao bloco de agarose contendo o fragmento, foi adicionado cerca de 5 volumes de Tris-Cl 20 mM pH 8; EDTA 1 mM. O tubo foi incubado a 65°C, por 5 min. para que o gel derretesse.

5-Quando a solução chegou à temperatura ambiente, foi adicionado

1 volume de fenol (equilibrado com Tris-Cl 0,1 M) e agitou-se com um vortex por 20 seg. e, em seguida, centrifugou-se a 4.000 g por 10 min. a 20°C. Reextraiu-se a fase aquosa uma vez com um volume de fenol:clorofórmio e uma vez com clorofórmio.

6-A fase aquosa foi transferida para tubo de poliestireno e a ela foram adicionados 0,2 volume de acetato de amônio 10 M. Precipitou-se o DNA com 2 volumes de etanol a 4°C e o tubo foi mantido por 10 min. à temperatura ambiente.

7-Centrifugou-se a 3.500 rpm por 30 min. em centrífuga Beckman GPR. Depois de seco o "pellet" foi ressuscitado em 20 µl de TE.

### 3.12. TESTE DE ESTABILIDADE MITÓTICA DOS TRANSFORMANTES

Os transformantes analisados no item 3.11.1. foram submetidos ao teste de estabilidade mitótica.

1-Cada linhagem foi inoculada em duas placas de Petri com MC, sendo que, uma delas continha 0,75 µg de benomil/ml, enquanto na outra, a droga não foi adicionada. A incubação foi feita por 7 dias.

2-Conídios de cada uma das placas foram ressuscitados em solução de Tween 80 0,1%. Em seguida, cada suspensão de conídios foi semeada em 5 placas de Petri com MC, contendo 0,75 µg de benomil/ml e, em mesmo número de placas de MC, sem a adição da droga. Foram semeados cerca de 200 conídios por placa.

3-Depois 24 horas de incubação, foi determinado o número de colônias nas placas sem benomil. Nas placas contendo benomil, a

contagem foi feita após 48 horas de incubação.

### 3.13. TESTE PARA DETECÇÃO DE NUCLEASES

3.13.1. Halo de hidrólise em placa (modificado de JEFFRIES et al., 1957).

1-As linhagens T580, de *Aspergillus nidulans* e lgp 73, e os transformantes t<sub>11</sub> e t<sub>281</sub> de *Aspergillus niger* foram inoculadas em MC contendo 2 g/l de DNA de esperma de arenque - DNA EA (Sigma). Como controle foi usado 1 µl da nuclease S1 de *Aspergillus oryzae* (20.000 U/µl, Sigma), diretamente na placa.

2-Após 3 dias de crescimento, HCl 1 N foi acrescentado às placas por 5 min. Onde havia degradação de DNA, surgiu um halo transparente, enquanto o resto da placa manteve-se opaco, devido à precipitação do ácido nucléico.

Outras linhagens foram testadas para presença de nucleases extracelulares: t<sub>14</sub>, t<sub>42</sub> e t<sub>45</sub>, além da linhagem mutante de *A. nidulans* biA<sub>1</sub> methG<sub>1</sub> e a linhagem de tipo selvagem *A. niger* 350. Neste teste foi usado MM sem adição de outra fonte de fosfato que não fosse o DNA.

### 3.13.2. Hidrólise em placa de microtitulação

1-Protoplastos das linhagens lgp 73, t<sub>14</sub> e *A. nidulans* foram produzidos como no item 3.7.4.. Após ser obtido o "pellet" na segunda centrifugação, os protoplastos foram contados em hematímetro.

Diluições foram feitas no tampão de reação TM (Tris-Cl 0,1 M pH 8; MgCl<sub>2</sub> 50 mM para a concentração de 10<sup>6</sup>/ml em um volume de 500 µl.

2-Em seguida, os protoplastos foram transferidos para tubos eppendorf e rompidos através de ultrasonicador (3 ciclos de 10 seg. de 45 W). Centrifugou-se por 2 min. em microcentrífuga (13.000 rpm) e recolheu-se o sobrenadante.

3-Foram adicionados 100 µl de TM a pocinhos de placas de titulação, seguidos de 10 µg de DNA EA, dissolvido em TM.

4-Ao primeiro pocinho, foram adicionados 50 µl do sobrenadante de cada amostra, seguindo-se uma diluição de 1:2 ao longo de 10 pocinhos.

5-Incubou-se a 37°C, por 2 a 18 horas.

6-Adicionou-se 1 µl de brometo de etídio (1 µg/µl) e observou-se ao transiluminador, a presença de nucleases, pela diminuição da fluorescência em cada pocinho.

7-Como controle positivo foi utilizada a nuclease S1 (item 3.13.1.), diluída 1:100 e 1:1000 em TM. Neste caso, 50 µl foram adicionados ao primeiro pocinho, seguindo-se diluição similar à do item 3.13.2.4..

Foram ensaiados, de maneira idêntica à descrita neste item 3.13.2., o meio MCS, onde foram crescidos os micélios usados para a produção de protoplastos e o sobrenadante da digestão da parede celular com as enzimas líticas das linhagens utilizadas anteriormente.

### 3.13.3. Hidrólise em tubo, seguida de eletroforese

1- Três  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídial (pBT6 e pBEN A3) e 5  $\mu\text{g}$  de DNA cromossômico (lgp 73 e tze<sub>1</sub>) foram incubados com 10  $\mu\text{l}$  dos extratos citados no item 3.13.2., na presença de TM (item 3.13.2.1.), durante 18 horas ou em intervalos de 5, 10, 20, 30 e 45 min..

2-Em seguida foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8 %.

## 4.RESULTADOS

### 4.1. TESTE DE SENSIBILIDADE DA LINHAGEM lgp 73 AO BENOMIL

Os testes foram realizados de acordo com o item 3.6. e tiveram a finalidade de ensaiar o nível de resistência da linhagem lgp 73, tanto nas condições que seriam utilizadas para a seleção dos transformantes, quanto nas que os possíveis transformantes seriam avaliados, em comparação com a linhagem recipiente.

#### 4.1.1. Inoculação por ponto em MC

Por este tipo de inoculação, foi determinado que a linhagem recipiente tinha o crescimento inibido entre 1,00 e 2,00  $\mu\text{g}$  de benomil/ml, quando a solução aquosa foi utilizada. Quando se utilizou a solução etanólica, o crescimento foi inibido entre 0,50 e 0,75  $\mu\text{g}$  de benomil/ml.

#### 4.1.2. Inoculação "pour plate" de conídios em MC.

Em 4 testes independentes, usando a solução aquosa, a faixa onde houve a inibição do crescimento foram as seguintes, em  $\mu\text{g}$  de benomil/ml:

- 1 - 1,00 a 2,00\*
- 2 - 1,00 a 1,25
- 3 - 2,00 a 3,00 \*
- 4 - acima de 4,00\*



Em 3 testes feitos com a solução etanólica, a inibição do crescimento se deu entre ( $\mu\text{g}$  de benomil/ml):

1 - 0 e 1,00\*

2 - 0,50 e 0,75

3 - 0,50 e 0,75

\* Nestes testes, a concentração foi calculada para intervalos de 1 unidade, enquanto nos outros, os intervalos foram de 0,25 unidades.

#### 4.1.3. Inoculação "pour plate" de protoplastos em MC

Para os testes de sensibilidade da protoplastos ao benomil, foi usada apenas a solução etanólica e, a princípio, apenas o KCl 0,6 M como estabilizador osmótico. Em 2 testes independentes, os resultados foram idênticos: o crescimento dos protoplastos da lgp 73 foi inibido entre 0,50 e 0,75  $\mu\text{g}$  de benomil/ml, tanto quando se usou 200 quanto  $10^5$  protoplastos por placa.

Ficou determinada a concentração de 0,75  $\mu\text{g}$  de benomil/ml como a ideal para seleção dos transformantes.

#### 4.1.4. Determinação da sensibilidade de protoplastos da lgp 73 ao benomil, na presença de KCl e sorbitol como estabilizadores osmóticos.

Na figura 4.1 é mostrado o crescimento de protoplastos da lgp 73 em meios contendo (1) KCl 0,6 M (em tampão fosfato 0,2 M), (2) sorbitol 1,2 M e (3) sorbitol 0,6 M, como estabilizadores osmóticos.

Concentrações de benomil ( $\mu\text{g/ml}$ )

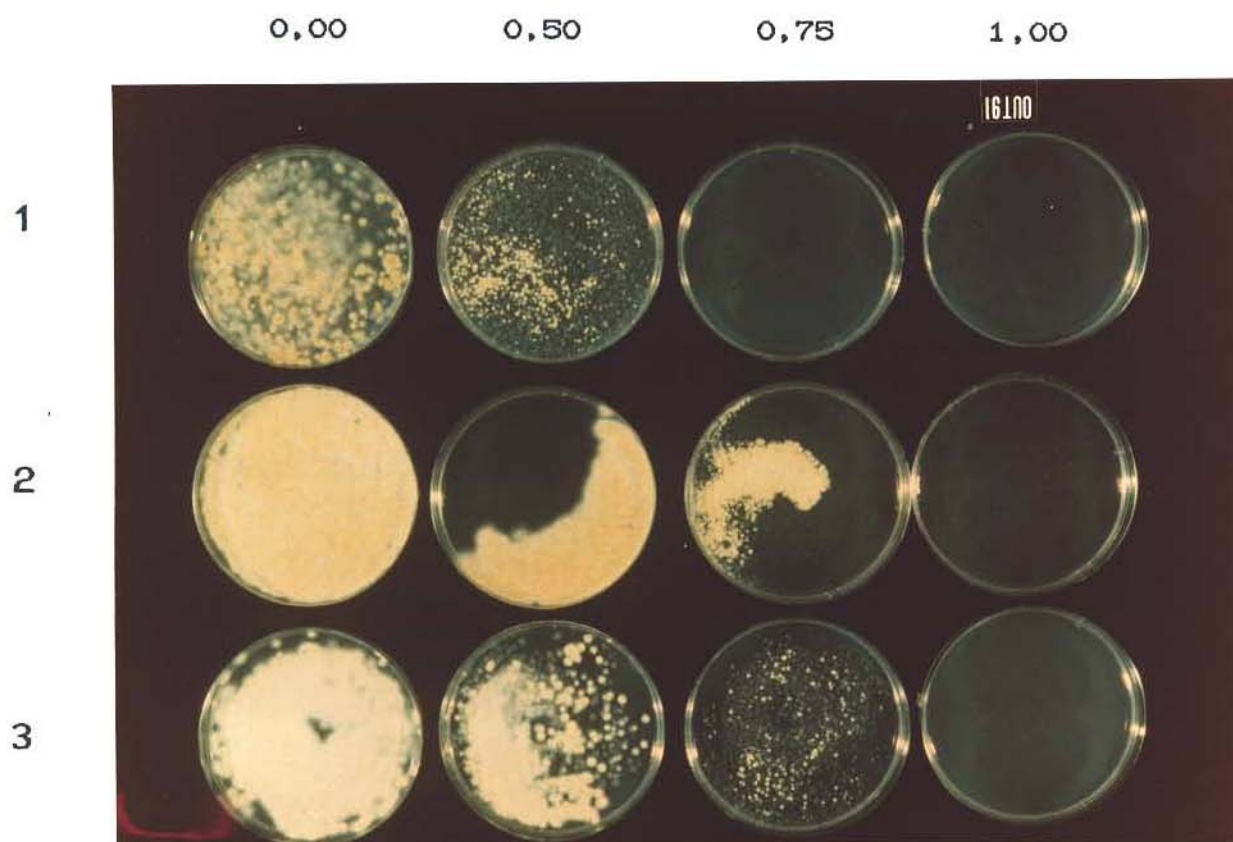


Figura 4. 1 -Comparação do crescimento de protoplastos da Igp 73 em meios contendo diferentes preparações de estabilizadores.

(1) KCl 0,6 M (em tampão fosfato 0,2 M), (2) sorbitol 1,2 M e (3) sorbitol 0,6 M; as concentrações de benomil estão indicadas na parte superior da figura.

Primeiramente, pode ser observado que o crescimento dos protoplastos é mais vigoroso na presença de sorbitol. Outro fato a se notar é que os protoplastos respondem diferentemente à ação do benomil na presença dos dois estabilizadores. Há crescimento de protoplastos em meios com sorbitol até a concentração de 0,75  $\mu\text{g}$  de benomil/ml, enquanto no meio contendo KCl, o crescimento só é observado até a concentração de 0,5  $\mu\text{g}$  /ml.

Não houve diferença aparente entre regeneração de protoplastos em MC contendo KCl 0,6 M, preparado em tampão fosfato 0,01 ou 0,2 M (dados não mostrados).

#### 4.2. TRANSFORMAÇÃO EM *A. niger*

##### 4.2.1. Frequências de transformação

A seleção dos transformantes foi sempre feita com a solução etanólica de benomil.

Na tabela 4.1 encontram-se, resumidos, os principais experimentos de transformação feitos com a linhagem lgp 73 de *A. niger*. Foi usado como base o protocolo de BALLANCE et al.(1983), modificado como descrito no item 3.7.4..

No experimento 1, a seleção dos possíveis transformantes foi feita de duas maneiras. Na primeira, os protoplastos foram plaqueados imediatamente após a transformação, sobre uma camada do meio de cultura contendo 1,50  $\mu\text{g}$  de benomil/ml (para concentração final de 0,75). Na segunda, os protoplastos foram plaqueados primeiro, e, após 22 horas de incubação, uma camada de MC, contendo a mesma concentração

Tabela 4.1 - Frequências de transformação na linhagem Igp 73 de *A. niger* em três experimentos independentes

Exp. *	µg de DNA	nº de prot.	nº de transf.	transf./µg
1	6	$9,0 \times 10^5$	4	0,7
2	3	$8,0 \times 10^5$	1	0,3
4	10	$2,5 \times 10^{7**}$	350	35

\* Experimentos:

- 1- Essencialmente como descrito no item 3.7.4..
- 2- idem exp.1
- 4- uso de novos lotes de enzimas líticas e de STC

\*\* a contagem de protoplastos neste caso foi feita apenas em hematímetro, pois as diluições foram contaminadas.

de benomil foi adicionada.

Os 6 possíveis transformantes selecionados, foram recuperados das placas preparadas da primeira maneira, pois, nas outras, o crescimento observado foi similar ao das placas controle. Nos testes realizados com os possíveis transformantes, apenas 4 (66%) mostraram que eram mais resistentes que a linhagem recipiente.

No experimento 2, que seguiu basicamente o mesmo protocolo de transformação do experimento 1, foram selecionadas 17 colônias supostamente resistentes, para o teste da marca. Apenas 4 delas demonstraram ser resistentes em um primeiro repique: t222, t223, t231 e t241. Após 2 a 3 repiques foi feito um novo teste de resistência (item 4.3.2.) e apenas o t231 manteve a marca de resistência ao benomil.

As modificações feitas no experimento 4 referem-se basicamente ao uso de um novo lote de Novozym 234 e de outro tipo de celulase (item 3.7.5.5), assim como a substituição da solução "KCa" por STC na transformação (item 3.7.5.4.). Com esses novos lotes, a protoplastização da lgp 73 ocorreu em um tempo duas vezes menor que nos experimentos anteriores. O número de protoplastos obtidos nesta digestão foi também bastante superior ao conseguido em preparações anteriores. A frequência foi calculada a partir das colônias crescidas em uma placa contendo KCl 0,8 M como estabilizador e benomil na concentração de 0,75 µg/ml, já que não havia qualquer colônia na placa controle e todos os transformantes testados desta placa mostraram ser resistentes (figura 4.3). É interessante notar que neste experimento foi feita uma tentativa de seleção dos transformantes em meio com sorbitol 1,2 M e duas concentrações de diferentes de benomil. No

entanto, a concentração de 0,75  $\mu\text{g/ml}$  não inibiu o crescimento da Igp 73 na placa controle e a de 1,00  $\mu\text{g/ml}$  foi, aparentemente, muito alta, não permitindo o aparecimento de colônias, possivelmente, transformantes

As outras modificações testadas (item 3.7.5.) não resultaram em aparecimento de transformantes.

Foram feitos alguns experimentos de transformação (não descritos em Material e Métodos) onde se usou o plasmídeo pBEN A3, que contém o gene *ben A'* de *A.nidulans* (JUNG E OAKLEY, não publicado) e confere resistência ao benomil. O protocolo de transformação foi o mesmo usado nos experimentos 1 e 2. Foram obtidos transformantes com um nível de resistência semelhante aos transformados com o pBT6. No entanto, não foi possível comparar as frequências nos experimentos paralelos, pois o número de colônias selecionadas para teste não foi representativo do número de possíveis transformantes.

#### 4.2.2. Nível de resistência dos transformantes

Nas figuras 4.2 e 4.3 são mostrados 9 transformantes que foram analisados quanto ao nível de resistência ao benomil.

Dos 9 transformantes analisados, 5 foram resistentes a mais de 1,50  $\mu\text{g}$  de benomil/ml. Os transformantes t<sub>11</sub>, t<sub>12</sub>, t<sub>13</sub> e t<sub>14</sub> foram obtidos em um mesmo experimento (1), mas apresentam diferentes níveis de resistência. O mesmo ocorreu com os transformantes t<sub>42</sub>, t<sub>43</sub>, t<sub>44</sub> e t<sub>45</sub>, todos apresentando diferentes níveis de resistência, o que pode ser observado através do tamanho das colônias na placa com

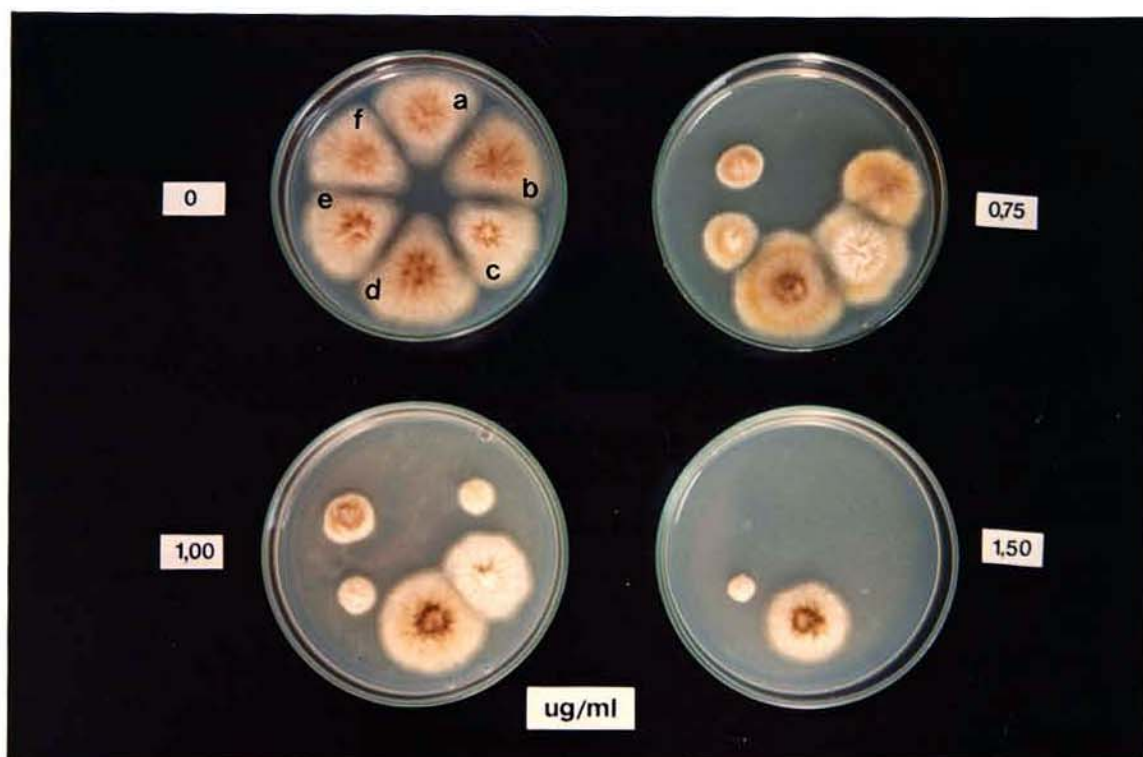


Figura 4. 2 - Crescimento de transformantes na presença de diferentes concentrações de benomil.

a) controle-1gp73; b) t11; c) t13; d) t231; e) t14; f) t12.

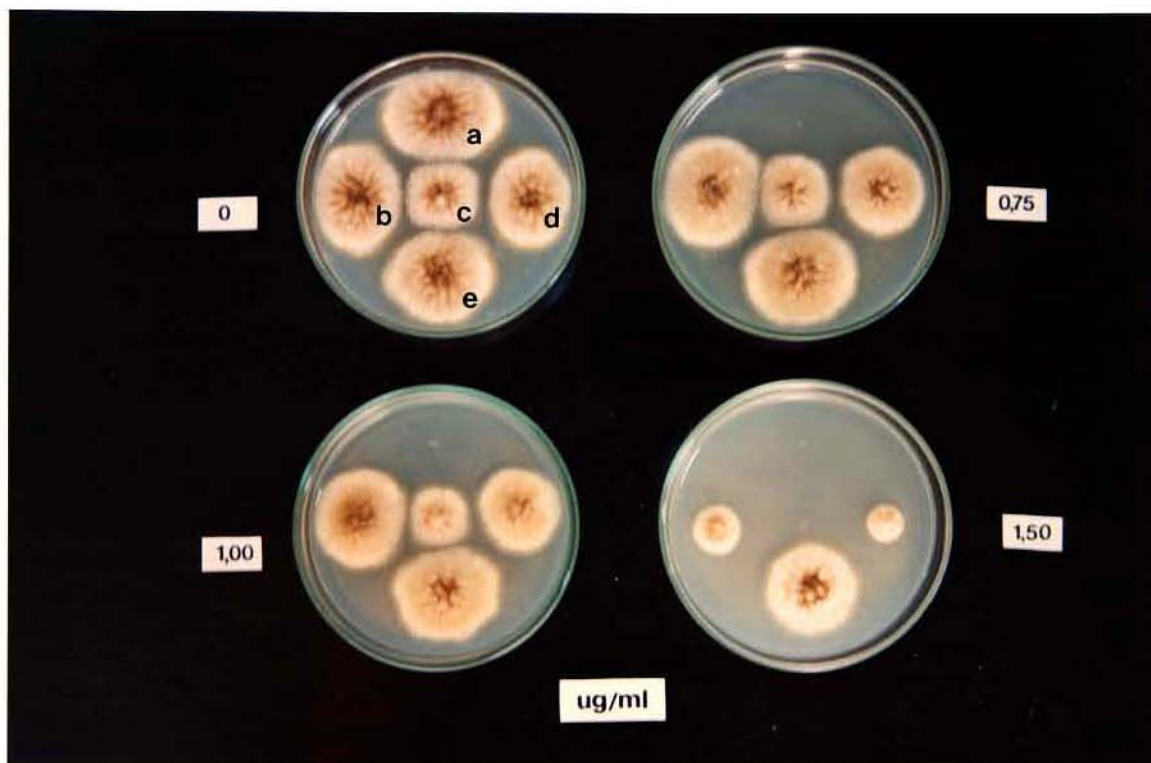


Figura 4. 3 - Crescimento de transformantes na presença de diferentes concentrações de benomil.

a) controle-1gp 73; b) t44; c) t43; d) t42; e) t45.



concentração de 1,50  $\mu\text{g/ml}$ .

Quando em presença de benomil, é possível observar que alguns transformantes apresentaram a morfologia diferente da recipiente lgp 73, implicando geralmente na diminuição na produção de conídios ou em alteração no formato da colônia ( $t_{12}$  e  $t_{14}$ ).

#### 4.2.3. Inoculação dos transformantes por ponto em MC e MC + KCl

Nas tabelas 4.2 e 4.3 encontram-se os valores dos diâmetros de colônias da linhagem lgp 73 e de 8 transformantes na presença de 2 concentrações de benomil ( $\mu\text{g/ml}$ ). Na tabela 4.2 estão os valores obtidos nas placas de MC, e na tabela 4.3, nas placas onde foi adicionado ao MC 2 X concentrado, uma solução de KCl (preparada em tampão fosfato 0,2M, para a concentração final de 0,6 M, que foi o estabilizador osmótico mais utilizado na regeneração de protoplastos, conforme o método de transformação de BALLANCE et al. (1983).

Neste teste observa-se que, de modo geral, as colônias são menores na presença de KCl. Este fato é melhor evidenciado nas placas onde há benomil. A linhagem lgp 73 cresce, em MC, até a concentração de 0,75  $\mu\text{g}$  de benomil/ml, apesar de o tamanho da colônia ser significativamente menor que o das transformantes, fato não observado na presença de KCl 0,6 M.

Os transformantes utilizados neste teste foram selecionados após a transformação, na concentração de 0,75  $\mu\text{g}$  de benomil/ml de meio, e retestados para comprovação da presença da marca em várias

Tabela 4.2 - Diâmetro das colônias da linhagem recipiente e possíveis transformantes em Meio Completo contendo diferentes concentrações de benomil ( $\mu\text{g/ml}$ )

Concentração de Benomil ( $\mu\text{g/ml}$ )		0,00			0,50			0,75		
		48	72	96	48	72	96	48	72	96
controle lgp73		1,7	2,3	3,3	1,0	2,2	2,9	0,2	0,5	1,1
FRATZSCHORNKATZHEM	t11	1,7	2,2	3,0	1,2	2,0	3,0	0,9	1,6	2,6
	t12	1,7	2,2	3,2	1,1	1,8	2,7	1,0	2,0	3,0
	t13	1,3	2,2	3,2	1,2	1,9	2,7	0,9	1,8	2,5
	t14	1,5	2,1	3,2	1,2	1,7	2,7	0,9	1,5	2,3
	t222	1,3	2,1	3,2	1,0	1,8	2,7	0,1	0,3	0,7
	t223	1,4	2,2	2,9	1,2	2,1	2,5	0,2	0,7	1,0
	t231	1,5	2,5	-	1,1	2,0	-	1,1	2,0	-
	t261	1,6	2,5	-	0,9	2,1	-	0,2	0,5	-

(-) não determinado

Obs.: os diâmetros estão expressos em centímetros.

Tabela 4.3 - Diâmetro das colônias da linhagem recipiente e de possíveis transformantes em Meio Completo + KCl 0,6 M contendo diferentes concentrações de Benomil ( $\mu\text{g/ml}$ )

Concentração de Benomil ( $\mu\text{g/ml}$ )		0,00			0,50			0,75		
		48	72	96	48	72	96	48	72	96
Controle lgp73		1,5	2,5	3,5	0,8	1,1	1,7	0,0	0,0	0,0
TRKX1010KAZ114	t11	1,8	2,4	3,5	2,0	2,0	3,0	0,0	0,9	1,4
	t12	1,3	2,4	3,5	1,3	2,0	2,9	0,4	0,8	1,2
	t13	1,3	2,2	3,0	1,0	2,0	2,9	0,6	1,3	1,9
	t14	1,4	2,4	3,3	1,0	1,9	2,4	0,2	0,7	1,0
	t222	1,5	2,3	3,5	0,5	0,9	1,5	0,0	0,0	0,0
	t223	1,5	2,5	3,5	0,7	0,9	1,3	0,0	0,0	0,0
	t231	1,5	2,3	-	0,9	1,7	-	0,8	1,2	-
	t261	1,5	2,3	-	0,7	1,0	-	0,0	0,0	-

(-) não determinado  
 Obs.: os diâmetros estão expressos em centímetros.

concentrações de benomil. Todos eles mostraram ser resistentes a pelo menos 0,75 µg de benomil/ml (através de comparação com a recipiente lgp 73). No entanto, neste teste foi possível observar a instabilidade desta marca em alguns transformantes, já que, três deles (t222, t229 e t2α) apresentaram um padrão de resistência similar ao da lgp 73.

#### 4.3. NÍVEL DE RESISTÊNCIA DOS TRANSFORMANTES AO BENOMIL, NA PRESENÇA DE KCL E SORBITOL COMO ESTABILIZADORES OSMÓTICOS

##### 4.3.1. Inoculação por ponto em meios contendo diferentes preparações de estabilizadores osmóticos

Na tabela 4.4 estão dispostas as medidas dos diâmetros de colônias da lgp 73 e de 3 transformantes, crescidos em MC e MC contendo as diferentes preparações dos estabilizadores osmóticos e 3 diferentes concentrações de benomil, após 48 e 96 horas de crescimento.

Nas figuras 4.4 e 4.5 pode-se observar o aspecto das colônias descritas anteriormente, assim como a linhagem de tipo selvagem de *A.niger* 350 após 96 horas de crescimento. Em ambas as figuras, o MC foi usado como meio controle.

A lgp 73 e os transformantes analisados neste teste, apresentaram respostas diferentes às várias concentrações de benomil, dependente do estabilizador adicionado ao MC. Somente nas placas contendo sorbitol, como estabilizador, houve crescimento da lgp 73 na presença de benomil. O crescimento de todas as colônias é muito mais vigoroso na presença de sorbitol, quando comparado ao MC. Por outro lado, nas placas contendo KCl, o crescimento foi restringido, resultando em colônias menores quando comparadas com as crescidas em MC.

Tabela 4.4 -Diâmetro de colônias (cm) crescidas em 5 diferentes meios, na presença de diversas concentrações de benomil (bml).

	bml	MEIOS*									
		1		2		3		4		5	
		48	96	48	96	48	96	48	96	48	96
lgp 73	0,00	0,7	4,0	0,4	5,0	0,7	4,9	0,5	3,9	0,6	4,5
	0,50	0,0	0,0	0,7	4,5	0,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0,75	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	1,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ts1	0,00	1,0	4,5	1,3	5,4	1,5	4,9	1,3	4,5	1,2	4,5
	0,50	0,5	4,5	1,3	5,4	0,6	4,5	0,0	1,8	0,1	1,5
	0,75	0,0	4,0	0,3	5,4	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,8
	1,00	0,0	4,0	0,0	4,9	0,0	4,7	0,0	0,0	0,0	0,0
ts2	0,00	1,1	4,2	1,3	5,4	1,2	5,0	1,2	4,5	1,2	4,5
	0,50	0,7	4,0	1,3	5,4	0,9	5,4	0,7	3,3	0,6	3,4
	0,75	0,7	2,0	0,7	3,3	1,0	4,0	0,6	2,4	0,7	2,5
	1,00	0,8	2,4	0,4	2,2	0,7	1,5	0,4	1,8	0,5	2,0
ts3	0,00	0,7	4,2	1,1	4,5	1,2	5,0	1,0	4,5	0,9	4,5
	0,50	0,7	4,5	1,2	5,4	1,0	5,0	0,8	3,3	0,6	3,6
	0,75	0,4	4,5	0,3	5,8	0,5	5,4	0,4	2,5	0,4	2,8
	1,00	0,4	4,5	0,4	6,3	0,4	5,4	0,2	2,2	0,6	2,4

\*MEIOS (item 3.8.):

1-MC

4-MC + KCl 0,6 M EM TAMPÃO  $PO_4^-$  0,2 M

2-MC + SORBITOL 1,2 M

5-MC + KCl 0,6 M EM TAMPÃO  $PO_4^-$  0,01 M

3-MC + SORBITOL 0,6 M

Concentrações de benomil ( $\mu\text{g/ml}$ )

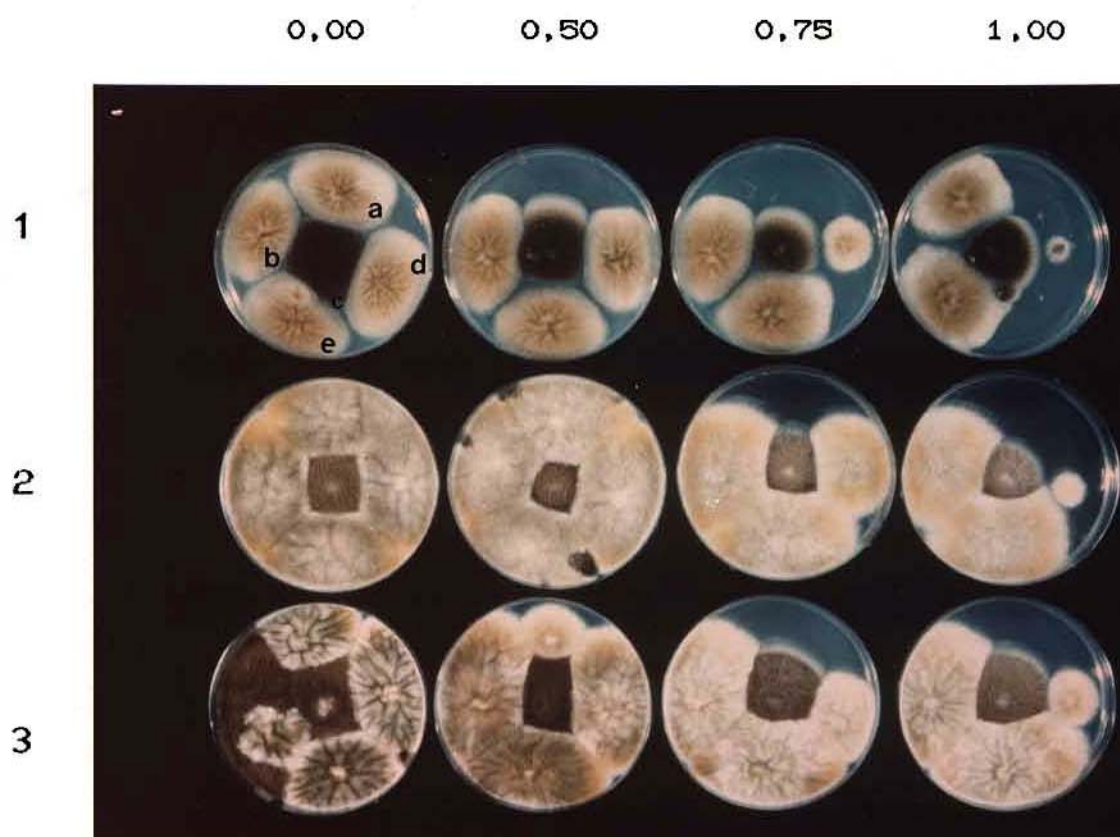


Figura 4. 4 - Comparação do crescimento dos transformantes em meios contendo diferentes preparações de sorbitol.

1) MC; 2) MC + Sorbitol 1,2 M e 3) MC + sorbitol 0,6 M. a) Igp 73; b) tsz; c) *A. niger* 350; d) tsz; e) tsz.

Concentrações de benomil ( $\mu\text{g/ml}$ )

0,00

0,50

0,75

1,00

1

2

3



Figura 4.5 - Comparação do crescimento dos transformantes em meios contendo diferentes preparações de sorbitol.

1) MC; 2) MC + KCl 0,6 M em tampão  $\text{PO}_4^-$  0,2 M e 3) MC + KCl 0,6 M em tampão  $\text{PO}_4^-$  0,01 M. a) lgp 73; b) t32; c) *A. niger* 350; d) t31; e) t33.

O desenvolvimento das colônias na presença de KCl foi melhor quando a solução foi preparada no tampão fosfato 0,01 M, ao invés de 0,2 M.

As colônias formadas na presença de sorbitol, além de serem maiores que as formadas em MC, são de coloração diferente, o que não é observado nas formadas em meio contendo KCl. Estas, por outro lado apresentam um aspecto cotonoso, com menor formação de conídios à medida que a concentração de benomil aumenta.

#### 4.4. ANÁLISE DOS TRANSFORMANTES ATRAVÉS DE HIBRIDIZAÇÃO POR "SOUTHERN BLOT"

##### 4.4.1. Extração de DNA cromossomal de *A. niger*

A figura 4.8, mostra o perfil eletroforético do DNA da lgp 73 e de alguns transformantes extraído por dois métodos diferentes: 4.8 a) método de RAEDER e BRODA (1985) e 4.8 b) método de SAMBROOK et al. (1989) modificado. O DNA da lgp 73 apresentou-se fragmentado em três extrações feitas segundo o primeiro protocolo.

##### 4.4.2. Hibridização de DNA intacto com o plasmídeo pBT6

Na figura 4.9 é mostrada a hibridização do DNA não digerido de 8 transformantes e da recipiente lgp 73, com o vetor inteiro. Em todos eles somente foi identificada uma banda de hibridização, correspondente ao DNA cromossômico do *A. niger*.

Não houve qualquer sinal, indicando hibridização de sequências do pBT6 com o DNA da linhagem recipiente lgp 73, na estringência usada.



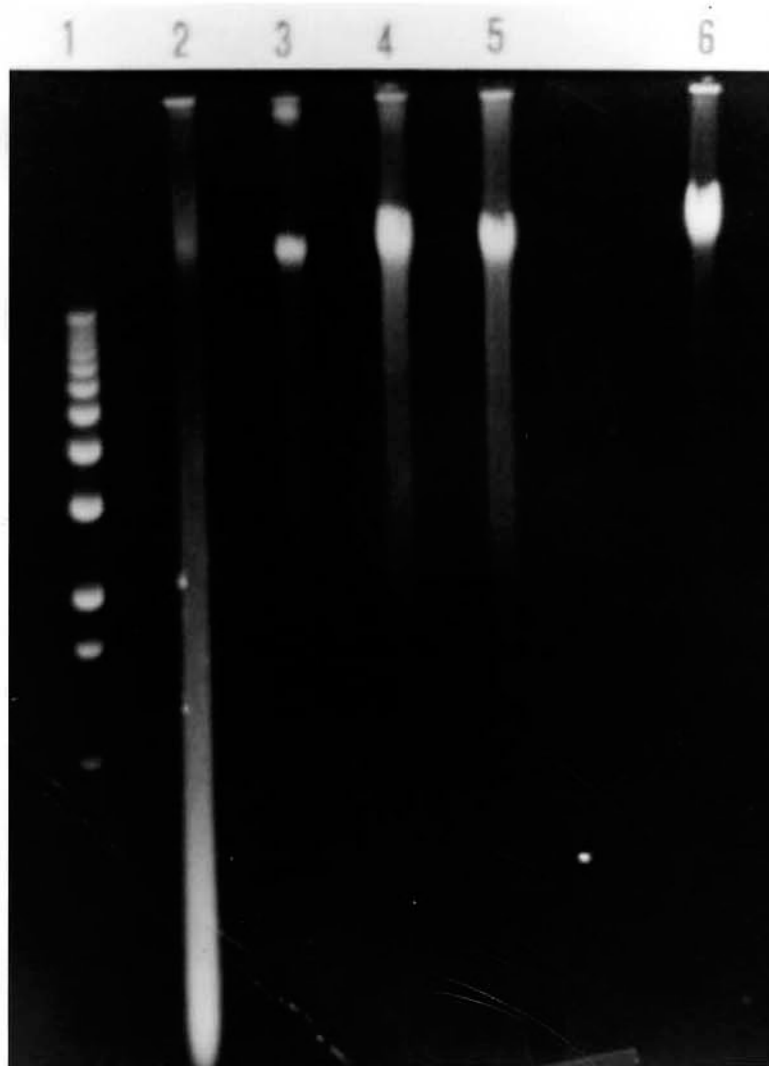


Figura 4.8 a - Análise do DNA total da lgp 73 e de transformantes, extraído pelo método de RAEDER e BRODA (1985), por eletroforese em gel de agarose.

1) escada de 1 Kb; 2) lgp 73; 3) t<sub>11</sub>; 4) t<sub>12</sub>; 5) t<sub>13</sub>; 6) t<sub>231</sub>.

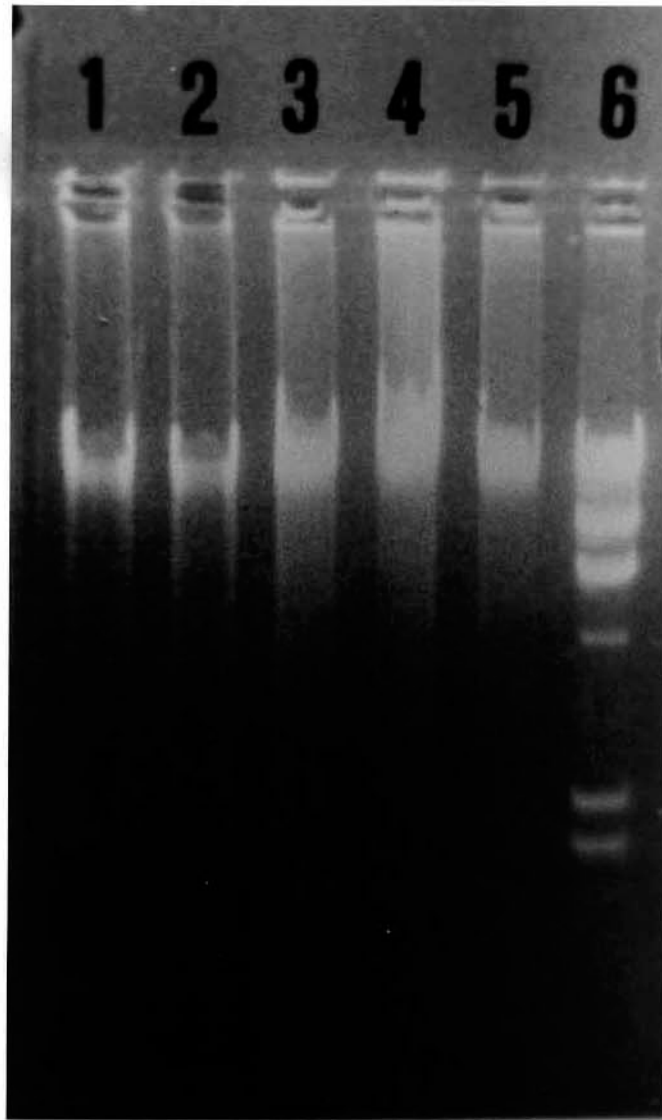


Figura 4.8 b - Análise do DNA total da lgp 73 e de transformantes, extraído pelo método de SAMBROOK et al. (1989) por eletroforese em gel de agarose.

1) lgp 73; 2) t11; 3) t12; 4) t13; 5) t231; 6)  $\lambda$ /Hind III.

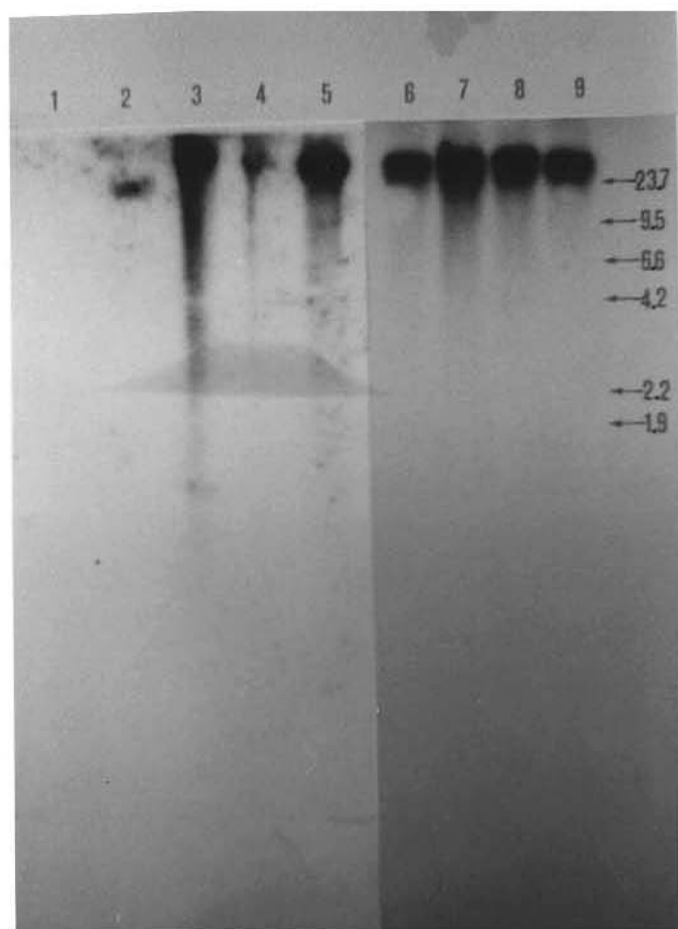


Figura 4.9 - Análise dos transformantes através de hibridização por "Southern Blot" do DNA intacto, com o pBT6.

1)lgp 73; 2)t11; 3)t12; 4)t13; 5)t14; 6)t231; 7)t42; 8)t43; 9)t44; 10)t45. As setas indicam o tamanho de alguns fragmentos de  $\lambda$ /Hind III, em Kb.

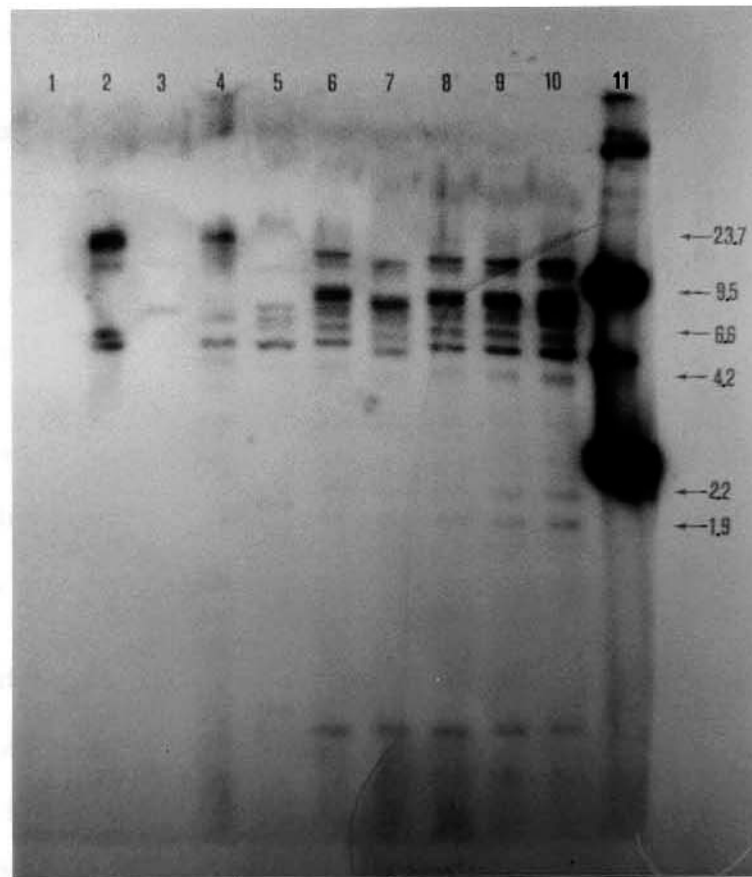


Figura 4.10 - Análise dos transformantes através de hibridização por "Southern Blot" do DNA digerido com Pst I, com o gene *tub-2*. 1)  $\lambda$ gp 73; 2) t11; 3) t12; 4) t13; 5) t14; 6) t231; 7) t42; 8) t43; 9) t44; 10) t45; 11) pBT6 em várias formas moleculares. As setas indicam o tamanho de alguns fragmentos de  $\lambda$ /Hind III, em Kb.

#### 4.4.3. Hibridização de DNA digerido, com o gene *tub-2*

Na figura 4.10, observa-se o DNA de 8 transformantes e da lgp 73 digeridos com a enzima *Pst I* e hibridizados com o fragmento contendo o gene *tub-2* de *N. crassa*.

Da mesma maneira ocorrida no ítem anterior, neste experimento não se observou a hibridização do DNA da lgp 73 com o gene de *N. crassa*.

Todos os transformantes, exceto t12, apresentam uma forte sinal em torno de 5,8 Kb, que corresponde ao plasmídio na sua forma linear.

Os transformantes 11, 12, 13 e 14, obtidos no experimento 1, apresentam um perfil de bandas diferentes de um para outro, havendo coincidência de hibridização de apenas alguns fragmentos.

Por outro lado, os transformantes obtidos no experimento 4 e o transformante 231, obtido no experimento 2, apresentam um padrão de bandas idêntico; a intensidade de algumas bandas de peso molecular em torno de 2 Kb é diferente em apenas alguns deles.

Foram feitas hibridizações do DNA digerido com o plasmídio inteiro. O padrão de bandas obtido foi igual ao mostrado na figura 4.10.

#### 4.5. TESTE DE ESTABILIDADE MITÓTICA

Este teste teve como objetivo a análise da estabilidade do gene introduzido no genoma do fungo, sob condições de ausência de pressão seletiva. Nas tabelas 4.7 e 4.8 estão representados os valores relativos ao número de colônias que mantiveram a marca de resistência.

dada pelo gene *tub-2* de *N. crassa*, quando cultivadas em meio contendo ou não benomil. Neste teste foi necessário a transformação dos dados absolutos em relativos, pois o número de colônias variou de um transformante para outro. Foi dado o valor de 100 % ao número total de colônias crescidas sem pressão seletiva, e foi calculada, a partir daí a frequência de colônias resistentes ao benomil.

#### 4.6. TESTE DE DETECÇÃO DE NUCLEASES

Os testes de detecção de nucleases foram feitos baseados na evidência de degradação do DNA da lgp 73, durante a extração, pelo método de RAEDER e BRODA (1985), enquanto nas outras amostras o DNA se mostrava muito pouco fragmentado (ver figura 4. 8).

##### 4.6.1. Halo de hidrólise em placa

Não se detectou a formação de halo de hidrólise de DNA ao redor das colônias usadas neste teste, quando foi usado MC. No entanto, quando as colônias foram crescidas em MM sem o fosfato  $-KH_2PO_4-$  (tabelas 4.5 e 4.6), foi possível observar a formação de halos de hidrólise do ácido nucléico, em volta de todas as colônias de *A. niger*. O mesmo não ocorreu com as colônias de *A. nidulans*. Os resultados da tabela 4.6 referem-se às placas mantidas a 4°C, durante 4 dias, após a incubação.

##### 4.6.2. Hidrólise de DNA em placa de microtitulação

O resultado deste teste pode ser visto na figura 4. 6. Quanto maior a degradação de DNA menor é a fluorescência nos pocinhos da placa.

Tabela 4.7. - Número de colônias desenvolvidas em MC com e sem benomil ( $\mu\text{g/ml}$ ) provenientes de confídios obtidos de colônias crescidas sem pressão seletiva.

CRESCIMENTO EM MC				
TRANSFORMANTE	MC		MC + BML	
	NÚMERO DE COLÔNIAS	% RELATIVA	NÚMERO DE COLÔNIAS	% RELATIVA
11	1048	100,0	1	0,1
12	1052	100,0	0	~0
13	928	100,0	18	1,9
14	1160	100,0	0	~0
231	1544	100,0	0	0
42	1252	100,0	643	51,3
43	996	100,0	1012	101,6
44	900	100,0	1400	155,5
45	955	100,0	1050	109,9

Tabela 4.8 - Número de colônias desenvolvidas em MC com e sem benomil provenientes de conídios obtidos de colônias crescidas com pressão seletiva.

CRESCIMENTO EM MC + BENOMIL				
TRANSFORMANTE	MC		MC + BML	
	NÚMERO DE COLÔNIAS	% RELATIVA	NÚMERO DE COLÔNIAS	% RELATIVA
11	293	100,0	0	~0
12	1208	100,0	43	3,6
19	1528	100,0	409	26,8
14	1312	100,0	0	~0
291	1876	100,0	80	4,3
42	796	100,0	968	121,0
43	952	100,0	1512	158,8
44	620	100,0	592	95,5
45	533	100,0	624	117,1



Por comparação com a nuclease S<sub>1</sub> de *A. oryzae*, estimou-se a concentração de nucleases nos extratos dos fungos:

Igp 73-----3.000 U/ $\mu$ l

u4-----2.200 U/ $\mu$ l

*A. nidulans* T580-----1.500 U/ $\mu$ l

Deve-se deixar claro que, esta quantificação é aproximada, pois além de ter sido feita por comparação visual na fotografia, a nuclease S<sub>1</sub>, digere apenas DNA de fita simples (o que não parece ser o caso do conjunto de nucleases dos extratos dos fungos, como mostra o item 4.6.3.).

Foram também detectadas atividades nucleolíticas no MCS onde foi crescido o micélio usado para produção de protoplastos e o sobrenadante obtido após a digestão do micélio com as enzimas líticas da parede celular. Neste último caso, a atividade de nucleases detectada foi bastante superior à encontrada no MCS. No entanto, estes testes não permitiram uma comparação quantitativa da atividade nucleolítica entre as linhagens usadas. Apenas se pode afirmar que o MCS onde foi crescido o *A. nidulans*, teve, no teste, fluorescência comparável ao MCS controle (dados não mostrados).

#### 4.6.3. Hidrólise de DNA em intervalos de tempo

Na figura 4.7 observa-se a fragmentação do DNA da Igp 73 pelos três extratos usados. Diferencia-se uma atividade nucleolítica mais pronunciada nos extratos provenientes das linhagens de *A. niger*. No

Tabela 4.5 - Medidas de halos de hidrólise de ácidos nucléicos e de colônias de linhagens de *A. niger* e de *A. nidulans*.

Linhagem	Tamanho do Halo (cm)	Tamanho da Colônia (cm)	Halo/Colônia
lgp73	4,1	2,3	1,8
<i>A. niger</i> 350	3,6	1,5	2,4
t14	3,2	1,8	1,8
t42	3,0	1,7	1,8
t45	3,2	1,8	1,8
t231	3,5	2,0	1,7
<i>A. nidulans</i> T580	0,0	2,8	-
<i>A. nidulans</i> biA <sub>1</sub> methG <sub>1</sub>	0,0	2,8	-

Tabela 4.6 - Medidas de halos de hidrólise de ácido nucléico em linhagens de *A. niger* e de *A.nidulans*, guardadas por 4 dias a 4°C, após o crescimento.

Linhagem	Tamanho do Halo (cm)	Tamanho da Colônia (cm)	Halo/Colônia
lgp73	6,5	1,5	2,8
<i>A. niger</i> 350	6,2	1,8	3,4
t14	7,0	1,9	2,8
t42	5,4	1,9	2,8
t45	5,4	1,7	3,2
t291	6,0	2,1	2,9
<i>A. nidulans</i> T580	0,0	2,3	-
<i>A. nidulans</i> biA <sub>1</sub> methG <sub>1</sub>	0,0	3,0	-

Diluição 1:2

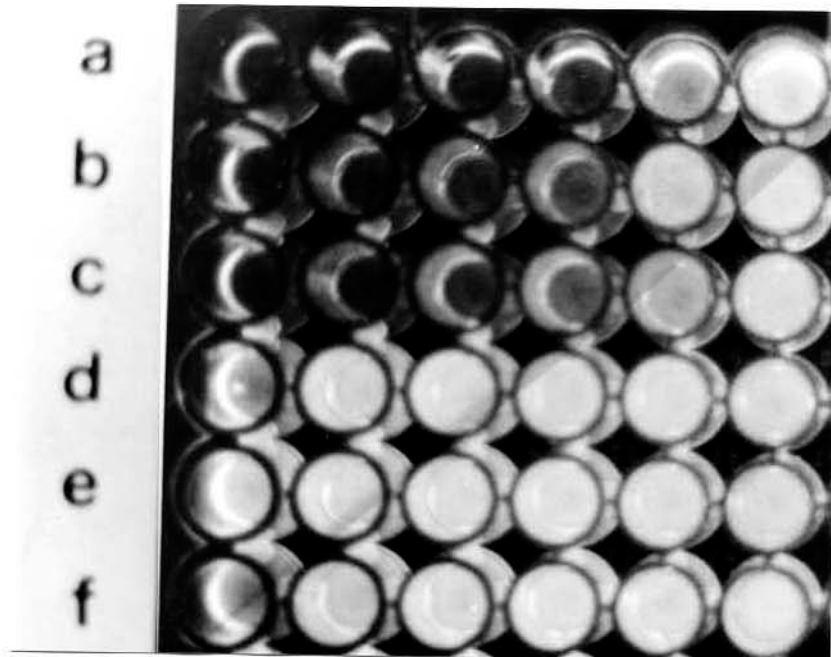


Figura 4.6 - Hidrólise de DNA em placa de microtitulação. Linhas a)lgp73; b)A. nidulans T580; c)t<sub>14</sub>; d)controle (TMD); e)nuclease S<sub>1</sub> diluída 1:1000; f)nuclease S<sub>1</sub> diluída 1:100

primeiro intervalo de tempo, que é 5 min., já observa-se a quebra do DNA em fragmentos menores que 0,5 Kb, e este padrão mantém-se o mesmo, durante todo o período observado. Em contraste, o extrato de *A.nidulans* produziu fragmentos de peso molecular maiores, mesmo ao final do período de reação, 45 min..

Foi também realizado um ensaio com DNA dos plasmídios pBT6 e pBEN A3 Os fragmentos produzidos após a incubação com os extratos dos fungos, eram de peso molecular extremamente baixo e não foram retidos pela malha de agarose, quando submetidos a eletroforese (dados não mostrados).

#### 4.6.4. Nucleases e transformação

O ácido aurintricarboxílico (AATC) foi usado em uma série de experimentos de transformação na tentativa de se aumentar a frequência de transformantes/ $\mu$ g de DNA, de acordo com WARD et al.(1990).

Não foi possível determinar esta relação, nestes experimentos, pois o número de colônias selecionadas para teste da presença da marca de resistência não foi representativo do número de possíveis transformantes.

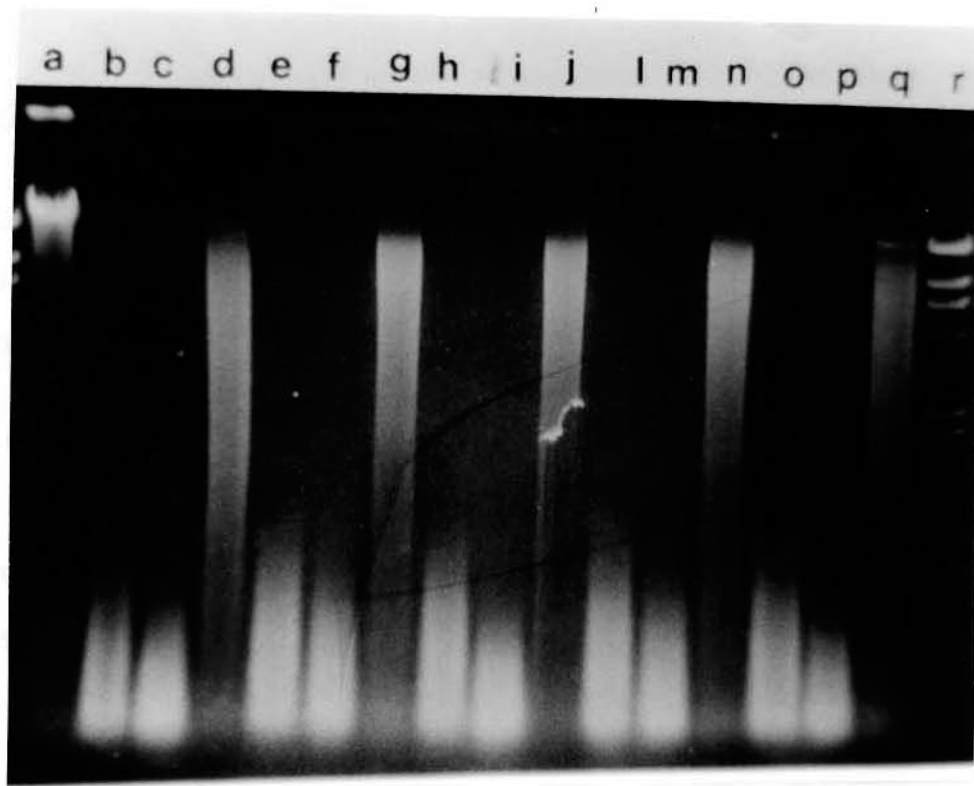


Figura 4.7 - Eletroforese do DNA da lgp 73, digerido por nucleases contidas nos extratos de linhagens de *Aspergillus*, em diferentes intervalos de tempo.

Na canaleta a, está o DNA intacto. Canaletas b, c e d, correspondem a 5 min. de incubação; e, f e g a 10 min.; h, i e j a 20 min.; l, m e n a 30 min. e o, p e q a 45 min.; canaleta r,  $\lambda$  digerido com *Hind* III. A sequência dos extratos nas canaletas é: lgp 73, t291 e *A.nidulans* T580.

## 5.DISCUSSÃO

### 5.1.SENSIBILIDADE DA lgp 73 AO BENOMIL E INFLUÊNCIA DOS ESTABILIZADORES OSMÓTICOS NO CRESCIMENTO

A determinação da sensibilidade da lgp 73 ao benomil foi um passo onde houveram dificuldades, e os primeiros resultados obtidos foram contraditórios.

A princípio, foi usada uma solução da droga em solução aquosa, que era rotineiramente usada no laboratório para obtenção de recombinantes haplóides. A solubilidade da droga em água não é total, mas esta solução era usada devido a relatos de que soluções de benomil em etanol poderiam ser tóxicas às células (HENSON et al.,1988).

No entanto foram feitos vários testes de sensibilidade da lgp 73 ao benomil, a partir de soluções etanólicas e não foi evidenciado qualquer ação tóxica do álcool nas células. Os testes feitos desta maneira, ao contrário dos feitos com a solução aquosa, mostraram uma maior reprodutibilidade. A mesma faixa de sensibilidade/resistência foi observada nos três tipos de inoculação (item 4.1.) quando esta solução foi utilizada.

A sensibilidade da lgp 73 ao benomil, de 0,75  $\mu\text{g/ml}$  é semelhante à descrita para *N. crassa*, que é 0,5 (ORBACH et al.,1986), e igual à de *Gaeumannomyces graminis* (HENSON et al.,1988). Em *M. anisopliae* foram relatados dois diferentes níveis de sensibilidade para a mesma linhagem: 3  $\mu\text{g/ml}$  (BERNIER et al.,1989) e 5  $\mu\text{g/ml}$  (GOETTEL et al.,1990).

O fato da faixa de sensibilidade ser estreita na lgp 73 refletiu

nos experimentos de transformação. Em certos experimentos houve crescimento de protoplastos nas placas controle, o que pode ter sido acarretado por uma possível variação na concentração de benomil no meio, devido a erros usuais de pipetagem. Estes eventos dificultaram o processo de seleção dos transformantes, já que a comprovação da aquisição da marca de resistência só seria feita após um repique em meio seletivo. Por outro lado, em determinados experimentos de transformação não houve crescimento nas placas onde foram semeados os protoplastos tratados com o plasmídio. Nestes casos, não se pôde afirmar se o não crescimento foi devido à incapacidade dos protoplastos de incorporar o plasmídio, que pode ser devido a diversos fatores, ou se foi apenas o resultado de um excesso da droga no meio (possivelmente pelos mesmos erros citados anteriormente).

Na transformação de *A. flavus* com o gene de  $\beta$ -tubulina também houve variação na concentração de benomil que permitia uma clara seleção dos transformantes. Similarmente à lgp 73, a faixa de sensibilidade/resistência foi estreita, com a seleção se dando entre 1,2 e 1,6  $\mu\text{g}$  de benomil por ml de meio (SEIP et al., 1990).

Foi também estudado no presente trabalho, a influência dos estabilizadores osmóticos na resposta de crescimento da lgp 73 frente ao benomil. O teste do item 3.6.2., onde compara-se o crescimento de colônias em MC na ausência ou presença de KCl 0,6 M (figs. 4.2 e 4.3), mostra que este estabilizador parece interferir no crescimento, restringindo o tamanho das colônias. As colônias de todas as linhagens apresentaram praticamente o mesmo diâmetro nas placas controle (0  $\mu\text{g/ml}$ ), mas no meio + KCl, contendo 0,75  $\mu\text{g}$  de benomil/ml.



o crescimento da lgp 73 foi totalmente inibido, enquanto no meio sem KCl o mesmo não ocorreu. As colônias dos transformantes foram no mínimo 3 vezes maiores que a da lgp 73 no com contendo 0,75  $\mu$  g de benomil por ml, com exceção dos transformantes t222, t223 e t224, que se portaram como a lgp 73. Quando KCl foi adicionado ao meio, o tamanho das colônias foi reduzido em até mais da metade do crescimento obtido no MC.

A concentração de benomil na qual o crescimento da lgp 73 é inibido, no MC + sorbitol é sempre maior que a usada nos outros meios (tabela 4.4). Esta mudança na concentração inibitória de crescimento também foi observada no teste de sensibilidade usando protoplastos da lgp 73 (figura 4.1). Da mesma maneira observada no teste do item 3.6.2., o crescimento da linhagem no meio contendo KCl é inibido na presença de menor concentração de benomil. Este fato foi evidenciado no experimento de transformação número 4. A mesma concentração de benomil no meio só inibiu o crescimento na placa controle quando o KCl foi usado como estabilizador osmótico.

Pela figura 4.1 pode-se notar que com 24 horas de incubação, já havia a formação de conídios na maioria das colônias crescidas em MC + sorbitol. Este fato parece indicar uma aceleração no processo de diferenciação dos protoplastos, quando na presença de sorbitol.

Não se pode dizer se houve diferença na regeneração dos protoplastos crescidos em meio com KCl ou sorbitol, pois não foi estimada a percentagem de regeneração da mesma preparação de protoplastos neste experimento. O fenômeno observado, pode ser atribuído a um aumento no metabolismo das células, causado,

possivelmente pelo maior quantidade de fonte de carbono no meio de cultura. Tanto no item 4.1.2 quanto no item 4.3.1., o crescimento das linhagens em sorbitol foi maior quanto maior a sua concentração no meio.

Os resultados de regeneração de protoplastos são, muitas vezes, contraditórios e talvez a escolha do melhor estabilizador osmótico seja específico para cada espécie, e talvez mesmo para linhagens diferentes. MACEDO (1986) verificou que  $MgSO_4$  favoreceu a regeneração em *Humicola sp.*, sobrepujando ao efeito do sorbitol, enquanto BORGES (1987), relata o contrário para *A. niger*.

No teste do item 3.8.1., a concentração de benomil que inibiu o crescimento da lgp 73 no MC foi 0,5  $\mu g/ml$ , ao invés de 0,75, como no item 3.6.2.(tabela 4.4). Esta diferença parece se dever apenas a uma pequena variação na concentração da solução, possivelmente por dissoluções diferenciais, já que os testes de resistência feitos com esta nova solução indicaram sempre, o mesmo resultado. Este fato salienta a necessidade de um teste de sensibilidade da linhagem recipiente para transformação, toda vez que for feita uma nova solução da droga. O teste deve ser feito na presença do estabilizador osmótico a ser utilizado na seleção dos transformantes, visto que a resposta de crescimento frente à droga é influenciada pelos estabilizadores.

## 5.2. DETECÇÃO DE NUCLEASES

Os testes para detecção de nucleases foram realizados a partir da evidência de degradação do DNA da linhagem lgp 73 em 3 extrações feitas pelo método de RAEDER e BRODA (1985). Em contraste com o DNA

dos transformantes, o DNA da Igp 73 não apresentava uma banda de alto peso molecular e sim era observada uma grande fragmentação, quando submetido a eletroforese (figura 4.8a).

Não mais se observou a fragmentação do DNA, apenas quando, para a extração foi utilizado o protocolo derivado de SAMBROOK et al. (1989). A modificação mais significativa neste protocolo, em relação ao usado anteriormente, foi o aumento em 4 vezes na concentração de EDTA no tampão de extração. O EDTA, como agente quelante, impede a ação de vários tipos de enzima que necessitam de determinados íons como co-fatores da reação.

JEFFRIES et al.(1957) desenvolveram um método simples para detectar a habilidade dos microrganismos em hidrolisar ácidos nucleicos. A atividade nucleolítica extracelular é detectada através de halos em volta da colônia, no meio de cultura contendo DNA e RNA, após reação com ácido clorídrico. Dentre os vários gêneros de bactérias e fungos testados, o *Aspergillus* é um exemplo de produtor de nucleases extracelulares.

Neste trabalho, foi feita uma adaptação deste método, onde, ao invés de serem usados os meios comerciais (ágar para teste de DNase/DIFCO) ou o descrito no trabalho original, foi usado o meio completo ou mínimo para *Aspergillus*, acrescido de DNA de esperma de arenque, (ítem 3.11.1.).

É interessante o fato de só se detectar a atividade de nucleases extracelulares em *A. niger*, quando não há outra fonte de fosfato, além do DNA (tabela 4.5). Ao contrário do que se observou durante a

extração do DNA da lgp 73 e dos transformantes, não houve diferença significativa entre eles, neste teste. A linhagem de tipo selvagem (350) parece produzir maior quantidade de nucleases que a mutante lgp 73.

Convém ressaltar o aumento em 1,5 a 2 vezes na relação halo/colônia após o período de 4 dias a 4°C. O mesmo fenômeno foi observado para linhagens de *A. niger* no nosso laboratório, quando foram ensaiadas as atividades amilolíticas e proteolíticas (OLIVEIRA, dados não publicados). Fica evidente o fato das enzimas não terem suas atividades paralisadas, à temperatura mais baixa. O que ainda ficou a ser investigado é se a secreção continua ativa durante a incubação a 4°C, ou se o aumento do halo se deve apenas à simples difusão das moléculas no meio de cultura.

Ficou também evidente, a diferença de secreção de nucleases pelo *A. nidulans* e o *A. niger*. Nas duas linhagens de *A. nidulans* testadas não houve a formação de halos de hidrólise de DNA. Mesmo depois de a placa ter sido mantida a 4°C, o que aumentou consideravelmente o tamanho do halo em *A. niger*, não foi observada a formação de halos naquela espécie.

O teste em placa de microtitulação foi feito no intuito de se detectar, além das nucleases extracelulares, também as intracelulares que poderiam estar influenciando na eficiência de transformação, e também na tentativa de se quantificar as enzimas nas diferentes linhagens. Neste caso foi detectada a atividade de nucleases no extrato de *A. nidulans*, mas em *A. niger*, esta foi bastante superior (100 % mais na lgp 73 e 50 % mais no t14.

O ensaio para DNases feito com o MCS, onde foi crescido o micélio para produção de protoplastos, confirmou os resultados obtidos no teste em placa, pois neste caso foi detectada a presença de, principalmente, nucleases extracelulares. Também neste caso, não foi detectado nível significativo de nucleases.

A atividade detectada no sobrenadante obtido após digestão do micélio, em todas as linhagens testadas, pode ser atribuída não somente a nucleases liberadas durante a digestão da parede do fungo, mas também a nucleases presentes nos complexos enzimáticos utilizados, fato que foi relatado recentemente (MINK et al., 1990).

As nucleases detectadas após a sonicação dos protoplastos devem ser principalmente, nucleases intracelulares, já que *A. nidulans* também apresenta uma alta atividade neste tipo de teste (metade da lgp 73). Existe a possibilidade da liberação dessas nucleases durante a protoplastização dos fungos, devido a rompimentos da membrana celular. A relevância das nucleases na transformação será discutida posteriormente.

As nucleases por nós detectadas, não foram caracterizadas neste trabalho, mas há indicações de que:

-não há especificidade de corte em DNA de fita simples, já que vários tipos de DNA (plasmídios, DNA EA, DNA da lgp 73) foram fragmentados na presença dos extratos (ítems 4.6.2. e 4.6.3.);

-são de ação rápida, visto que, após 5 min., a fragmentação do DNA no teste em tubo, foi a mesma que após 45 min.;

-existem enzimas extracelulares em grande quantidade em *A. niger*, mas em *A. nidulans* a maior parte é intracelular e a

concentração parece ser menor.

-não agem como os sistemas de modificação e restrição, pois o DNA da lgp 73 foi fragmentado pelo próprio extrato enzimático.

### 5.3. EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO

Os diferentes relatos de frequências de transformação em fungos filamentosos permitem que sejam enumerados vários fatores possivelmente relacionados com a eficiência de transformação.

Se no protocolo, são usados protoplastos, é importante: a idade do micélio a ser digerido, a qualidade da preparação enzimática, a relação micélio:enzima, o tempo de digestão, a temperatura de regeneração, a temperatura durante a protoplastização, a concentração e tipo do estabilizador osmótico.

Fatores ligados ao processo de transformação propriamente dito, incluem: gene utilizado e sistema de seleção; presença de sequências no vetor, com o intuito de aumentar a frequência; qualidade da preparação de DNA e sua concentração; forma do plasmídeo (circular ou linear); temperatura e tempo de incubação das células com o DNA; tempo de recuperação dos protoplastos, antes de aplicação de pressão seletiva; uso de choque térmico; uso de inibidores de nucleases.

Além das descritas acima, há outras variáveis citadas por diversos autores, como importantes na eficiência da transformação, que são muitas vezes contraditórias e que não são explicadas bioquimicamente. Algumas delas são: mudanças no tipo e concentração do PEG, na concentração de cloreto de cálcio, variações nos volumes das soluções usadas na transformação, tempo de armazenamento e modo de

esterilização dessas soluções, tipo de meio de cultura usado, concentração de ágar no meio de regeneração, entre outras. (Essas informações estão contidas nas referências citadas na Revisão Bibliográfica ou foram obtidas através de comunicação pessoal).

Nos primeiros experimentos de transformação feitos neste trabalho, que tiveram sucesso, ou seja 1 e 2, as frequências obtidas são semelhantes às relatadas nos trabalhos pioneiros de transformação com *A. niger* (KELLY e HYNES,1985; BUXTON et al.,1985). Nestes dois trabalhos também foram usados plasmídios contendo genes heterólogos.

Em *A. flavus*, a frequência de transformação, quando usado um plasmídio contendo, tanto o gene *pyr4*, quanto o de resistência ao benomil ( $\beta$ -tubulina), foi maior, quando a seleção foi feita com base na prototrofia para uridina (SEIP et al.,1990). A razão aparente para a frequência ser mais baixa, quando feita por seleção de resistentes, é, segundo os autores, que os transformantes que expressam níveis baixos ou intermediários de resistência, não são capazes de crescer no meio de seleção.

No experimento 4 foram usados novos lotes das enzimas líticas da parede celular. Com esses novos lotes, a protoplastização do micélio da Igp 73 ocorreu em um tempo duas vezes menor que nos experimentos anteriores. O número de protoplastos obtidos nesta digestão foi também superior à média obtida de digestões anteriores. Duas consequências deste fato, podem ter influenciado no aumento da frequência de transformação. O primeiro é que o número de protoplastos obtidos, sendo maior, aumentou o número absoluto de protoplastos viáveis. Em segundo lugar, a menor exposição dos protoplastos às enzimas líticas

pode ter propiciado um aumento na frequência relativa de protoplastos viáveis, ou mesmo estar aumentando a competência deles. Um relato anterior sobre influência da qualidade da enzima Novozym 234 na eficiência de transformação de *N. crassa* foi feito por AKINS e LAMBOWITZ (1985). Seria essencial, neste caso, que tivéssemos a frequência de regeneração dos protoplastos neste experimento para que fosse possível atribuir o aumento na frequência de transformação a uma melhoria na regeneração dos protoplastos ou a um aumento na competência destes, causado pelas modificações no tratamento enzimático do micélio, ou mesmo à mudança na solução estabilizadora usada durante a preparação dos protoplastos e na transformação (STC ao invés de "KCa").

As frequências de transformação obtidas com o gene *tub-2* de *N. crassa*, em várias espécies de fungos são bastante diferentes, mas não são maiores que 14 transformantes/ $\mu$ g de DNA. Assim, a frequência de 35 transformantes/ $\mu$ g de DNA obtida no experimento 4, representa relativamente, uma alta frequência de transformação com um gene heterólogo.

Parece também haver, características intrínsecas à espécie estudada que interferem na eficiência de transformação. Como exemplo, a frequência de transformação em *A. nidulans* quando foi usado o gene homólogo *oliC 31* foi de 10 a 70 transformantes/ $\mu$ g de DNA (WARD et al., 1986). Em *A. niger*, o mesmo experimento utilizando o gene homólogo correspondente, *oliC 3*, resultou em frequências menores que 2 transformantes/ $\mu$ g de DNA (WARD et al., 1988).



### 5.3.1. Nucleases e eficiência de transformação

Nos testes de detecção de nucleases foi utilizada uma linhagem de *A. nidulans*, T580, que é considerada uma boa recipiente de DNA na transformação (M. DEVCHAND, comunicação pessoal). Em todos os testes, onde houve a detecção de atividade nucleolítica, esta mostrou ser menor na linhagem de *A. nidulans*, que em *A. niger* (figuras 4.6 e 4.7). No teste em tubo fica evidenciado que as nucleases presentes em *A. nidulans* não tem a mesma especificidade das encontradas em *A. niger*, pois o padrão de fragmentação é diferente nas duas amostras. Existe a possibilidade que elas sejam de ação mais lenta, o que demandaria um tempo maior para a quebra do DNA em fragmentos menores, ou que a quantidade de enzimas é, simplesmente, menor nesta espécie.

Em *Streptococcus pneumoniae* foi evidenciada a presença de uma endonuclease (PUYETT et al., 1990) que está envolvida com o processo de entrada do DNA na célula, durante a transformação. Mutantes para esta enzima apresentam baixa eficiência de transformação. É possível que *A. nidulans*, que apresenta enzimas com atividade nucleolítica, mas oferece boa eficiência de transformação, tenha, dentre elas, alguma enzima que atue de forma semelhante à descrita para esta bactéria, e auxilie, desta maneira, na entrada de DNA durante a transformação.

Os nossos resultados com relação à produção desigual de nucleases extra e intracelulares em *A. nidulans* e *A. niger*, podem explicar um dos motivos da diferença na eficiência de transformação nestas duas espécies relacionadas.

Podemos, assim, propor que sejam adotadas medidas para minimizar

o efeito das nucleases na transformação de *A. niger*.

Uma das opções, sugerida por WARD et al.(1989) é o uso de ácido aurintricarboxílico na última lavagem dos protoplastos. Pelos nossos resultados da transformação usando este inibidor de nucleases, não pudemos analisar a sua eficiência no aumento da frequência, mas este mesmo autor relata um aumento de 5 vezes na frequência de transformação de *Aspergillus awamori*, quando este ácido é usado.

Outra sugestão, mais simples, é a incubação dos protoplastos no tampão, contendo o estabilizador osmótico, acompanhada de várias trocas deste, antes da adição do DNA e da solução de PEG. Desta maneira, seria feita a eliminação de nucleases extra ou intracelulares, por exaustão da secreção. Este procedimento foi adotado por DEKEYSER et al.(1990) durante a transformação genética em plântulas de arroz, para expressão temporária de genes. Antes da eletroporação, a base da folha foi extensivamente lavada com o tampão de eletroporação, até que não mais fossem detectadas atividades de nucleases no tampão. A expressão do gene usado aumentou em 25 vezes.

Cabe ainda salientar, a importância da análise da capacidade de produção e secreção de nucleases, ao se fazer a escolha de uma linhagem para experimentos de transformação. Apesar de a lgp 73 não ter o mesmo "background" genético, da linhagem de tipo selvagem 350 ficou evidenciado a diferença na secreção de nucleases extracelulares entre elas, sugerindo que o mesmo possa ocorrer com outras linhagens. Assim, para minimizar um possível efeito de nucleases na eficiência de transformação, é recomendável que este seja um critério adotado na escolha da linhagem a ser transformada.

#### 5.4. ANÁLISE DOS TRANSFORMANTES ATRAVÉS DE HIBRIDIZAÇÃO POR "SOUTHERN BLOT"

A hibridização do pBT6 com DNA de alto peso molecular nas amostras onde este não foi digerido com enzimas de restrição, é a evidência de integração do plasmídio no genoma dos transformantes analisados através de hibridização e vem de encontro aos relatos anteriores de transformação em *A. niger* (fig. 4.9). Evidências de replicação autônoma de plasmídios em *A. niger* foram descritas apenas recentemente por GEMS et al.(1991). Transformações com plasmídios contendo o gene *tub-2* de *N. crassa* normalmente levam à sua integração no genoma dos fungos utilizados (HENSON et al.,1988; FERNANDEZ-LARREA e STAHL,1989; BERNIER et al.,1989).

Na hibridização feita com o DNA digerido com *Pst* I (fig. 4.10), a forte banda em torno de 5,8 Kb observada em todos os transformantes, com exceção de t12, indica a integração do plasmídio em cópias múltiplas e repetidas "in tandem". Além desta banda, outras de intensidade variável são também observadas. A diferença na intensidade pode ser devida a variações no número de cópias integradas.

O complexo padrão de bandas produzido pode estar indicando a integração de cópias múltiplas em diferentes sítios. Há também a possibilidade de ter havido a integração em um único sítio de plasmídios que sofreram recombinação (portando inserções ou deleções). Este tipo de evento foi observado em *A. niger*, quando transformado com o plasmídio p3SR2 (MOHR et al.,1989).

Nos transformantes analisados foram observados pelo menos três classes distintas, quanto ao tipo de integração:

-uma delas é representada pelo t<sub>12</sub>, que apresenta apenas duas fracas bandas de hibridização, possivelmente resultantes de integração em dois sítios.

-a segunda classe engloba os transformantes 11, 13 e 14 que possuem padrões de bandas distintos entre si, mas com algumas bandas em comum. O tipo de integração ocorrido nestes transformantes, pode ser explicado por qualquer das duas hipóteses, expostas anteriormente.

-a última classe corresponde aos transformantes obtidos no experimento 2 e 4, que possuem o mesmo complexo padrão de bandas, nas hibridizações. Este tipo de integração parece estar envolvendo sítios específicos e preferenciais.

Em *A. niger*, a análise de vários tipos de transformantes, demonstrou que há maior prevalência de integração do plasmídeo de grande homologia, no locus do gene residente (RAMBOSEK e LEACH,1987; GOOSEN et al.,1987; van HARSTINGSVELDT et al.,1987; WARD et al.,1988; UNKLES et al.,1989). Em transformações com plasmídios contendo o gene para uma  $\beta$ -tubulina ou glucoamilase de *A. niger*, ocorreram os três tipos de integração, apesar de haver prevalência para o tipo I - integração por homologia através de um evento de recombinação (RAMBOSEK e LEACH,1987).

A frequência de integração por homologia é altamente variável de um organismo para outro e depende também do gene utilizado. Em geral, não é possível prever o número de cópias do vetor que serão integradas, nem tampouco o sítio de integração na transformação (TIMBERLAKE e MARSHALL,1989).

O gene para  $\beta$ -tubulina de *A. niger* foi clonado (RAMBOSEK e LEACH,1987), mas não há informações sobre a sua sequência de nucleotídeos, ou da sequência de aminoácidos da proteína.

MULLANEY e KLICH (1987) encontraram um alto grau de homologia entre o gene *tubC* de *A. nidulans*, que codifica para uma  $\beta$ -tubulina não essencial (MORRIS,1989) e o de *A. niger*, assim como de *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. terreus* e *A. fumigatus*. Há também uma grande homologia entre os genes *benA* de *A. nidulans* e da  $\beta$ -tubulina de *A. flavus* (SEIP et al.,1990).

O fato de não ter havido hibridização do gene *tub-2* com o DNA da lgp 73, na alta estringência usada, surpreendentemente, parece indicar que a homologia entre este gene e o correspondente em *A. niger* não é muito grande, apesar de em *A. nidulans*, esta ser maior que 90 %.

Em *Colletotrichum trifoli* foi encontrada uma homologia parcial do gene para  $\beta$ -tubulina de *N. crassa* com o gene residente, apenas após exposições prolongadas da membrana de hibridização, ao filme de raio-X (DICKMAN ,1988). No presente trabalho é preciso considerar que a ausência de hibridizaçãodo gene *tub-2* com o DNA da linhagem recipiente lgp 73, pode se dever à alta estringência usada em todos os experimentos, e ao baixo número de cópias do gene residente.

A última classe de transformantes, citada anteriormante, apresenta um fenômeno incomum nas integrações de DNA em fungos filamentosos, com relação ao padrão de cópias múltiplas e idêntico em diferentes transformantes. Se considerarmos que existe homologia, mesmo fraca, entre os genes para  $\beta$ -tubulina de *A. niger* e de *N. crassa*,

baseado nos relatos para outras espécies de *Aspergillus*, é possível conceber que o padrão se deve a integração sítio-específica do plasmídeo por homologia.

Por outro lado, se apenas for considerado o resultado da hibridização neste trabalho, só se pode dizer que a integração não parece estar envolvendo homologia. No entanto, pode-se afirmar que existe uma preferência de sítio de integração, já que estes transformantes, comprovadamente diferentes entre si, no mínimo em termos de resistência ao benomil (figs. 4.2 e 4.3), apresentam diferenças na hibridização, apenas quanto à intensidade de alguns fragmentos.

Um estudo mais detalhado dos eventos de integração envolvidos, exige, pelo menos, outros experimentos de hibridização. Em um deles, o DNA dos transformantes deveria ser digerido com um enzima que não possui sítios de restrição no plasmídeo e hibridizada com o gene *tub-2*. Neste tipo de análise, seria determinado o número de sítios de integração do plasmídeo, nos vários transformantes.

Outro tipo de experimento que poderia trazer maiores informações sobre recombinações ocorridas com o plasmídeo integrado, é a metodologia empregada por MOHR et al.(1989), que consiste na recuperação de fragmentos do DNA dos transformantes, seguida de ligação e transformação de *E. coli*. Pelo perfil de restrição dos fragmentos recuperados pode ser feita uma comparação com o plasmídeo original, e estabelecer se houve recombinações dentro do plasmídeo.

O padrão de bandas na hibridização parece estar relacionado com o nível de resistência ao benomil (figuras 4.2. e 4.3.). Nas placas

onde a concentração de benomil é de 1  $\mu\text{g/ml}$  fica mais clara esta relação. As colônias que apresentam os maiores diâmetros, são aquelas com maior número de bandas na hibridização, que são os transformantes do experimento 4 e do 2. Os transformantes do experimento 1, apresentam um nível de resistência ao benomil menor e também possuem diferentes perfis de bandas na hibridização, com menor quantidade de fragmentos hibridizando com o gene *tub-2*.

É interessante notar que *t291*, foi obtido em experimento independente e apresenta tanto o mesmo nível de resistência quanto o mesmo padrão de bandas que os transformantes do experimento 4.

O transformante *t13* parece ser uma exceção neste contexto, pois possui menos fragmentos hibridizando com o gene *tub-2*, mas possui o nível de resistência comparável aos maiores. Por outro lado, o aspecto da colônia é diferente, e a formação de conídios parece ser afetada neste transformante.

Os níveis de resistência alcançados nestes transformantes são similares aos encontrados em outras espécies transformadas com o mesmo gene (CORBACH et al., 1986; HENSON et al., 1988; DICKMAN, 1988; FERNANDEZ-LARREA e STAHL, 1989; PICKNETT et al., 1989; OSSANA e MISHKE, 1990).

Nenhum dos transformantes de *A. flavus* obtidos com o gene homólogo de uma  $\beta$ -tubulina clonado de um mutante resistente, teve um nível de resistência similar ao desta linhagem (SEIP et al., 1990). A razão para este fato não é clara, mas DUNNE e OAKLEY (1988) observaram que transformantes de *A. nidulans* com resistência intermediária ao benomil, eram resultado da expressão simultânea do gene nativo e do introduzido.

Parece, então, que o mecanismo de resistência ao benomil é mais complexo que a proporção direta do número de cópias do gene mutante e a resistência, já que em todos os transformantes analisados, neste e em outros trabalhos, apresentam um grande número de cópias do gene, mas tem níveis de resistência sempre mais baixos que os mutantes.

#### 5.5. ESTABILIDADE MITÓTICA DOS TRANSFORMANTES

Os transformantes do experimento 1 e o *t231* se mostraram extremamente instáveis no teste de estabilidade mitótica, apesar de não terem perdido a resistência ao benomil, após vários repiques por ponto em meio não seletivo. Em todos eles, a percentagem relativa de colônias crescidas em meio seletivo foi próxima de 0, com exceção de *t13* (cerca de 27%, se desenvolvido em presença de benomil), tanto se inoculados anteriormente com benomil, ou não.

Ao contrário, os transformantes do experimento 4, apresentam uma percentagem relativa de colônias resistentes alta (maior que 100 % em quase todos), o que parece indicar uma alta estabilidade mitótica.

Em praticamente todos os transformantes, o desenvolvimento das colônias na presença de benomil, favoreceu a manutenção da marca de resistência.

É difícil afirmar se existe uma correlação entre número de cópias, ou perfil de bandas na hibridização e estabilidade mitótica, pois o *t231* que possui o mesmo padrão dos transformantes do experimento 4, apresenta estabilidade mitótica semelhante à dos transformantes do experimento 1:



Convém ainda ressaltar que alguns transformantes obtidos no experimento 2, possuíam estabilidade mitótica extremamente mais baixa que os transformantes analisados através deste teste (item 3.12.). Uma percentagem muito pequena das colônias supostamente transformadas naquele experimento, manteve a marca de resistência em um primeiro repique (23 %), enquanto nos outros este número foi de 86% (exp.1) e de 100 % (exp.4). Estes transformantes podem representar transformantes abortivos. Mas, alguns dos transformantes que mantiveram a marca neste primeiro repique, não eram mais resistentes, após 2 a 3 passagens em meio seletivo (tabelas 4.2 e 4.3). No caso destes transformantes, não é provável que sejam transformantes abortivos já que expressaram a marca em mais de um repique em meio seletivo. É possível que o plasmídeo tenha se integrado em pequeno número de cópias e/ou em sítios que não favoreciam a estabilidade, resultando em uma rápida perda da resistência.

O estudo da estabilidade mitótica nos transformantes é de grande importância, principalmente, quando o objetivo maior está ligado à introdução de um gene de interesse comercial em uma linhagem específica.

## 6 . CONCLUSÕES

1 - A linhagem lgp 73 de *Aspergillus niger* pode ser transformada com o plasmídeo contendo o gene *tub-2* de *Neurospora crassa*.

2 - Modificações feitas em protocolos de transformação descritos na literatura aumentaram a frequência de transformação (transformantes/ $\mu$ g de DNA) na lgp 73 em pelo menos 50 vezes, em relação aos primeiros experimentos.

3 - Os transformantes obtidos têm um nível de resistência ao benomil, variável, sendo que dos 9 testados, 5 são resistentes a mais de 1,5  $\mu$ g/ml (dobro do nível de resistência da linhagem recipiente).

4 - O KCl e o sorbitol como estabilizadores osmóticos no meio de cultura, interferem no crescimento normal do fungo, restringindo e favorecendo, respectivamente, e mudam a resposta no crescimento frente ao benomil.

5 - O plasmídeo pBT6 encontra-se integrado no genoma de todos os transformantes, analisados através de hibridização por "Southern blot".

6 - O perfil de bandas nos experimentos de hibridização do DNA dos transformantes, digerido com uma enzima que possui apenas um sítio no plasmídeo, tendo o gene *tub-2* como sonda, se mostrou bastante complexo. Dos 9 transformantes estudados, 5 evidenciaram o mesmo padrão de bandas.

7 - Nas linhagens lgp 73 e *Aspergillus niger* 350 foi detectada a produção de nucleases extracelulares, e o mesmo não foi observado nas linhagens *Aspergillus nidulans* T580 e b1A<sub>1</sub> methG<sub>1</sub>.

## 7 . RESUMO

A linhagem de *Aspergillus niger* lgp 73, uma das mutantes de produção de glicoamilase, do Laboratório de Genética de Microorganismos Industriais - UNICAMP, foi transformada para resistência ao fungicida benomil, com um plasmídeo contendo o gene *tub-2* de *Neurospora crassa*, pBT6.

O protocolo de transformação adotado, baseado no tratamento com polietilenoglicol e cloreto de cálcio, sofreu modificações a fim de que fosse aumentada a eficiência de transformação. O resultado observado foi um aumento em cerca de 50 vezes na frequência inicial de transformação (número de transformantes/ $\mu$ g de DNA plasmidial). A frequência de até 35 transformantes/ $\mu$ g de DNA é relativamente alta, considerando-se que transformações de outras espécies com este mesmo gene alcançaram frequências de no máximo 14 transformantes/ $\mu$ g de DNA.

Foi avaliada a influência de KCl e sorbitol como estabilizadores osmóticos dos protoplastos, no desenvolvimento destes, assim como na resposta dos transformantes ao benomil. O KCl parece interferir no crescimento restringindo-o, tanto nos protoplastos quanto nas colônias da lgp 73 e na dos transformantes. Na presença de benomil, a resposta de crescimento é menor quando KCl é adicionado ao MC. O sorbitol, ao contrário, age positivamente no crescimento, e na presença de benomil, a concentração da droga deve ser maior para se obter o mesmo crescimento que no meio sem qualquer estabilizador.

Dos transformantes obtidos em experimentos independentes, 9 foram selecionados para análise do tipo de evento ocorrido a nível

molecular, através de hibridizações por "Southern blot", com o gene *tub-2*. Os resultados mostraram que em todos eles o plasmídeo estava presente apenas integrado no genoma. Com exceção de um transformante, todos apresentaram um complexo padrão de bandas na hibridização realizada com o DNA digerido com a enzima *Pst* I (que tem apenas um sítio de restrição no plasmídeo). A presença de uma forte banda do tamanho do plasmídeo em sua forma linear, indicou a integração de cópias múltiplas em um único sítio no genoma destes transformantes. Cinco dos transformantes apresentaram idêntico padrão de bandas neste experimento, o que sugere a integração do plasmídeo em sítios preferenciais.

Foi avaliada a capacidade de produção de nucleases em linhagens de *Aspergillus niger* e *Aspergillus nidulans*. Foi evidenciada a produção de nucleases extracelulares apenas nas linhagens de *A. niger*. Quanto às nucleases intracelulares, foi visto que existem diferenças na quantidade e especificidade delas, entre as duas espécies. Este fato sugere que esta possa ser uma das causas da maior eficiência de transformação em *A. nidulans*.

## 8 . ABSTRACT

A low glucoamylase production mutant of *Aspergillus niger* - lgp 73 -, was transformed to benomyl resistance, with plasmid pBT6, which harbors the *Neurospora crassa tub-2* gene.

The transformation protocol, based on treatment of protoplasts with polyethylene glycol and calcium chloride, was slightly modified in an attempt to improve the transformation efficiency. It was observed a 50- fold increase in the transformation frequency (transformants/ $\mu$ g of plasmid DNA). Transformants appeared at a frequency of up to 35 transformants/ $\mu$ g DNA, which is relatively high, comparing to transformations with the same gene in other species.

The influence of KCl and sorbitol, as osmotic stabilizers, in the growth of protoplasts and in the transformants response to benomyl was evaluated. The presence of KCl seems to restrict growth of lgp 73 protoplasts and colonies, as well as of transformant colonies. Colonies have their growth inhibited at lower and higher benomyl concentration, when KCl and sorbitol are present, respectively, in comparison with MC.

Nine transformants from different experiments were selected for Southern blot analysis in order to check the type of event involved, at the molecular level. The results point out the integration of pBT6 in the transformants. Except for one transformant, all of them showed complex hybridization patterns in the Southern blots where the fungal DNA was digested with *Pst* I (which cuts the plasmid once) and probed with the *tub-2* gene. They also shared a major band of 5.8 Kb, which

indicates integration of multiple copies of the plasmid at a single site, in the form of tandem repeats. Five out of nine transformants had the same complex band pattern, what suggests a preference for sites during integration.

Nucleases production was assessed in some strains of *Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans*. Extracellular nucleases production was detected only in *A. niger* strains. There were differences in the quantity and specificity of intracellular nucleases between the two species. These facts suggest that the absence of some types of nucleases in *A. nidulans* may partially explain the higher transformation frequencies obtained in this species.

## 9 . BIBLIOGRAFIA

- AKINS, R. A. & LAMBOWITZ, A. M. (1985). General method for cloning *Neurospora crassa* nuclear genes by complementation of mutants. Mol. Cell. Biol. 5: 2272-2278.
- ALIC, M., CLARK, E. K., KORNEGAY, J. R. & GOLD, M. H. (1990) Transformation of *Phanerochaete chrysosporium* and *Neurospora crassa* with adenine biosynthetic genes from *Schizophyllum commune*. Curr. Genet. 17: 305-312.
- AVALOS, J., GEEVER, R. F. & CASE, M. E. (1989) Bialaphos resistance as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa*. Curr. Genet. 16: 369-372.
- AZEVEDO, J. L. & COSTA, S. O. P. (1973) Exercícios práticos de genética. São Paulo, Editora Universidade de São Paulo, 288 p.
- BALL, C., LAURENCE, A. J., BUTLER, J. M. & MORRISON, K. B. (1978) Improvement in amyloglucosidase production following genetic recombination of *Aspergillus niger* strains. Eur. J. Microbiol. Biotechnol. 5: 95-102.
- BALL, T. K., SAURUGGER, P. N. & BENEDIK, M. J. (1987) The extracellular nuclease of *Serratia marcescens* and its secretion from *Escherichia coli*. Gene 57: 183-192.
- BALLANCE, D. J., BUXTON, F. P. & TURNER, G. (1983) Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 112: 284-289
- BALLANCE, D. J. & TURNER, G. (1985) Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. Gene 36: 321-331.
- BALLANCE, D. J. & TURNER, G. (1986) Gene cloning in *Aspergillus nidulans*: isolation of the isocitrate lyase gene (*acuD*). Mol. Gen.

Genet. 202:271-275.

BEGGS, J. (1978) Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. Nature 275:104-109.

BERGÈS, T. & BARREAU, C. (1989) Heat shock at an elevated temperature improves transformation efficiency of protoplasts from *Podospora anserina*. J. Gen. Microbiol. 135:601-604.

BERNIER, L., COOPER, R. M., CHARNLEY, A. K. & CLARKSON, J. M. (1989) Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to benomyl resistance. FEMS Microbiology Letters 60:261-265.

BERSE, B., DMOCHOWSKA, A., SKRZYPEK, M., WEGLENSKI, P., BATES, M. A. & WEISS R. L. (1983) Cloning and characterization of the ornithine carbamoyl transferase gene from *Aspergillus nidulans*. Gene 25:109-117.

BLAKEMORE E. J. A., DOBSON, M. J., HOCART, M. J., LUCAS, J. A. & PEBERDY, J. F. (1989) Transformation of *Pseudocercospora herpotrichoides* using two heterologous genes. Curr. Genet. 16:177-180.

BOEL, E., HJORT, I., SVENSSON, B., NORRIS, F., NORRIS, K. E. & FIIL N. P. (1984) Glucoamylases G1 and G2 from *Aspergillus niger* are synthesized from two different but closely related mRNAs. The EMBO J., 3:1097-102.

BONATELLI JR., R. & AZEVEDO, J. L. (1982) Improved reproducibility of citric acid production in *Aspergillus niger*. Biotech. Letters 4:761-766.

BORCK, K. & BRAYMER, H. D. (1974) The genetic analysis of resistance to benomyl in *Neurospora crassa*. J. Gen. Microbiol. 85:51-56.

BORGES, M. I. (1987) Técnicas de protoplastização e isolamento de DNA



de alto peso molecular de Aspergillus niger. Campinas, UNICAMP.112p.  
(Tese de Mestrado).

van BRUNT, J.(1986) Fungi: the perfect hosts? Bio/Technology  
4:1057-1062.

BULL, J. H. , SMITH, D. J. & TURNER, G.(1988) Transformation of  
*Penicillium chrysogenum* with a dominant selectable marker. Curr.  
Genet. 13: 377-382.

BUXTON, F. P. , GWYNNE, D. I. & DAVIES, R. W.(1985) Transformation of  
*Aspergillus niger* using the *arg B* gene of *Aspergillus nidulans*. Gene  
37: 207-214.

BUXTON, F. P. , GWYNNE, D. I. & DAVIES, R. W.(1989) Cloning of a new  
bidirectionally selectable marker for *Aspergillus* strains. Gene  
84: 329-334.

BUXTON F. P. , GWYNNE, D. I. , SIBLEY, S. & DAVIES R. W.(1987) Cloning and  
molecular analysis of the ornithine carbamoyl transferase gene of  
*Aspergillus niger*. Gene 60: 255-266.

BUXTON, F. P. & RADFORD, A.(1984) The transformation of micelial  
spheroplasts of *Neurospora crassa* and the attempted isolation of an  
autonomous replicator. Mol.Gen Genet. 196: 339-344

CALIL, M. R.(1988) Isolamento e análise genética de mutantes de  
*Aspergillus niger* com aumento na produção de amiloglicosidase.  
Campinas, UNICAMP, 108 p.(Tese de Mestrado).

CAMPBELL, E. I. , UNKLES, S. E. , MACRO, J. A. , van den HONDEL, C. ,  
CONTRERAS, R. & KINGHORN J. R. (1989) Improved transformation  
efficiency of *Aspergillus niger* using the homologous *nia D* gene for  
nitrate reductase. Curr. Genet. 16: 53-56.

CASE M. E.(1982) Transformation of *Neurospora crassa* utilising

- recombinant plasmid DNA. IN: HOLLAENDER, A., De MOSS R. D., KAPLAN, S., KONISKY, J., SAVAGE, D. & WOLIES, R. S. (eds). Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals. New York, London, Plenum Publishing Corporation, p.87-100.
- CASE, M. E., SCHWEIZER, M., KUSHNER, S. R. & GILES, N. H. (1979) Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5259-5263.
- CHUNG, C. T., NIEMELA, S. L. & MILLER, R. H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2172-2175.
- CLARK, L. & CARBON, J. (1978) Functional expression of cloned yeast DNA in *Escherichia coli*: specific complementation of argininosuccinate lyase (*arg H*) mutations. J. Mol. Biol. 120: 517-532.
- COOLEY R. N., FRANKLIN, F. C. H. & CATEN, C. E. (1990) Cotransformation in the phytopathogenic fungus *Septoria nodorum*. Mycol. Res. 94: 145-151.
- DEBETS, A. J. M., HOLUB, E. F., SWART, K. van den BROEK, H. W. J. & BOS, C. J. (1990b) An electrophoretic kariotype of *Aspergillus niger*. Mol. Gen. Genet. 224: 264-268.
- DEBETS, A. J. M., SWART, K. & BOS, C. J. (1990a) Genetic analysis of *Aspergillus niger*: isolation of chlorate resistance mutants, their use in mitotic mapping and evidence for an eight linkage group. Mol. Gen. Genet. 221: 453-458.
- DEKEYSER, R. A., CLAES, B., DE RICKE R. M. U., HABETS M. E., van MONTAGU M. C. & CAPLAN A. B. (1990) Transient expression in intact and organized rice tissues. The Plant Cell 2: 591-602.
- DEVCHAND, M. & GWYNNE, D. (1991) Expression of heterologous proteins in *Aspergillus*. J. Biotechnol. 17: 3-10.

- DHAWALE, S. S., PAIETTA, J. V. & MARZLUF, G. A. (1984) A new, rapid and efficient transformation procedure for *Neurospora*. Curr. Genet. 8: 77-79.
- DICKMAN, M. B. (1988) Whole cell transformation of the alfalfa fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. Curr. Genet. 14: 243-246.
- DUNNE, P. W. & OAKLEY, B. R. (1988) Mitotic gene conversion, reciprocal recombination and gene replacement at the *benA*,  $\beta$ -tubulin, locus of *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genet. 213: 339-345.
- FERNANDEZ-LARREA, J. & STAHL, U. (1989) Transformation of *Podospora anserina* with a dominant resistance gene. Curr. Genet. 16: 53-56.
- FINKELSTEIN, D. B., RAMBOSEK, J., CRAWFORD, M. S., SOLIDAY, C. L., McADA, P. C. & LEACH, J. (1989) Protein secretion in *Aspergillus niger*. IN: HERSHBERGER, C. L., QUEENER, S. W. & HEGEMAN, G. (eds.) Genetics and molecular biology of industrial microorganisms. Washington, D. C., American Society for Microbiology. p. 295-303.
- GALSTON, A. W., SAWHNEY, R. K., ALTMAN, A. & FLORES, H. (1979) Polyamines, macromolecular syntheses and the problem of cereal protoplast regeneration. IN: FERENCZY, L. & FARKAS, G. L. (eds) Advances in Protoplast Research: Proceedings of the International Protoplast Symposium, 5th, Szeged, Hungary. New York, Pergamon Press. p. 485-497.
- GEMS, D., JOHNSTONE, I. & CLUTTERBUCK, J. (1991) An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. Gene 98: 61-67.
- GOETTEL, M. S., LEGERR, R. J. S., BHAI, S., JUNG, M. K., OAKLEY, B. R., ROBERTS, D. W. & STAPLES, R. C. (1990) Pathogenicity and growth of *Metarhizium anisopliae* stably transformed to benomyl resistance. Curr. Genet. 17: 129-132.

- GOOSEN, T. , BLOEMHEUVEL, G. , GYSLER, C. , de BIE, D. A. , van den BROEK, H. W. J. & SWART, K. (1987) Transformation of *Aspergillus niger* using the homologous orotidine-5'-phosphate- decarboxylase gene. Curr. Genet. 11:499-503.
- HAMLYM, P. F. , BRADSHAW, R. E. , MELLON, G. M. , SANTIAGO, C. M. , WILSON, J. M. & PEDERBY, F. (1981) Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. Enzyme and Microb. Tech. 3:321-325.
- HANAHAN, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166:557-580.
- van HARTINGSVELDT, W, MATTERN, I. E. , van ZEIJL, C. M. J. , POUWELS, P. H. & van den HONDEL, C. A. M. J. J. (1987) Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the *pyr G* gene. Mol. Gen. Genetics 206:71-75.
- HENSON, J. M. , BLAKE, N. K. & PILGERAM, A. L. (1988) Transformation of *Gaeumannomyces graminis* to benomyl resistance. Curr. Genet. 14:113-117.
- HINNEN, A. , HICKS, J. B. & FINK, G. R. (1978) Transformation of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929-1933.
- HOLT, G. & SAUNDERS, G. (1985) Genetic modification of industrial microorganisms. IN: MOO-YOUNG, M. ed. Comprehensive biotechnology: the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine. Oxford, Pergamon Press, v. 1. p. 51-76.
- ITO, H. , FUKUDA, Y. , MURATA, K. & KIMURA, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol. 153:163-168.
- ISH-HOROWICZ, D. & BURKE, J. F. (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. Nucl. Acid Res. 9:2989-2998.

- JEFFRIES, C. D. , HOLTMAN, D. F. & GUSEE, D. G. (1957) Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. J. Bacteriol. 73: 590-591.
- JUNG, M. K. & OAKLEY, B. R. (1990) Identification of an amino acid substitution in the *ben A*,  $\beta$ -tubulin gene of *Aspergillus nidulans* that confers thiabendazole resistance and benomyl supersensitivity. Cell Motil. Cytoskel. 17: 87-94.
- KELLY, J. M. & HYNES, M. J. (1985) Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. EMBO J. 4: 475-479.
- KÜCK, U. , WALZ, M. MOHR, G. & MRACEK, M. (1989) The 5'-sequence of the isopenicillin N-synthase gene (*pcbC*) from *Cephalosporium acremonium* directs the expression of the prokaryotic hygromycin B phosphotransferase gene (*hph*) in *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 358-365.
- LUTHMAN, H. & MAGNUSSON, G. (1983) High efficiency polyoma DNA transfection of Chloroquine treated cells. Nucl. Acids Res. 11: 1295-1305.
- MACEDO, J. M. B. (1986) Avaliação do comportamento de *Humicola sp.* com vistas ao melhoramento genético para produção de celulases. Rio de Janeiro, UFRJ. 90 p. (Tese de Mestrado).
- MAY, G. S. , TSANG, M. L-S. , SMITH, H. , FIDEL, S. & MORRIS, N. R. (1987) *Aspergillus nidulans*  $\beta$ -tubulin genes are unusually divergent. Gene 55: 231-243.
- MINK, M. , HÖLTKE, H-J. , KESSLER C. & FERENCZY, L. (1990) Endonuclease-free, protoplast-forming enzyme preparation and its application in fungal transformation. Enzyme Microb. Technol. 12: 612-615.
- MOHR, G. , WILMANSKA, D. & ESSER, K. (1989) Analysis of *Aspergillus*

niger transformants for single site integration and vector recombination. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32:160-166.

MORRIS, N. R. (1989) The study of cytoskeletal proteins and mitosis using molecular genetics. Cell Motil. Cytoskel. 14:58-61.

MULLANEY, E. J. & KLICH, M. A. (1987) Survey of representative species of *Aspergillus* for regions of DNA homology to *Aspergillus nidulans* developmental genes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25:476-479.

ORBACH, M. J., PORRO, E. B. & YANOFSKY, C. (1986) Cloning and characterization of the gene for  $\beta$ -tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant marker. Mol. Cell. Biol. 6:2452-2461.

OSSANA, N. & MISCHKE, S. (1990) Genetic transformation of the biocontrol fungus *Gliocladium virens* to benomil resistance. Appl. Env. Microbiol. 56:3052-3056.

PALOMAR, J., GUASCH, J. F., REGUÉ, M. & VIÑAS, M. (1990) The effect of nuclease on transformation efficiency in *Serratia marcescens*. FEMS Microbiol. Letters 69:255-258.

PICKNET, T. M. & SAUNDERS, G. (1989) Transformation of *Penicillium chrysogenum* with selection for increased resistance to benomyl. FEMS Microbiol. Lett. 10:165-168.

PONTECORVO, G. (1952) Non-random distribution of multiple mitotic crossing-over among nuclei of heterozygous diploid *Aspergillus*. Nature 170:204-205.

PONTECORVO, G. & ROPER, J. A. (1952) Genetic analysis without sexual reproduction by means of poliploidy in *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. 6:VII.

PONTECORVO, G., ROPER, J. A. & FORBES, E. (1953a) Genetic recombination

- without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. J. Gen. Microbiol. 8:198-210.
- PONTECORVO, G. , ROPER, J. A. , HEMMONS, L. M. , MacDONALD, K. D. & BUFTON, A. W. J. (1953b) The genetics of *Aspergillus nidulans* . Adv. Genetics 5:141-238.
- PUNT, P. J. , OLIVER, R. P. , DINGEMANSE, M. A. , POWELS, P. H. & van den HONDEL, C. A. M. J. J. (1987) Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. Gene 56:117-124.
- PUYET, A. , GREENBERG & LACKS, S. A. (1990) Genetic and structural characterization of End A - A membrane-bound nuclease required for transformation of *Streptococcus pneumoniae*. J. Mol. Biol. 213:727-738.
- RAEDER, U. & BRODA, P. (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Lett. Appl. Microbiol. 1:17-20.
- RAMBOSEK, J. & LEACH, J. (1987) Recombinant DNA in filamentous fungi: progress and prospects. CRC Critical reviews in Biotechnology 6:357-393.
- RAPER, K. B. & FENNELL, D. I. (1965) The genus Aspergillus. Baltimore, The Willians & Wilkins Company, 686 p.
- RODRIGUEZ, R. J. & YODER, O. C. (1987) Selectable genes for transformation of the fungal plant pathogen *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum*) Gene 54:73-81.
- SAMBROOK, J. , MANIATIS, T. & FRITSCH, E. F. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. .
- SCHWEIZER, M. , CASE, M. E. , DYKSTRA, C. C. , GILES, N. H. & KUSHNER, S. R. (1981) Identification and characterization of

- recombinant plasmids carrying the complete *qa* gene cluster from *Neurospora crassa* including the *qa-1*<sup>+</sup> regulatory gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5086-
- SEIP, E. R., WOLOSHUK, C. P., PAYNE, G. A. & CURTIS, S. E. (1990) Isolation and sequence analysis of  $\beta$ -tubulin gene from *Aspergillus flavus* and its use as a selectable marker. Appl. Env. Microbiol. 56:3686-3692.
- SMITH, J. E. & PATEMAN, J. A. (1977) Genetics and Physiology of Aspergillus. London, Academic Press. 552 p.
- STOHL, L. L. & LAMBOWITZ, A. M. (1983) Construction of a shuttle vector for the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1058-1062.
- TILBURN, J., SCAZZOCHIO, C., TAYLOR, G. G., ZABICKY-ZISSLAN, J. H., LOCKINGTON, R. A. & DAVIES, R. W. (1983) Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. Gene 26:205-221.
- TIMBERLAKE, W. E. & MARSHALL, M. A. (1989) Genetic engineering of filamentous fungi. Science 244:1313-1317.
- TUDZINSKY, P., STAHL, U. & ESSER, K. (1980) Transformation to senescence with plasmid like DNA in the ascomycete *Podospora anserina*. Curr. Genet. 2:181-184.
- UNKLES, S. E., CAMPBELL, E. I., CARREZ, D., GRIEVE, C., CONTRERAS, R., FIERS, W., van den HONDEL, C. A. M. J. J. & KINGHORN, J. R. (1989) Transformation on *Aspergillus niger* with the homologous nitrate reductase gene. Gene 78:157-166.
- VALENT, G. U. (1985) Isolamento e análise genética de mutantes com alteração na produção de amiloqlcosidase em Aspergillus niger. Campinas, UNICAMP. 113 p. (Tese de Mestrado).
- VOLLMER, S. J. & YANOFSKY, C. (1986) Efficient cloning of genes of *Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4869-4873.



- WARD, M. (1990) Production of calf chimosin by *Aspergillus awamori*.  
IN: HERSHBERGER, C. L., QUEENER, S. N. & HEGEMAN, G. (eds.) Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms.  
Washington, D. C. . p. 288-294.
- WARD, M., WILKINSON, B. & TURNER, G. (1986) Transformation of  
*Aspergillus nidulans* with a cloned oligomycin-resistant ATP-synthase  
subunit 9 gene. Mol. Gen. Genet. 202: 265-270.
- WARD, M., WILSON, L. J., CARMONA, C. L. & TURNER, G. (1988) The *oli* C3 gene  
of *Aspergillus niger*: isolation, sequence and use as a selectable  
marker for transformation. Curr. Genet. 14: 37-42.
- WARD, M., WILSON, L. J., KODAMA, K. H., REY, M. W., & BERKA, R. M. (1990)  
Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression as a  
glucoamylase-chymosin fusion. Bio/Technology 8: 435-340.
- WEATHERBEE, J. & MORRIS, N. R. (1984) *Aspergillus* contains multiple  
tubulin genes. J. Biol. Chemistry 259: 15452-15459.
- WIENHUES, U., HOSOKAWA, K., HOVELER, A., SIEGMANN, B. &  
DOERFLER, W. (1987) A novel method for transfection and expression of  
reconstituted DNA-protein complexes in eukaryotic cells. DNA  
6: 81-89.
- YELTON, M. M., HAMER, J. E. & TIMBERLAKE, W. E. (1984) Transformation of  
*Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. Proc. Natl. Acad. Sci.  
USA 81: 1470-1474.

## 10. ABREVIATURAS

São aqui listadas as abreviaturas usadas para algumas soluções e compostos, descritas em MATERIAL e MÉTODOS, e citadas em outras partes do trabalho.

AATC - ácido aurintricarboxílico

DNA EA - DNA de esperma de arenque

KCa - KCl 0,6 M; CaCl<sub>2</sub> 50 mM.

MC - meio completo para *Aspergillus*

MCS - meio completo simplificado

MM - meio mínimo para *Aspergillus*

STC - sorbitol 1,2 M;

TM - Tris-Cl 0,1 M pH 8; MgCl<sub>2</sub> 50 mM