

**JOÃO BATISTA RIBEIRO**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM  
POLIGALACTURONASES E TRANSFORMAÇÃO DE *Penicillium*  
*expansum***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2001

**JOÃO BATISTA RIBEIRO**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM  
POLIGALACTURONASES E TRANSFORMAÇÃO DE *Penicillium*  
*expansum***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”

**APROVADA:** 19 de Março de 2001

---

Profa. Marisa Vieira de Queiroz  
(Conselheira)

---

Prof. Jorge Luiz Cavalcante Coelho  
(Conselheiro)

---

Profa. Flávia Maria Lopes Passos

---

Dra. Virgínia Maria Chaves Alves

---

Profa. Elza Fernandes de Araújo  
(Orientadora)

A Deus.  
Aos meus pais,  
À minha noiva Márcia,  
Aos meus irmãos Adilson, Marlúcia e Lucimar

## **AGRADECIMENTO**

A Deus, pela presença constante e pelas orações sempre respondidas.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade oferecida para realização deste curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pelo apoio financeiro imprescindível à realização deste trabalho.

À professora Elza Fernandes de Araújo, pela orientação segura, pelo incentivo constante e pelo exemplo de vida e profissionalismo.

À professora Marisa Vieira de Queiroz, pelo carinho, pelos ensinamentos e conselhos durante a realização deste trabalho.

Ao professor Jorge Luiz Cavalcante Coelho, pelos conselhos e apoio.

À Doutora Virgínia Maria Chaves Alves, pela participação na banca de defesa de tese e, especialmente, pelas dúvidas esclarecidas.

À professora Flávia Maria Lopes Passos, por tão prontamente ter aceito compor a banca de defesa de tese, pelo carinho e ensinamentos.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, pela dedicação dispensada aos alunos.

À Laura, Nilcéa e Dona Aparecida, por todo o empenho, profissionalismo e pela amizade.

À minha noiva Márcia, pelo incentivo e companheirismo que muito contribuíram para a realização deste curso.

Aos meus pais, pelo carinho, pelo cuidado e ensinamentos abundantes em todos os momentos da vida, e, sobretudo, pela confiança depositada em mim.

Ao meu irmão Adilson, pela amizade e pelo exemplo de determinação e coragem.

Às minhas queridas irmãs Marlúcia e Lucimar, pela atenção e carinho sempre dispensados.

À minha irmã Maria Inês, pelo cuidado e amizade.

Aos meus irmãos Nilson (*n memoriam*), Preta, Nica e Zé, por tudo que representam para mim.

À toda minha família, em especial aos meus tios Genadir e Norminda, pela hospitalidade, pelo carinho e confiança.

À Andréa Barros de Oliveira Ribon, pelo companheirismo e pela ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos meus irmãos em Cristo, da Igreja Cristã Maranata, pelo carinho e pelas muitas intercessões.

À Taís, pela grande amizade, pela ajuda nos momentos difíceis e pelos momentos agradáveis de convivência.

À Denise, Patrícia, Simone, Adalgisa e Irene, um agradecimento especial pela amizade e apoio constantes.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos, Luciana, Francis, Jorge, Jildete, Tânia, Júpiter, Maurílio, Klédna, Marcos e Rodrigo, pela ajuda e pelos agradáveis momentos de convivência.

Ao Eustáquio, pela assistência, especialmente na minha chegada em Viçosa.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia José Reinaldo, José Carlos, Arlindo, Cezário, Raimundo e, em especial, Evandro, Danilo, Paulo Rosa e “Toninho”, pela ajuda e pelo carinho.

Aos amigos dos Laboratórios de Fisiologia, Micorrizas, Microbiologia de Alimentos e Microbiologia Industrial, pela amizade e pelos momentos agradáveis na cozinha do cafezinho.

Aos meus amigos da Aldeia (MG), minha terra natal, dos quais me lembro sempre com muita saudade.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional.

## **BIOGRAFIA**

JOÃO BATISTA RIBEIRO, filho de João Raimundo Moreira e Geni Rosa de Souza, nasceu em 08 de junho de 1974, em Aldeia, município de Conselheiro Pena, MG.

Ingressou na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, em março de 1995, concluindo a graduação em Ciências Biológicas em março de 1999.

Em abril de 1999, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, no Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

## ÍNDICE

<b>RESUMO.....</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1. Microrganismos e plasmídeos .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2. Manutenção e estoque das culturas e preparo do inóculo .....</b>	<b>14</b>
<b>3.3. Extração de DNA total de fungos em grande escala .....</b>	<b>14</b>
<b>3.4. Isolamento de fagos recombinantes contendo genes de         poligalacturonases a partir do banco genômico de <i>P. expansum</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>3.5. Caracterização dos plasmídeos e fagos recombinantes.....</b>	<b>16</b>
<b>3.6. Seqüenciamento .....</b>	<b>16</b>
<b>3.7. Obtenção de protoplastos.....</b>	<b>16</b>
<b>3.8. Transformação de protoplastos de <i>P. expansum</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>3.9. Purificação monospórica dos transformantes.....</b>	<b>17</b>
<b>3.10. Caracterização dos transformantes quanto à estabilidade mitótica</b>	<b>17</b>
<b>3.11. Análise dos transformantes quanto à produção de pectinase total em         meio sólido .....</b>	<b>18</b>
<b>3.12. Determinação da atividade de poligalacturonase em meio líquido ..</b>	<b>18</b>
<b>3.13. Caracterização molecular dos transformantes .....</b>	<b>19</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>21</b>

4.1. Seqüenciamento do gene <i>pepg1</i> .....	21
4.2. Isolamento e caracterização de genes que codificam poligalacturonases em <i>Penicillium expansum</i> .....	23
4.3. Transformação de <i>P. expansum</i> com o gene <i>pepg1</i> .....	37
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50

## RESUMO

RIBEIRO, João Batista, M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2001.  
**Isolamento e caracterização de genes que codificam poligalacturonases e transformação de *Penicillium expansum*.** Professora Orientadora: Elza Fernandes de Araújo. Conselheiros: Marisa Vieira de Queiroz e Jorge Luiz Cavalcante Coelho.

A seqüência completa de nucleotídeos do gene *pepg1* foi determinada. A análise desta seqüência mostrou que este gene apresenta dois possíveis introns de 58 pares de bases, um potencial cis elemento TATA na posição -151 e um potencial CAAT Box na posição -273. A região codificadora contém 1110 pb, após a retirada dos introns, e a partir dessa seqüência foi deduzida uma proteína com 370 aminoácidos. A seqüência de aminoácidos apresenta grande homologia com poligalacturonases de outros fungos filamentosos, com massa molecular deduzida de 38,4 KDa e ponto isoelétrico teórico de 8,31. Quatro fagos recombinantes foram isolados a partir do banco genômico de *Penicillium expansum*, utilizando-se como sonda um fragmento de DNA de 1,6 Kb contendo o gene *pgg1* de *P. griseoroseum*, os quais foram denominados  $\lambda$ PEPG1,  $\lambda$ PEPG2,  $\lambda$ PEPG3 e  $\lambda$ PEPG4. Os fagos  $\lambda$ PEPG3 e  $\lambda$ PEPG4 apresentaram fragmentos genômicos clonados de 14,5 e 16,6 Kb. Fragmentos de DNA de *Bam* HI de 3,6 e 5,1 Kb dos fagos  $\lambda$ PEPG3 e  $\lambda$ PEPG4 respectivamente, que hibridizaram com a sonda, foram subclonados no vetor pBluescript<sup>®</sup> SK+,

originando os plasmídeos recombinantes pEPG3 e pEPG4. O gene *pepg1* foi usado na transformação de protoplastos do mutante *nia/pab/faw* de *P. expansum* na presença de polietilenoglicol e CaCl<sub>2</sub>. Para a seleção dos transformantes, em meio mínimo contendo nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, foi usado o gene *nia* de *Fusarium oxysporum*. Cento e cinquenta e cinco, dentre os 234 transformantes obtidos, foram considerados estáveis quanto ao gene de nitrato redutase, e foram analisados quanto à produção de pectinase total em meio mineral sólido tamponado contendo pectina. Foram observadas linhagens transformantes apresentando halos de degradação da pectina maiores e menores que os da linhagem selvagem e mutante, mas a maioria dos transformantes apresentou resultado similar ao dessas linhagens. Cinquenta e três transformantes foram caracterizados quanto à produção de poligalacturonase. Foram observados transformantes com atividade de PG inferior à da linhagem selvagem, mas a maioria dos transformantes analisados apresentou aumento na atividade dessa enzima, variando de 10 a 89 % em relação à linhagem selvagem. A hibridização do DNA total dessas linhagens, clivado com enzimas de restrição, revelou a ocorrência de integração heteróloga e de múltiplas cópias em tandem do gene *pepg1* no genoma de *P. expansum*.

## ABSTRACT

RIBEIRO, João Batista, M. S., Universidade Federal de Viçosa, march, 2001.  
**Isolation and characterization of genes coding for polygalacturonases and transformation of *Penicillium expansum*.** Adviser: Elza Fernandes de Araújo. Committee members: Marisa Vieira de Queiroz and Jorge Luiz Cavalcante Coelho.

The nucleotide sequence of a polygalacturonase encoding gene (*pepg1*) from *Penicillium expansum* was determined. Putative TATA and CAAT motifs were seen at position -151 and -273, respectively, from the translation start site. The *pepg1* gene encodes a predicted protein of 370 aas after splicing of two introns of 58 bp. The estimated molecular mass of the polypeptide is 38.4 KDa with pI of 8.31. Multiple sequence alignment of PG protein sequences revealed high homology between PEPG1 and PG from several filamentous fungi. In order to isolate other PG genes a genomic bank from *Penicillium expansum* was reprobated with a 1.6 Kb DNA fragment which corresponds to a PG gene from *P. griseoroseum*. Four recombinant phages were isolated and designated  $\lambda$ PEPG1,  $\lambda$ PEPG2,  $\lambda$ PEPG3 and  $\lambda$ PEPG4. DNA fragments of 3.6 Kb and 5.1 Kb from phages  $\lambda$ PEPG3 and  $\lambda$ PEPG4, respectively, were subcloned into pBluescript<sup>®</sup> SK+ vector. These plasmids were named pEPG3 and pEPG4. Protoplasts of the mutant strain *nia/pab/faw* of *P. expansum* were transformed with the *pepg1* gene in the presence of polyethylene glycol and CaCl<sub>2</sub>. Transformants were selected in

minimal medium containing sodium nitrate as nitrogen source, using the *nia* gene of *Fusarium oxysporum*. One hundred and fifty-five transformants among 234, stably maintained the *nia* gene and were screened for PG overproduction by a plate assay on minimal medium containing pectin. Most transformants showed halo size similar to the mutant and wild-type strains, although smaller and larger halos were also detected. The PG production of fifty-five transformants was analyzed and some transformants had lower PG activity when compared to the wild-type strain. However, most transformants produced significantly more PG than the wild type. Southern analysis of the transformed strains detected heterologous and tandem integration of multiple copies of the *pepg1* gene.

## 1. INTRODUÇÃO

As poligalacturonases estão envolvidas na degradação da pectina, um polissacarídeo complexo encontrado na lamela média e parede celular primária de vegetais superiores. Estas enzimas são de grande interesse econômico devido à sua potencialidade para aplicação industrial. Na indústria alimentícia, as poligalacturonases, juntamente com as pectinesterases, vêm sendo utilizadas principalmente no processamento de sucos, e apresentam grande potencial para aplicação na indústria têxtil, para a desengomagem de fibras vegetais em fabricação de tecidos.

Vários isolados de fungos foram analisados quanto à produção de pectinases e celulases. Dentre os isolados testados, *Penicillium expansum* foi considerado promissor para produção de pectinases, pois, apresentou baixa atividade celulolítica. Além disso, recentemente, foi demonstrado que essa linhagem de *P. expansum* não produz a micotoxina patulina sob as condições de cultivo testadas, o que abre novas perspectivas para uso desta linhagem na produção de enzimas para aplicação em indústria alimentícia.

O isolado selvagem de *P. expansum* apresenta considerável atividade pectinolítica; no entanto, além da otimização das condições de cultivo, são necessários trabalhos visando à obtenção de linhagens superprodutoras destas enzimas, para possibilitar a aplicação industrial. Neste contexto, diversos trabalhos vêm sendo realizados com este fungo para melhorar a produção das diversas enzimas do complexo pectinolítico.

*P. expansum* produz pelo menos três formas de poligalacturonase, sendo que somente o gene correspondente a uma delas foi isolado. A ocorrência de famílias multigênicas codificando poligalacturonases parece ser comum nos fungos filamentosos estudados até o momento. Considerando este fato, a elucidação da organização e regulação desses genes é de fundamental importância, quando o objetivo é a manipulação desses genes visando ao melhoramento genético de linhagens fúngicas.

Uma estratégia que pode ser usada no melhoramento genético de *P. expansum* é o aumento do número de cópias do gene que codifica PG no genoma deste fungo por meio da técnica de transformação. Esta estratégia é eficaz e já foi usada com êxito no melhoramento genético de outros fungos comercialmente importantes. No entanto, para aplicação desta estratégia, é necessário o isolamento e a caracterização do gene, pois é fundamental conhecer a organização e o controle da expressão do gene que codifica a enzima de interesse. Tal conhecimento permite direcionar a escolha do gene para uso na transformação, visando obter transformantes com alto número de cópias desse gene no genoma e aumento da produção da enzima. Para que o processo de produção de enzima seja viável, é necessário que o gene a ser usado na transformação seja eficientemente expresso, possibilitando a produção de altos níveis da enzima, preferencialmente com utilização de substrato de menor custo, não requerendo indução.

Considerando a grande potencialidade do emprego industrial de poligalacturonases, este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar genes de poligalacturonases em *P. expansum*, transformar *P. expansum* com o gene de poligalacturonase *pepg1*, caracterizar os transformantes quanto ao padrão de integração do gene no genoma e à produção de poligalacturonase.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

*Penicillium expansum* produz múltiplas formas de poligalacturonase (MIRANDA, 1997) que, juntamente com outras enzimas pectinolíticas, estão envolvidas na degradação da pectina, um polissacarídeo complexo encontrado na lamela média e parede primária de plantas (VRIES *et al.*, 1986). As enzimas pectinolíticas são produzidas por diversos organismos incluindo bactérias, leveduras, fungos filamentosos e plantas. No ambiente natural, as poligalacturonases são importantes no processo de infecção do tecido vegetal, sendo consideradas como fatores de virulência de diversos microrganismos, tais como *Colletotrichum gloeosporoides* (COOPER *et al.*, 1998), *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 (RODRIGUEZ-PALENZUELA *et al.*, 1991) e diversos fungos fitopatogênicos (GIOVANNONI *et al.*, 1990), além de participarem de processos importantes na fisiologia vegetal como, por exemplo, no amadurecimento de frutos.

As pectinases apresentam grande potencial para uso nas indústrias têxtil e alimentícia. Na indústria têxtil, elas podem ser usadas no processo de desengomagem de fibras naturais, que consiste na degradação da pectina da lamela média, resultando na desintegração de tecidos devido à separação das células (BAILEY e PESSA, 1990). Desse modo, as enzimas pectinolíticas estão

entre as enzimas mais importantes no processo de obtenção e purificação de fibras celulósicas para fabricação de tecidos.

A etapa de desengomagem vem sendo realizada por meio de processo mecânico e a partir de tratamento químico, com o uso de soda cáustica, em altas temperaturas. O emprego de enzimas pectinolíticas para liberação das fibras de celulose apresenta vantagens sobre o processo químico porque não polui o ambiente, reduz o consumo de produtos químicos e de energia e, ainda, possibilita a reutilização da enzima (SHARMA, 1987).

Considerando que os fungos filamentosos são excelentes produtores de enzimas extracelulares (SÓLIS *et al.*, 1990), alguns trabalhos foram realizados para a seleção de isolados fúngicos produtores de pectinases (BARACAT *et al.*, 1989; ALAÑA *et al.*, 1989; LOPES-SHIKIDA, 1995). Dentre os isolados testados, destacaram-se espécies do gênero *Penicillium*, pois, além de apresentarem excelente atividade pectinolítica, praticamente não apresentaram atividade de celulasas, que poderiam atuar enfraquecendo as fibras celulósicas (BARACAT *et al.*, 1989). Foi demonstrado ainda que, dentre todos os isolados testados, *P. expansum* e *P. griseoroseum* apresentaram as maiores atividades de poligalacturonase e pectina liase, respectivamente. Devido a estas características, estas espécies vêm sendo estudadas visando aplicação industrial. Outra característica importante da linhagem de *P. expansum* isolada em Viçosa, recentemente observada por FERREIRA (2001), é o fato de não produzir a micotoxina patulina nas condições de cultivo testadas, mostrando o seu potencial emprego na indústria alimentícia.

Recentemente, KAWANO *et al.* (1999) demonstraram que *P. frequentans* produz onze formas de poligalacturonases, quando crescido em meio líquido suplementado com pectina, sendo sete poligalacturonases extracelulares e quatro intracelulares. Quando *P. frequentans* foi cultivado em meio contendo glicose como única fonte de carbono, apenas uma PG foi produzida e secretada no meio de cultura. Essa enzima foi caracterizada como uma endopoligalacturonase glicosilada, com massa molecular de aproximadamente 20 KDa e ponto isoelétrico de 5,6. A adição de pectina no meio de cultura

proporcionou aumento na produção dessa enzima, sugerindo que sua síntese, apesar de ser constitutiva, pode ser controlada por indução por oligogalacturonatos ou seus metabólitos.

A aplicação do complexo pectinolítico na indústria requer a obtenção de isolados com alta produção enzimática. Portanto, além dos estudos fisiológicos, é necessário o desenvolvimento de estudos genéticos que possibilitem o melhoramento das linhagens selecionadas (FINCHAM, 1989). Diversas estratégias podem ser empregadas no melhoramento genético de organismos, tais como: mutação e recombinação seguidas de seleção e o aumento do número de cópias de genes no genoma.

Uma estratégia que vem sendo utilizada no melhoramento de espécies do gênero *Penicillium* é a indução de mutação com posterior seleção de linhagens com aumento na atividade pectinolítica. FERNANDES-SALOMÃO *et al.* (1996) obtiveram mutantes de *P. expansum* com aumento de quase duas vezes na produção de pectina liase e poligalacturonase, utilizando nitrosoguanidina e luz ultravioleta como agentes mutagênicos. Esta mesma estratégia foi usada no melhoramento genético de *A. niger*, por LEUCHTENBERGER e MAYER (1991), que relataram a obtenção de mutantes superprodutores de pectinases com aumentos de 2 a 3 vezes na atividade de endo e exo-PG, pectinesterase e pectina liase neste fungo, quando comparado com a linhagem selvagem.

Visando ao melhoramento da produção de pectinases via processo parassexual, foram isolados diversos mutantes auxotróficos e morfológicos de *P. expansum* (LANA, 1999) e *P. griseoroseum* (BRITO, 1998). Em seguida, as linhagens mutantes foram caracterizadas quanto à produção de pectinases em meio sólido contendo pectina, e os mutantes com atividade pectinolítica igual ou superior ao isolado selvagem foram selecionados para uso em cruzamentos para obtenção de diplóides e recombinantes com aumento na produção destas enzimas.

Outra estratégia que vem sendo usada no melhoramento de espécies de *Penicillium* para a produção de pectinases é a manipulação de genes, e uma etapa fundamental deste processo é o isolamento e caracterização destes genes.

Poligalacturonases de origem fúngica têm sido estudadas há várias décadas, e atualmente muitos genes de endo e exo-poligalacturonases de numerosas espécies foram clonados. DIAS (1997) construiu um banco genômico e isolou um dos genes que codifica poligalacturonase em *P. expansum*. Também dois genes de PG de *P. olsonii* foram isolados e caracterizados (WAGNER *et al.*, 2000). As regiões codificadoras dos genes *pg1* e *pg2* de *P. olsonii* contêm 1113 e 1143 pares de bases, respectivamente, sendo interrompidas por um íntron de 50 pares de bases (*pg1*) e por três íntrons (*pg2*) de 58, 52 e 54 pares de bases. As proteínas codificadas por *pg1* e *pg2*, provavelmente, consistem de 370 e 380 aminoácidos e apresentam similaridade de 53 a 65 e 47 a 64 % com endo-PGs de outros fungos, respectivamente. Dois possíveis sítios de glicosilação foram encontrados nas posições 248-250 e 301-303 para a proteína PG1, e dois nas posições 287-289 e 311-313 para PG2. A massa molecular calculada para essas proteínas foi de 38,1 KDa (PG1) e 38,6 KDa (PG2), e o pI teórico para PG1 e PG2 foi, respectivamente, 6,8 e 4,5. RIBON *et al.* (1999) relataram o isolamento e caracterização de um gene que codifica PG em *P. griseoroseum*. Análise da seqüência de nucleotídeos deste gene revelou a presença de um possível TATA box na posição - 96 e uma região codificadora de 1251 pb com 2 íntrons apresentando 57 e 66 pares de bases. Este gene codifica uma proteína potencialmente com 376 aminoácidos, cuja seqüência deduzida apresenta um possível sítio de glicosilação no aminoácido 307. Neste mesmo trabalho, foi relatado que há indicações de pelo menos mais um gene de PG no genoma de *P. griseoroseum*, o qual está sendo caracterizado.

A partir de preparações comerciais de pectinases, várias enzimas de algumas espécies de *Aspergillus* foram purificadas e suas seqüências de aminoácidos parcialmente determinadas, possibilitando o isolamento dos genes correspondentes, tais como genes de pectinesterase (KHAHN *et al.*, 1990), pectina liase (GYSLER *et al.*, 1990, HARMSSEN *et al.*, 1990), pectato liase (DEAN e TIMBERLAKE, 1989a) e poligalacturonase (BUSSINK *et al.*, 1990, 1991ab; RUTTKOWSKI *et al.*, 1990).

BUSSINK *et al.* (1990) relataram a clonagem de um gene de *A. niger* que codifica a poligalacturonase mais abundante, dentre as cinco isoladas de uma preparação enzimática comercial. Esses pesquisadores demonstraram que uma seqüência de 4,1 Kb continha o gene de poligalacturonase II completo, cuja região codificadora é interrompida por um íntron de 52 pb, tendo diferentes unidades de leitura aberta e contendo codons de parada em todas as possíveis unidades de leitura. Este gene codifica uma proteína de massa molecular de 35 KDa com 362 aminoácidos e uma seqüência de 27 aminoácidos, antes do início da proteína processada, que apresenta todas as características de uma seqüência sinal para secreção. Em outro trabalho, BUSSINK *et al.* (1991a) utilizaram um fragmento de 1,2 Kb *Bam*HI/*Bgl*II do plasmídeo PGW1800, correspondente à maior parte da região estrutural e 200 pb da região promotora do gene de poligalacturonase II de *A. niger* N400, como sonda para isolar clones do banco genômico contendo o gene de poligalacturonase II de *A. tubigensis* NW756. O alinhamento das seqüências nucleotídicas, que codificam para poligalacturonase II nestes fungos, demonstrou que a estrutura dos genes é muito similar, que as seqüências de nucleotídeos são 83% idênticas, e assim como no gene *pgalII* de *A. niger* N400, a região codificadora de *pgalII* de *A. tubigensis* é interrompida por um único íntron de 52 pb. O gene *pgal* de *A. niger* N400 foi clonado e sequenciado (BUSSINK *et al.*, 1991b). A região promotora do gene *pgal* contém um possível TATA box na posição -152 em relação ao códon de início da tradução e um possível CAAT box na posição -218. Uma região rica em pirimidina está presente no gene *pgal* da posição -98 a -72, e a região codificadora apresenta dois íntrons, sendo um de 68 pares de bases (íntron B) localizado na mesma posição do íntron de *pgalII* e o outro de 52 pb.

Muitos genes de poligalacturonases de outras espécies também têm sido isolados e caracterizados, tais como: o gene *pecA* de *A. parasiticus* ATCC 163 (CARY *et al.*, 1995), os genes *pecA* e *pecB* de *A. flavus* (WHITEHEAD *et al.*, 1995), o gene *PGUI* de *Saccharomyces cerevisiae* IM1-8b (BLANCO e VILLA, 1998) e os genes *tpge 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7* (HONG e TUCKER *et al.*, 1998) de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Rutgers).

A atividade de poligalacturonase é considerada chave na degradação da pectina, atuando sobre o ácido pécico com grau de metilação abaixo de 60%. O ácido pécico é produzido por ação da pectina metil esterase (PME) sobre a pectina. Foi descrito o isolamento do cDNA de um gene de PME de *A. aculeatus* (CHRISTGAU *et al.*, 1996). Esse gene foi clonado num vetor de expressão de *Aspergillus* e usado na transformação de *A. oryzae* para a expressão heteróloga, purificação e caracterização da enzima. A PME I foi capaz de remover 75-85% dos grupos metil em pectina altamente metilada, e quando adicionada à pectina juntamente com poligalacturonases, uma rápida despolimerização foi observada. Para comparação, foram feitos ensaios enzimáticos apenas com poligalacturonases, sendo observada uma degradação bastante limitada do substrato metilado. Isso demonstrou que PME atua em sinergismo com as poligalacturonases na degradação da pectina da parede celular de plantas. Embora seja necessária a ação conjunta dessas duas enzimas, a taxa PME/poligalacturonase é também importante, pois, atividade muito alta de PME tornaria a desesterificação muito rápida, induzindo à formação de pectatos de cálcio insolúveis antes da hidrólise do ácido pécico pela poligalacturonase.

MIRANDA (1997) demonstrou que *P. expansum* produz pelo menos três formas de poligalacturonases, que foram denominadas poligalacturonases I, II e III. Essas enzimas foram parcialmente purificadas e caracterizadas, apresentando temperatura ótima de 50°C e pH ótimo igual a 5,0 (PGs II e III). Os valores de  $K_{m_{app}}$  para o ácido poligalacturônico foram 0,30 mg mL<sup>-1</sup> (PG I), 0,47 mg mL<sup>-1</sup> (PG II) e 1,30 mg mL<sup>-1</sup> (PG III), e os valores de  $V_{max_{app}}$  de poligalacturonase I, II e III foram, respectivamente, 0,01; 0,07 e 0,07 µmoles de açúcar redutor por minuto por µg de proteína. Poligalacturonases de outros organismos também têm sido purificadas e caracterizadas como, por exemplo, a endopoligalacturonase produzida por *Fusarium solani* (BLANCO, 1998), uma poligalacturonase de *A. japonicus* e poligalacturonases de *A. niger* (KESTER e VISSER, 1990; BUSSINK *et al.*, 1991).

Uma das estratégias que vêm sendo utilizadas no melhoramento de fungos filamentosos é a manipulação de genes visando ao aumento do número de

cópias no genoma e maior produção da enzima de interesse. Por meio da técnica de transformação, é possível aumentar o número de cópias de genes homólogos e, ou heterólogos no genoma, e promover sua expressão, etapas estas fundamentais no programa de melhoramento genético.

KUBICEK-PRANZ *et al.* (1991) obtiveram transformantes com maior atividade celulolítica em relação à linhagem selvagem, por meio do aumento do número de cópias do gene de celobiohidrolase em *Trichoderma reesei*. SOMEREN *et al.* (1991) relataram a obtenção de transformantes de *A. niger* com múltiplas cópias do gene *pelA* com superprodução da enzima pectina liase (PLA), em meio contendo pectina como única fonte de carbono. Esse gene foi também expresso em transformantes de *A. nidulans*, mesmo na ausência de pectina no meio de cultura e alta concentração de glicose. RUTTKOWSKI *et al.* (1991) relataram a transformação de *A. awamori* com o gene que codifica poligalacturonase em *A. niger* e cerca de 90% dos transformantes apresentaram aumentos de 2 a 6 vezes na atividade enzimática. BUSSINK *et al.* (1991) demonstraram que é possível a expressão heteróloga do gene *pgalII* de *A. niger* em *A. tubigensis* produzindo altos níveis de poligalacturonase. Também foram obtidos transformantes de *A. niger* com aumentos de dez vezes na produção de poligalacturonase, quando o gene homólogo *pgalII* foi utilizado na transformação (BUSSINK *et al.*, 1992). KHANH *et al.* (1992) realizaram a transformação de *A. niger* com o gene homólogo que codifica pectina metil esterase, obtendo transformantes com atividade enzimática 20 vezes superior à da linhagem selvagem.

Considerando que o processo de transformação não ocorre espontaneamente em fungos, faz-se necessário o uso de técnicas especiais para transformação desses organismos. Dentre as técnicas usadas na transformação de protoplastos de fungos, a que utiliza o polietilenoglicol merece especial destaque (FINCHAM, 1989), constituindo um método amplamente utilizado para transformação de muitos gêneros de fungos filamentosos, exemplificado por *Aspergillus* (BALLANCE e TURNER, 1983; YELTON *et al.*, 1984; TURNER e BALLANCE, 1985), *Penicillium* (DURAND *et al.*, 1992; QUEIROZ *et al.*,

1998) e *Trichoderma* (HERRERA-ESTRELA *et al.*, 1990). Além desta técnica, outros métodos têm sido empregados na transformação de diversos fungos como, por exemplo, a utilização de cloreto de lítio na transformação de esporos intactos de *Neurospora* sp. (DHAWALE *et al.*, 1984) e eletroporação de conídios germinados de *Humicola grisea* (DANTAS-BARBOSA, *et al.*, 1998).

Considerando que a obtenção e regeneração de protoplastos podem ser trabalhosas, além de envolverem gastos adicionais e, às vezes, constituírem etapas limitantes do processo, é interessante o desenvolvimento de sistemas para transformação de células intactas. Um procedimento envolve a exposição de conídios intactos ao DNA, na presença de acetato de lítio para induzir a absorção do DNA pela célula. Este procedimento tem sido usado com sucesso na transformação de *Neurospora crassa* (DHAWALE *et al.*, 1984) e *Coprinus cinereus* (BINNINGER *et al.*, 1991). Um outro método de transformação, envolvendo células fúngicas intactas, é o bombardeamento de partículas (biolística ou biobalística), em que partículas (microprojéteis) de tungstênio revestidas com DNA são aceleradas em alta velocidade para o interior de conídios ou de hifas. Esta técnica é largamente utilizada para a transformação de espécies vegetais, e já foi utilizada na transformação de algumas espécies de fungos como *S. cerevisiae* (ARMALEO *et al.*, 1990) e *Magnaportha grisea* (KLEIN *et al.*, 1992). A biobalística é tecnicamente simples e pode ser usada para transformar qualquer espécie de fungo, incluindo aquelas espécies que dificilmente seriam transformadas por métodos convencionais. Pelo fato de requerer o uso de equipamento indisponível em muitos laboratórios, esta técnica ainda não é largamente utilizada na transformação de fungos (RIACH e KINGHORN, 1996).

Para a seleção das células transformadas, três diferentes tipos de marcadores podem ser utilizados, isto é, marcadores de seleção dominantes, genes que codificam um tRNA supressor e marcadores auxotróficos. A maioria dos marcadores de seleção dominantes baseiam-se na resistência a drogas, sendo amplamente aplicados em diferentes espécies de fungos como, por exemplo, resistência ao benomil (MAY *et al.*, 1985), resistência à higromicina B

(QUEENER *et al.*, 1985), dentre outros. Inicialmente, o principal método de seleção dos transformantes foi a conversão de mutantes auxotróficos em linhagens prototróficas (FINCHAM, 1989). Obviamente, um pré-requisito para o uso deste método de seleção é a presença de um mutante apropriado. Mutações nos genes que codificam enzimas para a biossíntese de uridina e para utilização de nitrato são consideradas de grande importância para o desenvolvimento de sistemas de transferência de genes, em espécies que não são geneticamente bem caracterizadas, pelo fato de conferirem resistência aos análogos inibitórios ácido-5-fluoro-orótico e clorato de sódio (UNKLES *et al.*, 1989). Além da relativa facilidade no isolamento de mutantes *niaD* em vários gêneros de fungos filamentosos, muitos genes de nitrato redutase já foram clonados e caracterizados (DIOLEZ *et al.*, 1993; BANKS *et al.*, 1993; AVILA *et al.*, 1995; TUDZYNSKI *et al.*, 1996; HAAS *et al.*, 1996 CUTLER *et al.*, 1998; TORRES, 2001), o que torna possível o estabelecimento de sistemas de transformação para as espécies de interesse.

Alguns trabalhos foram realizados visando o estabelecimento de sistemas de transformação em fungos filamentosos, tais como: transformação homóloga do fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* com o gene *nia*, que codifica a nitrato redutase (DIOLEZ *et al.*, 1993); transformação heteróloga de um mutante de *P. griseoroseum* para a assimilação de nitrato com o gene *nia* de *F. oxysporum* (QUEIROZ *et al.*, 1998) e transformação de *P. expansum* com um gene que confere resistência ao benomil (DIAS *et al.*, 1999 ).

Outro ponto que deve ser levado em consideração, em programas de melhoramento que visam ao aumento de produção de enzimas por aumento do número de cópias dos genes correspondentes, é o controle da expressão dos genes. BUSSINK *et al.* (1991) demonstraram que a expressão do gene que codifica a poligalacturonase II em transformantes de *A. niger* é fortemente regulada e, provavelmente, em nível de transcrição. De acordo com SOMEREN *et al.* (1991), a expressão do gene *pelA* que codifica a enzima PLA de *A. niger* é também regulado em nível de transcrição. Uma vez que o nível de mRNA tenha sido aumentado na célula, uma outra preocupação refere-se à sua estabilidade.

Experimentos realizados com células de mamíferos e leveduras e em sistemas livres de células mostraram que, pelo menos, cinco componentes estruturais do mRNA influenciam sua estabilidade: o Cap 5' 7-metilguanossina trifosfato, cauda 3'-poli(A), o comprimento do mRNA, modificação postranscricional de bases, como metilação de resíduos de adenina ou conversão de adeninas a inosinas e seqüências estabilizadoras e desestabilizadoras do mRNA (SANTIAGO *et al.*, 1986; BROWN *et al.*, 1988; ROSS, 1995). A desestabilização, e conseqüente degradação do mRNA, pode ser influenciada pela estrutura do mRNA (estrutura do polissoma) ou por alto conteúdo de codons raros, que resulta em pausa da tradução e subseqüente degradação do transcrito (ROSS, 1995). No entanto, a estabilidade do mRNA ainda não foi estudada em fungos filamentosos (GOUKA *et al.*, 1997).

O nível de mRNA não é o único fator responsável pelo aumento na expressão de uma proteína particular. Segundo GOUKA *et al* (1997), a eficiência na secreção de proteínas heterólogas é também determinada em nível postraducional. A via de secreção de proteínas envolve muitos processos complexos realizados em vários compartimentos celulares. No entanto, a dificuldade na secreção pode ser minimizada, quando a proteína em questão é homóloga.

Considerando que a transformação genética é promissora no melhoramento de fungos filamentosos, faz-se necessário o desenvolvimento e otimização de sistemas de transformação para o fungo *P. expansum*, pois trata-se de uma espécie ainda pouco conhecida sob o ponto de vista da genética molecular.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

#### 3.1. Microrganismos e plasmídeos

Foram utilizadas a linhagem selvagem de *P. expansum*, isolada no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, e a linhagem mutante *nia/pab/faw* (LANA, 1999), deste mesmo fungo, obtida no laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO/Universidade Federal de Viçosa. A linhagem mutante *pab/nia/faw* apresenta uma mutação auxotrófica para a vitamina ácido *p*-aminobenzóico (*pab*), outra para a utilização de nitrato (*nia*) e uma mutação morfológica para coloração dos conídios (*faw*), que são marrom-claros. Essa linhagem foi utilizada nos experimentos de transformação.

Para transformação do fungo, foram utilizados o plasmídeo pNH24 (DIOLEZ *et al.*, 1993), contendo o marcador seletivo (gene *niaD* de *F. oxysporum*) e o plasmídeo co-transformante pPE15 (DIAS, 1997), contendo o gene de poligalacturonase de *P. expansum*. *Escherichia coli* K12 LE392 foi utilizada no “screening” do banco genômico, e *E. coli* DH5 $\alpha$  foi usada para a

amplificação dos plasmídeos. Para o crescimento de *E. coli*, foi utilizado o meio Luria-Bertani (SAMBROOK *et al.*, 1989). Os fragmentos de DNA foram subclonados no vetor pBluescript<sup>®</sup> SK+ (STRATAGENE), segundo instruções do fabricante.

### 3.2. Manutenção e estoque das culturas e preparo do inóculo

Os fungos foram cultivados a 25°C por 5 dias, em placas de Petri contendo meio completo sólido (6,0 g NaNO<sub>3</sub>; 1,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g KCl; 0,5 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,01 g FeSO<sub>4</sub>; 0,01 g ZnSO<sub>4</sub>; 10,0 g glicose; 2,0 g peptona; 1,5 g caseína hidrolisada; 0,5 g extrato de levedura; 1 mL de solução de vitaminas; 15 g ágar em 1000 mL de água destilada - pH 6,8 - PONTECORVO *et al.*, 1953, modificado por AZEVEDO e COSTA, 1973), e estocados sob refrigeração por no máximo cinco dias, quando não utilizados imediatamente. Após o tempo de crescimento, os conídios foram raspados da superfície da cultura com auxílio de uma alça de platina, para preparo de uma suspensão de conídios em solução de Tween 80 a 0,2% (v/v). Foram inoculados 10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup> em meio completo, para as linhagens selvagem e mutante *nia/pab/faw*, ou em meio mínimo suplementado com ácido *p*-aminobenzóico (PABA) para os transformantes. Após o inóculo, os meios foram incubados a 25°C por 48 horas sob agitação rotacional de 150 rpm, para a produção de massa micelial para obtenção de protoplastos ou para extração de DNA.

### 3.3. Extração de DNA total de fungos em grande escala

A extração de DNA total da linhagem selvagem, do mutante *pab/nia/faw* e dos transformantes foi realizada com base no método descrito por SPEACHT *et al* (1982) com pequenas alterações. Após o crescimento em meio líquido, o micélio foi coletado por filtração e, aproximadamente, 1 g de micélio úmido foi triturado em nitrogênio líquido e transferido para tubos de centrífuga contendo 10 mL de tampão de extração (EDTA 20 mM pH 7,5, SDS 1%, Tris-HCl 50 mM pH 8,0) e incubados por 30 minutos a 70°C sem agitação. Os tubos foram mantidos no gelo por 30 minutos, após a adição de 5 mL de acetato de potássio 5 M (60

mL de acetato de potássio 5M, 11,5 mL de ácido acético glacial, 28,5 mL de água milli-Q). Em seguida, o conteúdo do tubo foi centrifugado a 8000g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante transferido para outro tubo, ao qual foram adicionados 2 volumes de álcool etílico absoluto, sendo essa mistura estocada a -20°C por pelo menos 2 horas. A solução foi novamente centrifugada a 8000 g por 10 minutos a 4°C, e o material precipitado foi seco e ressuspendido em 1 mL de TE (Tris:EDTA 10mM:1mM). Esse material foi tratado com 5 µL de RNase A (20 mg mL<sup>-1</sup> em NaCl 15 mM, Tris-HCl 10mM pH 7,5) por 60 minutos a 37°C e, então, dividido em dois tubos Eppendorfs (500 µL em cada tubo). A desproteíntização das amostras foi realizada em duas etapas por adição de igual volume de fenol-clorofórmio (1:1) e, a seguir, clorofórmio, sendo cada etapa seguida de centrifugação a 12000 g por 5 minutos e retirada da fase superior, a qual era transferida para um tubo Eppendorf novo, onde foi adicionado meio volume de isopropanol para precipitação do DNA. A recuperação do DNA foi feita por meio de centrifugação a 12000 g por 10 segundos. O precipitado foi lavado com etanol 70%, feita a secagem a vácuo, e ressuspendido em 200 µL de TE.

#### **3.4. Isolamento de fagos recombinantes contendo genes de poligalacturonases a partir do banco genômico de *P. expansum***

O banco genômico de *P. expansum* foi construído por DIAS *et al.* (1997). Para o isolamento de fagos recombinantes contendo genes de poligalacturonase, foram feitas hibridizações de placas de lise, segundo a técnica descrita por BENTON e DAVIS (1977), utilizando uma sonda heteróloga. Essa sonda foi obtida pela marcação de uma seqüência de nucleotídeos de 1,6 kb, que corresponde à região codificadora e parte do promotor do gene de poligalacturonase de *P. griseoroseum*, que foi subclonada no plasmídeo pUC18 no sítio de restrição de *Xba* I (RIBON *et al.*, 1999), originando o plasmídeo pPG15. A marcação do fragmento foi realizada com dUTP-fluoresceína, utilizando-se flúor-12-dUTP (Prime-IT Flúor Fluorescence Labeling Kit, Cat. #300380, Stratagene), segundo instruções do fabricante. Os experimentos de

hibridização foram feitos segundo SAMBROOK *et al.* (1989). A temperatura de hibridização foi 60°C e as membranas foram lavadas duas vezes em SSC 2X [50 mL SSC 20X (citrato de sódio 3 M, NaCl 3 M), 4 mL SDS 25%, 446 mL de água desionizada] por 20 minutos a 60°C, com agitação branda, e duas vezes em SSC 1X [25 mL SSC 20X (citrato de sódio 3 M, NaCl 3 M), 4 mL SDS 25%, 471 mL de água desionizada], seguindo o mesmo procedimento anterior. Para detectar a hibridização, foi usado o “Iluminator™ Chemiluminescent Detection System” (Stratagene), segundo instruções do fabricante.

### **3.5. Caracterização dos plasmídeos e fagos recombinantes**

Os mapas físicos de restrição dos plasmídeos e do genoma dos fagos recombinantes foram estabelecidos por meio de clivagens simples e duplas com diferentes enzimas de restrição, análise por eletroforese em gel de agarose e por hibridização (SOUTHERN, 1975 e SAMBROOK *et al.*, 1989).

### **3.6. Seqüenciamento**

As seqüências de nucleotídeos dos fragmentos de DNA, subclonados no vetor pBlueScript® SK+, foram determinadas pelo método de terminação da cadeia por didesoxinucleotídeos, segundo SANGER (1977), utilizando o “Thermo sequenase dye terminator cycle sequencing pre-mix kit” (Amersham Life Science), seguindo as instruções do fabricante para montar as reações. O seqüenciamento foi realizado no Laboratório de Seqüenciamento do BIOAGRO - UFV no seqüenciador automático ABI PRISM 3100 Sequence Analyser (Perkin-Elmer).

### **3.7. Obtenção de protoplastos**

A obtenção dos protoplastos baseou-se no método de BALLANCE e TURNER (1985). O meio completo foi inoculado com  $10^7$  conídios mL<sup>-1</sup> e incubado por 16-18 horas sob agitação de 150 rpm. O micélio foi coletado por filtração em gaze, lavado com KCl 0,6 M em tampão fosfato 100 mM pH 5,8, ressuspensionado nesta mesma solução contendo 3 mg mL<sup>-1</sup> de Novozyme 234

(Sigma) e incubado a 27°C sob agitação lenta. Os protoplastos foram separados dos fragmentos de hifas por filtração, e lavados 3 vezes em Sorbitol 1M, CaCl<sub>2</sub> 50 mM e Tris-HCl 100 mM (SCT) por centrifugação. O sedimento contendo os protoplastos foi ressuspensionado em SCT para se obter uma concentração final de 10<sup>8</sup> protoplastos mL<sup>-1</sup> de suspensão.

### **3.8. Transformação de protoplastos de *P. expansum***

A transformação baseou-se no método de YELTON *et al* (1984) e BALLANCE e TURNER (1985). Os protoplastos foram misturados com 1 µL de solução do plasmídeo pNH24 (2,5µg/µL) e 50 µL de polietilenoglicol 6000 a 60% (p/v), sendo que em um outro tubo, além desses componentes, foram adicionados 25µg do plasmídeo pPE15. As misturas foram incubadas a 0°C por 20 minutos, seguindo-se a adição de 0,5 mL da mesma solução de polietilenoglicol. Após 20 minutos a 25°C, o volume foi completado para 1,5 mL com SCT. Os protoplastos foram recuperados por centrifugação, ressuspensionados em 0,5 mL de SCT, e em seguida plaqueados em meio mínimo com estabilizador osmótico (6 g NaNO<sub>3</sub>; 1,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g KCl; 0,5 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,01 g FeSO<sub>4</sub>; 0,01 g ZnSO<sub>4</sub>; 10 g glicose, 171 g sacarose, 15 g ágar em 1000 mL de água destilada-pH 6,8), pelo método de “pour plate”, e mantidos a 27°C por 5 dias.

### **3.9. Purificação monospórica dos transformantes**

A purificação monospórica foi realizada pela semeadura de 100µL de suspensão de conídios diluída em meio mínimo suplementado com PABA (MMp) e transferência de uma colônia isolada, proveniente de um único conídio, para uma nova placa de Petri contendo MMp após o período de crescimento.

### **3.10. Caracterização dos transformantes quanto à estabilidade mitótica**

Para avaliar a estabilidade mitótica dos transformantes quanto ao gene *niaD*, eles foram sucessivamente transferidos para meio mínimo e meio completo, num total de cinco passagens, sendo depois novamente transferidos

para meio mínimo. A cada passagem, as placas foram incubadas a 25°C por aproximadamente 72 horas.

### **3.11. Análise dos transformantes quanto à produção de pectinase total em meio sólido**

Os transformantes purificados foram crescidos em meio mineral tamponado (MMT - 2,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7,0 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1,0 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,0 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3,0 g pectina cítrica, extrato de levedura 0,06% (p/v), 13 g ágar em 1000 mL de água destilada) suplementado com PABA, por 5 dias. Foram cortados discos de 7 mm de diâmetro do MMT contendo micélio, os quais foram colocados em placas de Petri contendo meio sólido com tampão de Mac Ilvaine (0,2 M  $\text{NaHPO}_4$ , 0,1 M ácido cítrico, 13 g/L ágar - pH 6,0) acrescido de pectina cítrica (0,25%) e incubados por 48 horas a 40°C. Para a detecção do halo de degradação da pectina, foi adicionada uma solução de iodo/iodeto (5,0 g de KI, 1,0 g de iodo em 330 mL de água destilada). Os transformantes, que apresentaram halos maiores, foram analisados quanto à atividade de PG em meio líquido e quanto à integração do gene de poligalacturonase no genoma.

### **3.12. Determinação da atividade de poligalacturonase em meio líquido**

Os possíveis co-transformantes foram avaliados, quanto à produção da enzima poligalacturonase pela dosagem de açúcar redutor, pelo método do DNS (MILLER, 1959). Para obtenção do filtrado da cultura, foram adicionados  $5 \times 10^7$  conídios em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio mineral não-tamponado [MMNT - 2,0 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,64 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,0 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , em 1000 mL água destilada - pH 6,3] suplementado com  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,11%), pectina ESKISA (0,3%) e extrato de levedura (0,06%), a 25 °C, sob agitação rotacional de 150 rpm por 36 horas. Para preparo da mistura de reação, foi adicionado 1 mL do sobrenadante da cultura a 1 mL de solução do substrato (4 mL de solução de NaCl 2,5 M, 0,6 g ácido poligalacturônico, 50 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,8 e água destilada em quantidade suficiente para 100 mL de solução tampão). O branco da reação foi feito, adicionando-se uma alíquota de

0,25 mL da mistura de reação, retirada no tempo zero, a um tubo contendo 1 mL de DNS e completando-se o volume para 2 mL com água destilada. Em seguida, a mistura de reação foi incubada a 40 °C por 20 minutos. Uma alíquota de 0,25 mL da mistura de reação foi retirada, após o tempo de reação, e adicionada a um tubo contendo 1 mL de DNS, sendo o volume completado para 2 mL com água destilada. Os tubos foram mantidos a 95-100°C por 5 minutos e, em seguida, o volume de cada tubo foi completado para 10 mL com água destilada. A leitura da absorvância foi realizada a 540 nm. Para determinar a quantidade de ácido galacturônico presente na amostra, foi construída uma curva padrão para o ácido galacturônico. Para cada transformante analisado, o MMNT foi suplementado com PABA, sendo utilizada a atividade enzimática das linhagens selvagem e mutante como padrão para comparações. A atividade enzimática foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de ácido galacturônico liberado por mL da mistura de reação por minuto.

### 3.13. Caracterização molecular dos transformantes

Para analisar a integração do gene *niaD* no genoma de *P. expansum*, o DNA total dos transformantes, da linhagem selvagem e do mutante foram clivados com as enzimas de restrição *Sal* I (reconhece um sítio de restrição na seqüência de nucleotídeos do gene *nia* de *F. oxysporum*) e *Cla* I (não cliva o gene *niaD* de *F. oxysporum*) separadamente, e em seguida os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. O gel foi tratado com solução de desnaturação (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) e solução de neutralização (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M pH 7,0), sendo então transferido para membrana de náilon (SOUTHERN, 1975) e hibridizado com o fragmento de DNA de *Hind* III de 4,0 Kb do plasmídeo pNH24 marcado com dUTP-fluoresceína. Este fragmento corresponde ao gene de nitrato redutase de *Fusarium oxysporum*. A hibridização foi feita por 18 horas a 60°C. A membrana foi lavada duas vezes em SSC 2X a 60°C durante 20 minutos, e duas vezes em SSC 1X durante o mesmo período de tempo. Foi realizada também uma hibridização, utilizando-se o gene *nia* de *P. chrysogenum* como sonda, nas mesmas condições, porém à temperatura de 65°C.

Para análise dos transformantes quanto à integração do gene de poligalacturonase, o DNA total dos possíveis co-transformantes foi clivado com as enzimas de restrição *Apa* I (que não cliva o gene *pepg* 1) e *Hpa* I (que cliva o gene *pepg* 1 apenas uma vez), sendo os fragmentos de DNA separados por eletroforese em gel de agarose e transferidos para membrana de náilon e hibridizados a 65°C com o fragmento de DNA de *Sal* I de 4,4 Kb do plasmídeo pPE15 marcado com dUTP-fluoresceína. Este fragmento corresponde ao gene que codifica uma poligalacturonase em *P. expansum*. As condições de lavagem da membrana foram as mesmas utilizadas para a hibridização com o gene *nia*.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Seqüenciamento do gene *pepg1*

A seqüência completa de nucleotídeos do gene *pepg1* foi determinada (Figura 1). Esse gene foi isolado por DIAS (1997) a partir do banco genômico de *P. expansum* e está contido em um fragmento de DNA de *Sal* I de 4,4 Kb que foi subclonado no vetor pUC 18 e o plasmídeo recombinante foi denominado pPE 15. A análise da seqüência permitiu identificar que a região codificadora está interrompida por dois introns, baseando-se na homologia da seqüência consenso 5' e 3' de fungos, GTANGT e PyAG, respectivamente, envolvidas no processamento para a retirada de introns (GURR *et al.*, 1987). Os tamanhos destes possíveis introns (58 pb) é similar aos relatados para outros genes que codificam PG em fungos filamentosos (RAMBOSEK e LEACH, 1987). A análise dessa seqüência revelou que a região codificadora tem 1,1 Kb, após a retirada dos íntrons, e codifica uma proteína potencialmente com 370 aminoácidos. Um possível TATA box foi localizado na posição -189, e um possível CAAT box na posição -273. Baseado nesta análise de seqüência, pode-se concluir que o fragmento de DNA de 4,4 Kb contém o gene completo de uma das poligalacturonases de *P. expansum*. A Figura 1B mostra o posicionamento do gene dentro do fragmento de 4,4 Kb do plasmídeo recombinante, o que

permitirá a construção de plasmídeos recombinantes menores contendo o gene *pepg1* para uso na transformação de *P. expansum*.

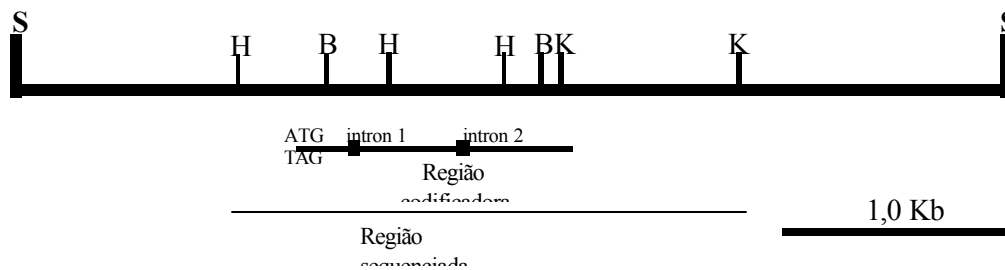
A

```

1. .GTTTCGGAGAGTTGCCAGTCGGGTGTAGCTGACCATGTAGCTGGCCCTAGTAGATTAATCCAATGGAGCATCTAA      77
CAATATCCATGCATCCCTGGATCTTATGATTTTCCAATGAGGGGTCCAACCTAAGAACAGGGGTTAACGCCATGAC      153
AGATGGCGGTAGTCCCCTTTCATAGAGATACTAGCGTAGGATCTATAAGGAGGATGCTTGGCGGACCAAGCATTTA      229
AATACCAAGGCCAAGCTCGGTGGAAATAGCTTGTTCAAACTCATTCAITTCATTTCATTTCATTTCATTTCATTTCCTC      305
ATTTCCCTATTACACTCAGGTCGGCTAGTCCGGAACATCTACACTCTCTTAAATTGCTGTTGATCGGACACCTACT      381
TAAAATGCGTACTTCTTTTCGTTACCATGCTGGCCCTCGGGCGCGCGCTGTGTCCGGTGCCCGGGTTCGGCCCC      457
GTTACCGGATCTCGTTGAGCGCGGCTCCTCCAGCTGTACCTTCACCTCGGCGCTGCCGCCAAGGCTGGCAAGTCCCT      533
CCTGCTCCACCATTGTGTGGACAACATCAAGGTCCCGCGGGCGAGACCCCTCGACCTTCCAAAGCTGAAGAGCGG      609
CACTAAGGtagatattattccgttattcaagcgcaagaataaaaagtctaatagctactgtatagGTCATCTTCAA      685
GGGCGAAACCACTTGGGATACAAGGAGTGGACCGGTCCCTCATCCGGTTCCTCTGGGATAACATTAACGINTCC      761
GGTGATCCGGCCATGTCGTCAACGGTGGCGGCCAGCTGGTGGGACGGAAAGGGAACCAACGGCGGAAAGAAGA      837
AGCCCAAGTTCTTCTACGCCACGGCTTGGACAACCTCGAACATCTCCGGCTTAAACGTCAAGAACACCCCGTCCA      913
GGGTTTCAGTGTCCAGGCCGACCCTGGTCTCGACCACATCACCATCGACAACAGCGAGGGTGACTCCAAGGGT      989
GGCCACCACACCGATGCCTTCGATGTTGGCTCCAGTACCTACATCACCATCAGCAACGCCAACATCAAGAACCCAGG      1065
ACGACTGCCTGGCTATCAACTCTGGCGAGGtaagTcaaagacactcctattaaaaatatttggcattaactaaccc      1141
ttgtcctcagCACATCACCTTACCAGGTGGCACCTGCTCCGGTGGCCACGGTATCTCCATCGGTTCCGTTGGTGT      1217
GCGGACAACAACATCGTGAAGGATGTACCATCTCTGACTCCAGTGTGCTCAACTCCGACAACGGTGTCCGCGTCC      1293
AAGACCATCTACAAGGCTACCGGTGCCGTCTCCGACGTCACCTTCTCCAACATCAAGTGTCCAACATCGCCAAGT      1369
ACGGTATCGTCATCGAGCAGGATTACCAGAACGGCAGCCCTACCGCAAGCCACCACCGGTGTCCCACTTACTGG      1445
CCTCAAGGTTGAGAAGGTTACCGGTACCGTTAAGAGCAGCGGTACTGACGCTACATTTCTGCGGTAAACGGTAGC      1521
TGCAAGAAGTGGACTGGAACTCCGTCACCTGGTGGTAAAGAAGAGCAGCAAGTGTCTGGTGTGCCTTCCG      1597
GCGCTTCTTGC TAGATTGCCAGCGATCAAATGGTGATCAATAAACAGCATGACACCAGCAGGGCAGAGACTGGGT      1673
ATCTTCAAGAAAAGATTTGACTGGATGACCTAAGGAATAGCCAGGTGAAATAGATGCTAGTCGCATTGTTATTTTC      1749
AACATAATTGTACTTATATATAGCCGTCTATAGATGGATTTAAAATGAATGGTTTTCAACCTTCTTAATATTGGCT      1825
TATAACTTACTCTAAAACCTGTAACACATACCTGAGATTAGCGTGATTTACTCTATATTCAAATGGATCTATCAA      1901
TTTTCTATCAACAAATCTGATACATTTATGTAAGCCCTGGAGTATCTTCTCAATTATAAATCAACGCCAAGCTCAC      1977
GTTTGGAAAGAAATGCGATGACGCAACGAGTTCCTTCCCTGAGGTCCCAATCAACCAACATCACACATTTACTC      2053
TCATACACATACAAAATCATCCAAATTACATCCAAAATACATGTCTTCTACTCGGCGGTCACGGCAAAGTCG      2129
CCCTCCACCTCACTCCGCTCCTCCTCAAACGGGCCTGGAGGTGTAACCAGCGTCATCCGCAACCCCGCGCACGAAA      2205
CGGAGATTCTAGCCCTGGGCCAGGGCTCAAAGGTACCCTCAACGTGCTACT
2257

```

B)



**FIGURA 1.** Seqüência de nucleotídeos (2,2 Kb) contendo o gene *pepg1* de *P. expansum* (A). Mapa físico de restrição do fragmento de *Sal* I de 4,4 Kb do plasmídeo pPE 15 (B). H: *Hinc* II, B: *Bgl* I, K: *Kpn* I.

A seqüência de aminoácidos deduzida para a PG codificada por *pepg1* tem três possíveis sítios de glicosilação nas posições 300, 338 e 343. Essa seqüência foi comparada com as seqüências de PG II de *Penicillium digitatum*, *P. janthinellium*, *Aspergillus parasiticus*, *A. oryzae* (*pgaB*), *Cryphonectria parasitica* e *Penicillium griseoroseum* disponíveis no banco de dados GenBank, por meio do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), sendo observada uma identidade de aminoácidos de 83, 64, 64, 65, 64 e 100 %, respectivamente, entre elas. Além das seqüências deduzidas das PGs de *P. expansum* e *P. griseoroseum* terem apresentado 100 % de identidade de aminoácidos, a região codificadora dos genes também apresentou 100 % de identidade de nucleotídeos, e inclusive os introns são idênticos.

O ponto isoelétrico deduzido para a PG correspondente ao gene *pepg1* de *P. expansum* foi de 8,3, e sua massa molecular deduzida foi 38,4 KDa. MIRANDA (1997) demonstrou que, dentre as três PGs produzidas por *P. expansum*, duas apresentaram carga positiva, pois, ficaram retidas numa coluna de troca catiônica, PG II e PG III, e que apenas um pico de atividade, PG I, foi eluído antes da aplicação do gradiente linear de NaCl. Considerando esses resultados, e tomando como base o ponto isoelétrico deduzido para essa potencial proteína, pode-se inferir que *pepg1* corresponde à PG II ou PG III, descartando-se, assim, a possibilidade de codificar a PG I.

#### **4.2. Isolamento e caracterização de genes que codificam poligalacturonases em *Penicillium expansum***

Para o isolamento de genes de poligalacturonases, foi utilizado o banco genômico de *Penicillium expansum* construído no vetor  $\lambda$ EMBL3 por DIAS (1997). Foi feita a titulação do banco genômico, no momento de sua utilização, e o título foi de  $1,63 \times 10^{10}$  unidades formadoras de placas (UFP) mL<sup>-1</sup>.

Considerando que o tamanho estimado do genoma de fungos filamentosos é em torno de  $10^7$  pb, com a análise de  $3,1 \times 10^3$  fagos recombinantes já se teria 99% de probabilidade de isolar um gene cópia única do genoma de *P. expansum* (GURR *et al.*, 1983). Deste modo, o banco genômico utilizado é altamente

representativo, pois, apresentou título de  $8,1 \times 10^5$  UFP mL<sup>-1</sup> antes de sua amplificação (DIAS, 1997).

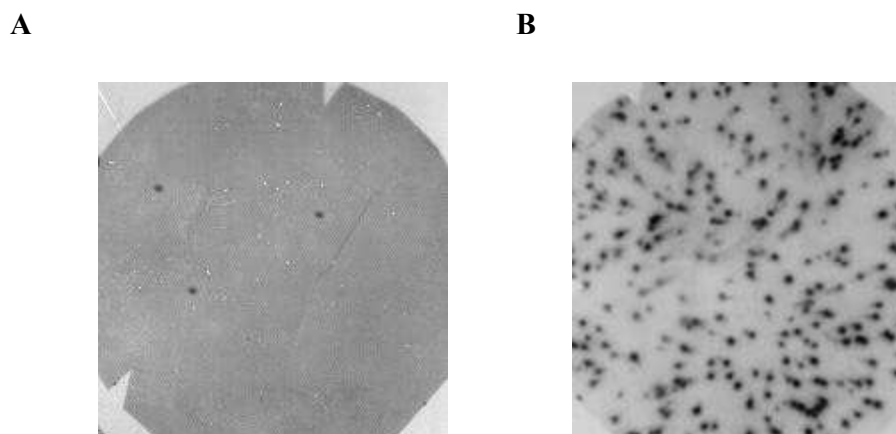
Para a realização do primeiro “screening” do banco genômico, aproximadamente  $10^5$  placas de lise, por placa de Petri, foram analisadas. Como sonda, foi usado um fragmento de DNA de 1,6 Kb que corresponde ao gene *pgg1* que codifica PG em *P. griseoroseum*. Os clones positivos foram recuperados das placas de Petri com auxílio da auto-radiografia do primeiro “screening”, e confirmados em um segundo “screening”. O gene *pgpel* de *P. expansum* poderia ter sido usado como sonda, mas optou-se pelo uso de uma seqüência heteróloga para possibilitar o isolamento de fagos contendo os outros genes que codificam PG em *P. expansum*.

MIRANDA (1997) relatou que *P. expansum* produz, pelo menos, três formas de poligalacturonase. Esse resultado leva a concluir que estas enzimas são codificadas por uma família multigênica, conforme relatado para as poligalacturonases de *Aspergillus* spp. (BUSSINK *et al.*, 1990; 1991a). O isolamento de genes, e o conhecimento da organização e do mecanismo de controle de sua expressão, é essencial em programa de melhoramento genético que visa o aumento do número de cópias do gene no genoma, pois, uma vez que os genes estejam bem caracterizados, é possível direcionar o trabalho utilizando-se uma seqüência que seja expressa, preferencialmente, com o uso de substrato de baixo custo.

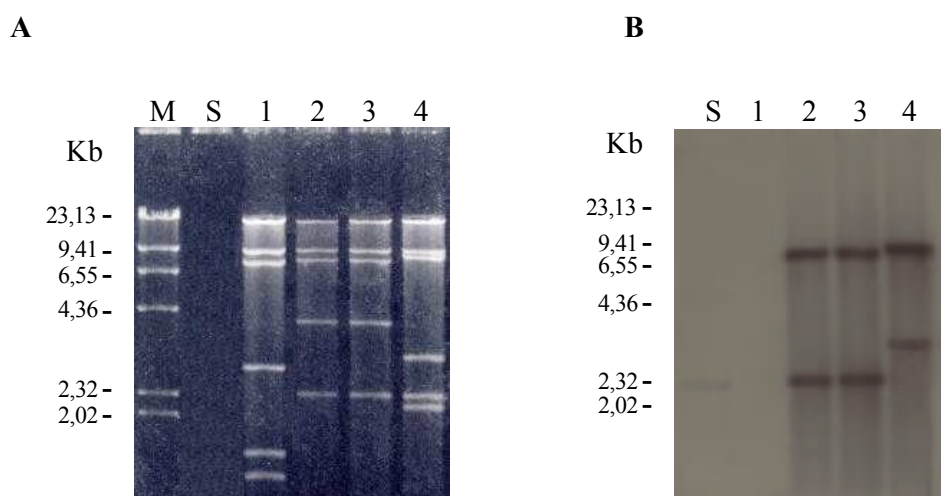
Foram isolados quatro fagos recombinantes, os quais foram designados  $\lambda$ PEPG1,  $\lambda$ PEPG2,  $\lambda$ PEPG3 e  $\lambda$ PEPG4. Considerando que *P. expansum* apresenta mais de um gene que codifica PG no genoma, é interessante que se obtenha o maior número possível de clones positivos para aumentar a chance de se isolar diferentes seqüências. A Figura 2 apresenta as auto-radiografias do primeiro e do segundo “screening” do banco genômico de *P. expansum*.

O DNA dos clones isolados foi extraído e digerido com a endonuclease de restrição *Sal* I. O padrão de restrição do DNA dos fagos clivados com esta enzima indicou que os clones  $\lambda$ PEPG1,  $\lambda$ PEPG2 e  $\lambda$ PEPG4 correspondem a diferentes fagos (Figura 3A). O padrão de restrição do clone  $\lambda$ PEPG3 é idêntico

ao do clone  $\lambda$ PEPG2, portanto, este fago não foi utilizado nas análises posteriores. A Figura 3B apresenta o resultado da hibridização com o fragmento de 1,6 Kb de *P. griseoroseum* em que não foi observado nenhum sinal de hibridização com o clone  $\lambda$ PEPG1, e por isso este fago também não foi incluído nas análises posteriores. Com base nestes resultados, foram selecionados os fagos recombinantes  $\lambda$ PEPG3 e  $\lambda$ PEPG4 para utilização nos experimentos posteriores. Análise do padrão de restrição com *Sal* I e da hibridização permitiu uma estimativa do tamanho dos fragmentos de DNA genômico clonados, que foram de 14,5 e 16,6 Kb para  $\lambda$ PEPG3 e  $\lambda$ PEPG4, respectivamente. O padrão de hibridização mostra que dois fragmentos de DNA, sendo um de 8,4 Kb e um de 2,4 para o fago  $\lambda$ PEPG3, e um fragmento de 9,0 Kb e outro de 2,9 Kb para o fago  $\lambda$ PEPG4 (Figura 3), hibridizam com a sonda. Considerando que os fragmentos de DNA estão ligados entre si, então o fragmento genômico clonado no  $\lambda$ PEPG3 é de 10,8 Kb, que corresponde à soma dos dois fragmentos que hibridizaram com a sonda que contém um gene de PG e pode estar ligado no braço direito ou esquerdo do vetor  $\lambda$ EMBL3, e um fragmento de 3,7 Kb que não hibridiza com a sonda, que também pode estar ligado em qualquer um dos braços do vector  $\lambda$ EMBL3. O fato de que o fragmento de DNA do fago  $\lambda$ PEPG3 pode estar ligado a um braço do vetor, provavelmente, não compromete as etapas posteriores deste trabalho, ou seja, há grande possibilidade de que a seqüência do gene não esteja interrompida, considerando-se a intensidade do sinal de hibridização similar nos fragmentos de DNA, sugerindo que a enzima *Sal* I cliva este gene aproximadamente na metade de sua seqüência. Além disso, levando em consideração que os genes de poligalacturonases de fungos, até então isolados e caracterizados, apresentam regiões codificadoras com tamanhos em torno de 1,3 Kb, há grande chance de que este gene, ou pelo menos sua região codificadora não esteja interrompida (RIBON *et al.*, 1999; BUSSINK *et al.*, 1990; WAGNER *et al.*, 2000; etc).



**FIGURA 2.** Auto-radiografia do primeiro (A) e do segundo (B) “screening” do banco genômico de *P. expansum*. O fragmento de DNA de 1,6 Kb do gene *pgg1* de *P. griseoroseum* foi utilizado como sonda.



**FIGURA 3.** A - Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA dos fagos recombinantes  $\lambda$ PEPG1(1),  $\lambda$ PEPG2(2),  $\lambda$ PEPG3(3) e  $\lambda$ PEPG4(4) clivados com a enzima de restrição *Sal* I. B - Auto-radiografia da hibridização com a sonda. M: DNA do fago  $\lambda$  clivado com a enzima *Hind* III, S: fragmento de DNA 1,6 Kb de *P. griseoroseum* usado

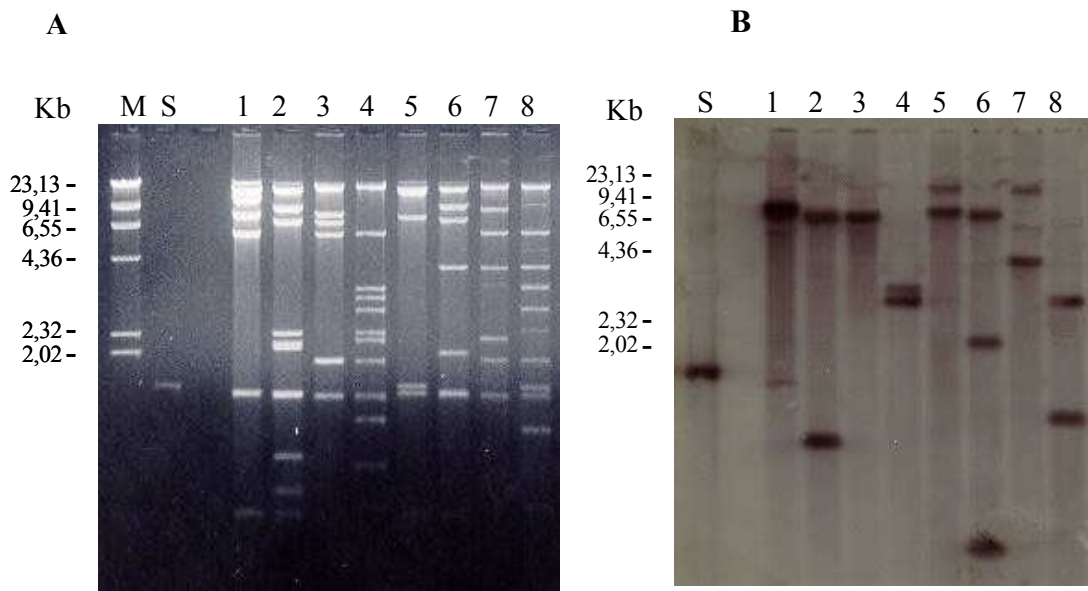
Quanto ao clone  $\lambda$ PEPG4, pode-se inferir que este fago também contém um gene de PG completo, pois, os dois fragmentos de DNA que hibridizaram com a sonda somados resultam em um fragmento de 12,0 Kb, podendo estar localizado internamente entre os fragmentos de 2,4 e 2,2 Kb que não hibridizaram com a sonda, ou ligado a qualquer um dos braços do vetor.

A Figura 3B mostra que as seqüências que hibridizaram com a sonda, presentes nos fagos  $\lambda$ PEPG3 e  $\lambda$ PEPG4, diferem do gene de PG de *P. expansum* *pepg1* isolado por DIAS (1997), pois, os dois apresentaram pelo menos um sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *Sal* I, o que não ocorre no primeiro gene isolado, o que é mais uma evidência da ocorrência de uma família multigênica para as poligalacturonases de *P. expansum*. A comparação do padrão de restrição do DNA destes fagos com o dos fagos contendo fragmentos de DNA genômico de *P. griseoroseum* isolados por RIBON (2001, comunicação pessoal) mostrou que há uma correspondência entre os genes de PG destes dois fungos, pois, apesar do padrão de restrição não ser idêntico para o DNA dos fagos analisados, o padrão de hibridização revelou grande similaridade entre eles, sugerindo que, assim como o gene *pepg1* isolado por DIAS (1997), estas outras seqüências que codificam PG em *P. expansum* apresentam grande homologia com os genes de PG de *P. griseoroseum*.

Para a construção dos mapas físicos de restrição dos fagos  $\lambda$ PEPG3 e  $\lambda$ PEPG4, foram realizadas clivagens simples e duplas do DNA desses fagos com diversas enzimas de restrição, seguidas da hibridização (Figura 4). A análise do padrão de restrição e de hibridização do DNA dos fagos  $\lambda$ PEPG3 e  $\lambda$ PEPG4 permitiu o mapeamento dos fragmentos de DNA destes fagos, mas o posicionamento do gene nestes fragmentos não foi precisamente determinado. A clivagem do fago  $\lambda$ PEPG3 com *Kpn*I liberou dois fragmentos de 18,2 e 8,2 Kb, que hibridizaram com a sonda, indicando que o gene de PG clonado neste fago apresenta um sítio para esta enzima. Considerando que uma parte deste gene está no fragmento de DNA de 18,2 Kb e a outra parte no fragmento de 8,2 Kb, ele deve estar deslocado do braço direito do vetor aproximadamente 7,0 Kb, pois,

8,7 Kb do fragmento de 18,2 Kb corresponde ao braço direito do vetor  $\lambda$ EMBL3, o que é confirmado pela clivagem dupla *Kpn I/Sal I*, em que o fragmento de 18,2 Kb não foi detectado, sendo formados dois fragmentos, um com tamanho próximo ao do braço direito do vetor e o outro de 7,8 Kb que hibridizou. A Figura 5A apresenta o mapa físico de restrição para o fago  $\lambda$ PEPG3.

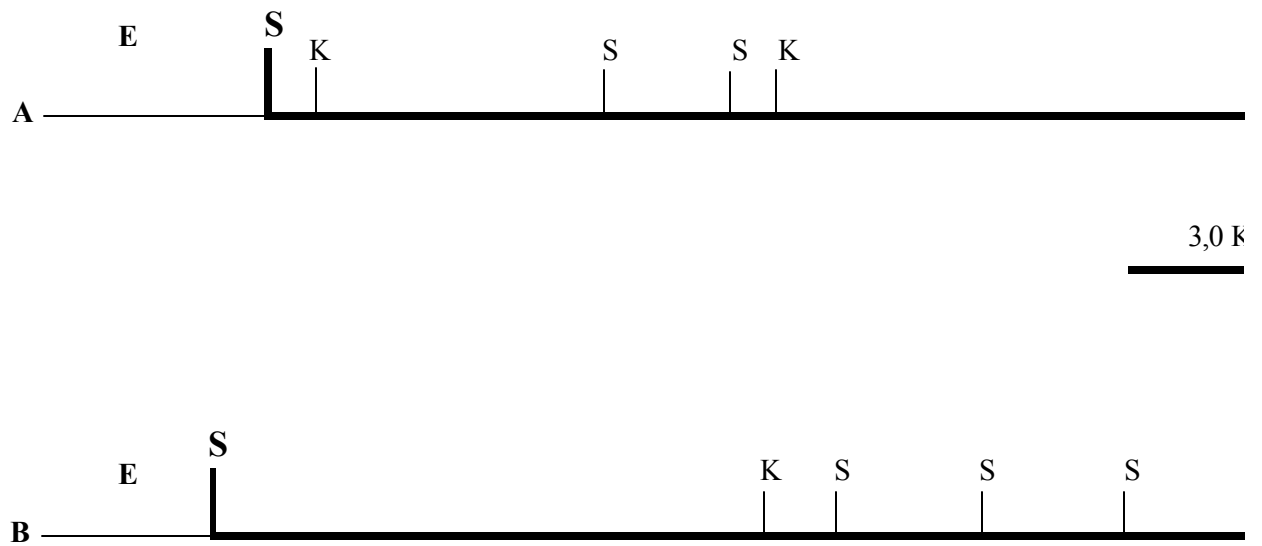
O padrão de restrição do DNA dos fagos  $\lambda$ PEPG3 e  $\lambda$ PEPG4 com a enzima *Sal I* e a hibridização permitiram verificar que ambos os genes presentes nesses fagos diferem do gene *pepg1* isolado por DIAS (1997), mas não evidencia claramente diferenças nos genes contidos nestes insertos entre si. No entanto, a clivagem dupla do DNA destes fagos com *Sal I/Kpn I*, apresentada na Figura 4, canaletas 2 e 6, mostra uma notável diferença entre os padrões de restrição destes genes, pois, nesta clivagem, para o fago  $\lambda$ PEPG4, observam-se dois fragmentos de DNA hibridizando com a sonda. Conforme discutido anteriormente, há forte indicação de que o gene de PG neste fago não esteja interrompido. No caso do fago recombinante  $\lambda$ PEPG3, na clivagem do DNA com as mesmas enzimas de restrição, verificou-se que três fragmentos de DNA hibridizaram com a sonda sendo estes de 7,8 Kb, 1,8Kb e 0,6Kb. Este resultado indica que o fragmento de 0,6 Kb encontra-se internamente na seqüência do fago  $\lambda$ PEPG3 que hibridiza com a sonda, o que permite inferir que os genes contidos nos insertos dos dois fagos recombinantes diferem também entre si, pois, no fago  $\lambda$ PEPG4 não foi observado nenhum fragmento interno *Sal I/Kpn I* que hibridizasse com a sonda. Deste modo, há grande chance de se ter isolado os três genes que codificam PG em *P. expansum*.



**FIGURA 4.** **A** - Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA dos fagos recombinantes  $\lambda$ PEPG3 e  $\lambda$ PEPG4 clivados com enzimas de restrição. **B** - Auto-radiografia. M: DNA do fago  $\lambda$  clivado com a enzima *Hind* III, S: fragmento de DNA 1,6 Kb de *P. griseoroseum* usado como sonda,  $\lambda$ PEPG4 (1, 2, 3 e 4) e  $\lambda$ PEPG3 (5, 6, 7 e 8): *Kpn* I (1 e 5), *Kpn* I/*Sal* I (2 e 6), *Sma* I (3 e 7), *Sma* I/*Sal* I (4 e 8).

Apesar destes resultados estarem de acordo com o resultado obtido por MIRANDA (1997), seria interessante fazer novo “screening” do banco genômico de *P. expansum* para averiguar se a família multigênica que codifica PG neste fungo é constituída realmente apenas de três genes, pois, KAWANO *et al* (1999) relataram a ocorrência de 11 formas de PG em *P. frequentans*, quando cultivado em meio líquido suplementado com pectina, sendo sete poligalacturonases extracelulares e quatro intracelulares. Esses autores não atribuíram às PGs intracelulares mero papel no metabolismo de oligogalacturonatos, e sugeriram que estas diferentes formas de PG podem ser resultantes de diferentes padrões de glicosilação ou da formação de agregados entre as cadeias polipeptídicas de PG, conforme relatado para a invertase de *Saccharomyces cerevisiae* (ESMON, *et al.*, 1987). Portanto, não se pode também afirmar que *P. frequentans* tenha, necessariamente, onze genes que codificam PG no genoma. Em 1991, BUSSINK *et al.* demonstraram que *A. niger* produz pelo menos cinco formas de poligalacturonases, quando crescido em meio de cultura contendo polpa de beterraba ou pectina. Foi demonstrado também que *P. griseoroseum* produz pelo menos três poligalacturonases extracelulares na presença de pectina, sendo que a presença de uma quarta PG neste fungo ficou para ser confirmada (D’ANGELO, 1998). Considerando que é comum a observação de vários genes codificando poligalacturonases, nas diversas espécies de fungos até então estudadas, é interessante a confirmação de que no genoma de *P. expansum* existem apenas três genes que codificam estas enzimas.

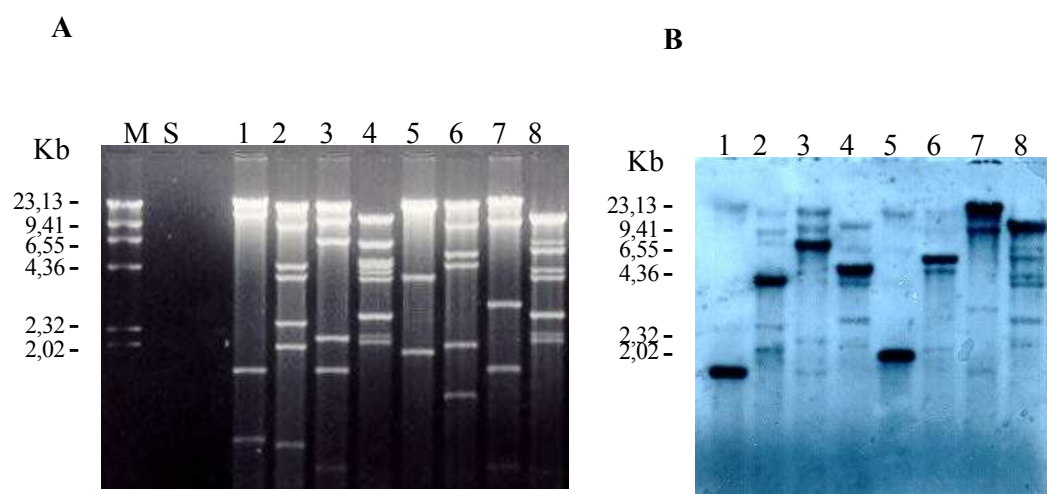
A Figura 5B mostra o mapa físico de restrição do DNA do fago recombinante  $\lambda$ PEPG4. A digestão do DNA deste fago com *Kpn* I liberou também dois fragmentos que hibridizaram, sendo um de 9,1 Kb e o outro de 1,4 Kb, indicando que estes 2 fragmentos estão ligados entre si.



**FIGURA 5.** Mapa físico de restrição do DNA dos fagos recombinantes  $\lambda$ PEPG3 (A) e  $\lambda$ PEPG4 (B). S: *Sal* I, K: *Kpn* I, E: braço esquerdo do vetor  $\lambda$ EMBL3, D: braço direito do vetor  $\lambda$ EMBL3

A intensidade do sinal de hibridização do fragmento de DNA de 9,1 Kb indica que o mesmo deve conter a maior parte do gene de PG. A clivagem dupla *Sal I/Kpn I* sugere que o fragmento de 9,1 Kb de *Kpn I* está ligado no braço esquerdo do vetor, pois, o mesmo não foi observado nesta clivagem, sendo detectada uma banda de 7,7 Kb com a clivagem *Sal I/Kpn I*. Esta possibilidade foi confirmada com as clivagens do DNA com *Sma I* e *Sma I/Sal I*, em que o fragmento de 7,5 Kb de *Sma I* que hibridizou não foi observado com a clivagem dupla, mas foram observados fragmentos hibridizando, cujos tamanhos somados é inferior ao tamanho do fragmento de *Sma I*, que hibridizou com a sonda. O fato de o fragmento de 9,1 Kb de *Kpn I* estar ligado no braço do vetor não representa um problema, neste trabalho, considerando que este fragmento está orientado de modo que não é a extremidade que contém o gene que está ligada diretamente no braço do vetor; portanto, o gene está provavelmente localizado internamente neste fragmento, não estando interrompido.

Considerando que todas as enzimas de restrição usadas nas clivagens do DNA dos fagos apresentam sítios nos genes de PG, exceto *Sma I*, que não clivou o gene de PG presente no fago  $\lambda$ PEPG4, foi necessário clivar o DNA dos fagos com outras enzimas de restrição, para identificar qual, ou quais enzimas, permitiriam obter fragmentos de DNA contendo a seqüência completa do gene, ou seja, enzimas que ao clivar o DNA dos fagos liberassem um único fragmento contendo o gene de PG. O fato de *Sma I* clivar o gene de PG do fago  $\lambda$ PEPG3 e não clivar o do  $\lambda$ PEPG4 mostra que estes genes apresentam diferentes seqüências, confirmando, assim, a presença de pelo menos 3 genes de PG no genoma de *P. expansum*, o que está em concordância com o resultado obtido por MIRANDA (1997). Apesar da enzima *Sma I* não ter clivado o gene de PG no  $\lambda$ PEPG4, optou-se por não usar esta enzima para gerar o fragmento a ser subclonado porque ela cliva gerando extremidades abruptas, o que geralmente dificulta a subclonagem. A Figura 6A mostra o padrão de restrição dos fagos  $\lambda$ PEPG3 e  $\lambda$ PEPG4 com as enzimas *Xba I*, *Bam HI*, *Sac I* e *Cla I* e a Figura 6B, a auto-radiografia da hibridização.

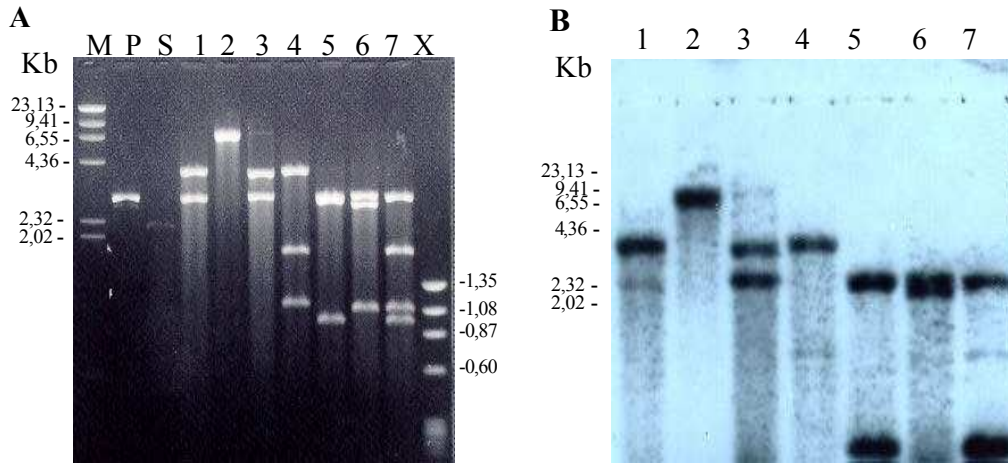


**FIGURA 6.** **A** - Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA dos fagos recombinantes  $\lambda$ PEPG3 (1,2,3 e 4) e  $\lambda$ PEPG4 (5,6,7 e 8) clivados com enzimas de restrição. **B** - Auto-radiografia da hibridização com o fragmento de 1,6 Kb/*Xba* I contendo o gene *ppg1* de *P. griseoroseum*. M: DNA do fago  $\lambda$  clivado com a enzima *Hind* III, S: fragmento de DNA 1,6 Kb,  $\lambda$ PEPG3 e  $\lambda$ PEPG4: *Xba* I (1 e 5), *Bam*HI (2 e 6), *Sac*I. (3 e 7), *Cla* I (4 e 8).

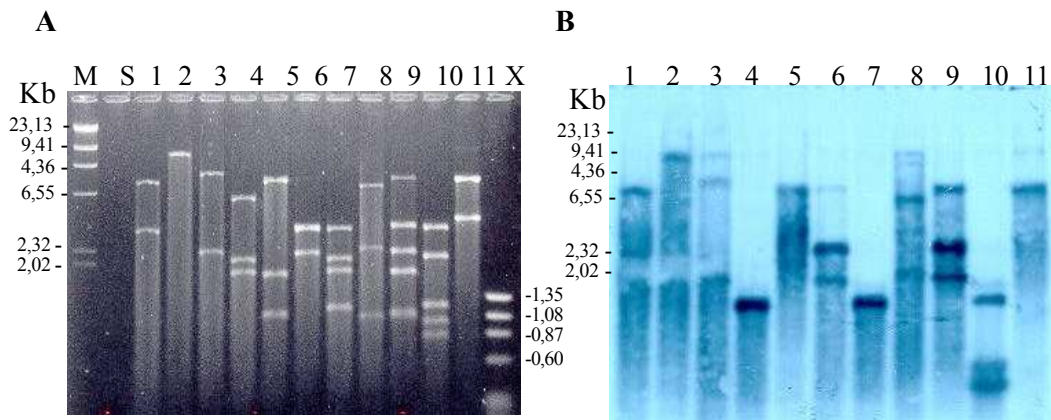
De acordo com a Figura 6B, em todas as clivagens apenas um fragmento hibridizou, indicando que quaisquer daquelas enzimas poderiam ser usadas na subclonagem. Essas seqüências devem conter o gene de PG completo, inclusive sua seqüência regulatória, o que é importante para a utilização dessas seqüências nos experimentos de transformação, visando aumentar a atividade de PG, aumentando o número de cópias do gene no genoma, ou mesmo devido à sua integração numa região do genoma que favoreça sua expressão. Esta estratégia tem possibilitado o aumento da atividade de várias enzimas pectinolíticas em espécies do gênero *Aspergillus* (BUSSINK *et al.*, 1990; 1991a; GYSLER *et al.*, 1990).

Os fragmentos de DNA de *Bam* HI de 3,6 ( $\lambda$ PEPG3) e 5,1 Kb ( $\lambda$ PEPG4) foram subclonados no vetor pBluescript<sup>®</sup> SK+, e os plasmídeos recombinantes foram designados pEPG3 e pEPG4, respectivamente. O fragmento de DNA de 1,6 Kb de *Xba* I do plasmídeo pEPG4 foi subclonado no mesmo vetor, gerando o plasmídeo pEPG4.1. A Figura 9 apresenta os mapas físicos de restrição dos plasmídeos pEPG3 e pEPG4, que foram construídos pela análise dos padrões de clivagens simples e duplas destes plasmídeos, com diversas enzimas de restrição e o padrão de hibridização (Figuras 7 e 8).

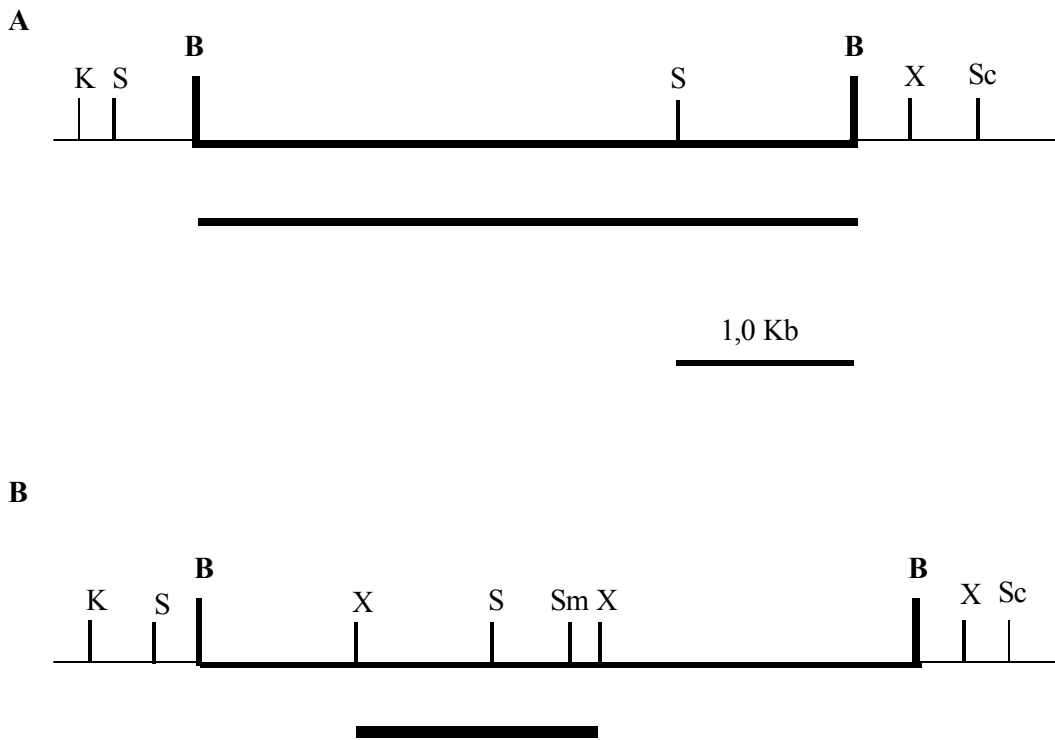
A análise dos mapas físicos de restrição dos plasmídeos recombinantes pEPG3 e pEPG4 (Figura 9) mostra que há grande chance destes plasmídeos conterem o gene de PG completo, mais seguramente o pEPG4 que apresenta um fragmento de 1,1 Kb *Bam* HI/*Xba*I entre o vetor e o fragmento de DNA de 1,7 Kb *Xba* I que hibridizou com a sonda. No caso do plasmídeo pEPG3, é observado um fragmento de 1,0 Kb *Bam* HI/*Sal* I que hibridiza com a sonda e está ligado ao vetor. Não foi possível indicar sítios de clivagem para outras enzimas no fragmento clonado neste plasmídeo porque nenhuma das enzimas usadas em sua digestão clivou o fragmento, a não ser *Sal* I.



**FIGURA 7.** A - Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA do plasmídeo recombinante pEPG3 clivado com as enzimas de restrição *Bam*HI(1), *Sca* I(2), *Sal* I(3), *Bam*HI/*Sca* I(4), *Bam*HI/*Sal* I(5), *Sca* I/*Sal* I(6) e *Bam*HI/*Sca* I/*Sal* I(7). B - Auto-radiografia. M: DNA do fago  $\lambda$  clivado com a enzima *Hind* III, P: plasmídeo pBluescript SK+ linearizado, S: fragmento de DNA 1,6 Kb de *P. griseoroseum* usado como sonda, X: DNA do fago PhiX 174 clivado com a enzima *Hae* III.



**FIGURA 8.** A - Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA do plasmídeo recombinante pEPG4 clivado com as enzimas de restrição *Bam*HI(1), *Sca* I(2), *Sal* I(3), *Xba* I(4), *Bam*HI/*Sca* I(5), *Bam*HI/*Sal* I(6), *Bam*HI/*Xba* I(7), *Sca* I/*Sal* I(8), *Bam*HI/*Sca* I/*Sal* I(9), *Bam*HI/*Sal* I/*Xba* I(10) e *Sma* I(11). B - Auto-radiografia. M: DNA do fago  $\lambda$  clivado com a enzima *Hind* III, S: fragmento de DNA 1,6 Kb de *P. griseoroseum* usado como sonda, X: DNA do fago PhiX 174 clivado com a enzima *Hae* III.



**FIGURA 9.** Mapas físicos de restrição dos plasmídeos recombinantes pEPG3 (A) e pEPG4 (B). K: *Kpn* I, S: *Sal* I, B: *Bam*HI, X: *Xba* I, Sm: *Sma* I, Sc: *Sca* I. A barra na horizontal indica a banda correspondente ao fragmento de DNA de 1,7 Kb de *Xba* I que hibridizou com a sonda.

Considerando que a intensidade do sinal de hibridização é aproximadamente igual para os dois fragmentos de DNA do plasmídeo pEPG3 que hibridizaram, e que foi usado como sonda um fragmento de DNA de 1,6 Kb contendo a região estrutural e parte do promotor do gene de PG de *P. griseoroseum*, há possibilidade deste gene estar completo; entretanto, a possibilidade dele estar interrompido na porção terminal 3' ou na região promotora ainda não pode ser descartada. Apesar da possibilidade deste gene estar sem parte de sua seqüência regulatória neste plasmídeo, pode-se garantir que pelo menos a região codificadora está completa, podendo ser caracterizada via seqüenciamento.

#### **4.3. Transformação de *P. expansum* com o gene *pepg1***

O mutante *nia/pab/faw* de *P. expansum* foi utilizado nos experimentos de transformação, e a seleção dos transformantes foi realizada em meio mínimo contendo nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. Como marcador seletivo foi usado o gene *nia* de *F. oxysporum*, e como plasmídeo co-transformante foi usado o pPE 15, que contém o gene *pepg1* de *P. expansum* (DIOLEZ *et al.*, 1993 e DIAS, 1997).

A linhagem mutante *nia/pab/faw* foi escolhida porque é uma linhagem geneticamente estável, além de produzir conídios com coloração diferente da linhagem selvagem, permitindo que eventuais contaminantes sejam facilmente discriminados no meio de crescimento, o que é importante considerando que as diversas espécies de *Penicillium* que estão sendo usadas no laboratório são morfologicamente muito semelhantes. Além disso, esta linhagem apresenta atividade de pectinases total e de poligalacturonase similares à da linhagem selvagem, sugerindo que os genes que codificam pectinases não foram afetados pela irradiação UV. Uma outra vantagem do uso desta linhagem é que os transformantes mais promissores na produção de PG podem ser utilizados em cruzamentos, via ciclo parassexual, visando ao aumento da produção de outras enzimas do complexo pectinolítico, visto que apenas a mutação *nia* é

complementada na transformação de modo que os transformantes permanecem com uma mutação morfológica e outra auxotrófica.

Após o período de crescimento, nenhuma colônia foi observada nas placas-controle, em que os protoplastos não foram tratados com o plasmídeo pNH24. Foram obtidos 234 transformantes, e a eficiência de transformação foi de 19 transformantes por  $\mu\text{g}$  de DNA, superior à relatada por alguns autores. QUEIROZ *et al.* (1998) realizaram a transformação de um mutante *nia* de *P. griseoroseum*, obtendo 8 transformantes por  $\mu\text{g}$  de DNA. O fungo *Pleurotus ostreatus* também foi transformado por HONDA *et al.* (2000), sendo obtidas eficiências de transformação de 1 a 5 transformantes por  $\mu\text{g}$  de DNA. No entanto, esta eficiência é considerada baixa, quando comparada às obtidas para *Fusarium oxysporum* (DIOLEZ *et al.*, 1993). Esses autores relataram a obtenção de mais de 600 transformantes por  $\mu\text{g}$  de DNA, quando o gene homólogo foi usado na transformação do fungo. Apesar de não se ter obtido uma eficiência de transformação tão elevada quanto a relatada para *Fusarium oxysporum*, isto não representa uma limitação para o uso desta técnica, visto que algumas condições podem ainda ser otimizadas para a obtenção de um sistema de transformação mais eficiente. Uma alternativa pode ser o uso do gene homólogo de nitrato redutase, recentemente isolado de um banco genômico de *P. expansum* (TORRES, 2001).

Todos os transformantes foram purificados em meio mínimo suplementado com PABA, e avaliados quanto à estabilidade mitótica. Cento e cinquenta e cinco desses transformantes foram considerados geneticamente estáveis em relação ao gene de nitrato redutase, pois, todos apresentaram crescimento vigoroso em meio mínimo, mesmo após várias passagens em meio completo. Os demais transformantes foram estocados, mas não foram utilizados nos experimentos posteriores, pois, formaram colônias abortivas ou setores de crescimento residual, que são indicações de que o gene *nia* estava sendo perdido, mostrando que estas linhagens são geneticamente instáveis quanto a este gene. Este é um fator muito importante, que deve ser considerado quando se faz uso da estratégia de aumento do número de cópias de genes no genoma. O teste de

estabilidade mitótica quanto ao gene de PG não foi realizado. Segundo FINCHAM (1989), o aumento do número de uma seqüência no genoma pode gerar instabilidade genética, pois, aumentando as regiões de homologia, a ocorrência de recombinação é favorecida, possibilitando rearranjos e ou perdas de fragmentos de DNA dos cromossomos.

Todos os transformantes considerados estáveis quanto ao gene de nitrato redutase, foram avaliados quanto à produção de pectinase total em meio mineral tamponado sólido, por meio da medida do diâmetro do halo de degradação da pectina (Tabelas 1 e 2). Pequenas variações na atividade pectinolítica foram observadas, sendo que a maioria dos transformantes apresentou halos de degradação da pectina similares aos das linhagens selvagem e mutante. Este método é utilizado apenas para se fazer uma pré-seleção dos transformantes, devido ao fato de analisar atividade total de pectinase.

Em seguida, linhagens transformantes, apresentando halos de degradação da pectina maiores e menores do que os das linhagens selvagem e mutante, foram analisadas quanto à atividade de PG em meio líquido pelo método do DNS. Cinquenta e três transformantes foram analisados, e foi observada uma grande variação entre as linhagens, sendo que algumas apresentaram atividade de PG inferior à da linhagem selvagem, ao passo que muitas apresentaram aumento na atividade de PG, que variou de 10 a 89 % quando comparado com a atividade de PG da linhagem selvagem utilizada como controle (Figura 10). Não foi possível estabelecer uma correlação entre a atividade de pectinase total medida pelo halo de degradação da pectina e a atividade de PG dosada pelo método do DNS, sendo observados alguns transformantes com halo de degradação da pectina inferior ao da linhagem selvagem, mas com atividade de PG superior à das linhagens selvagem e mutante. Isto pode ser devido à ocorrência de integração do gene de PG nos genes que codificam outras enzimas pectinolíticas, causando sua inativação.

**TABELA 1.** Análise da atividade pectinolítica dos transformantes (T) de *P. expansum*.  
As linhagens selvagem (S) e mutante (M) foram utilizadas como controle

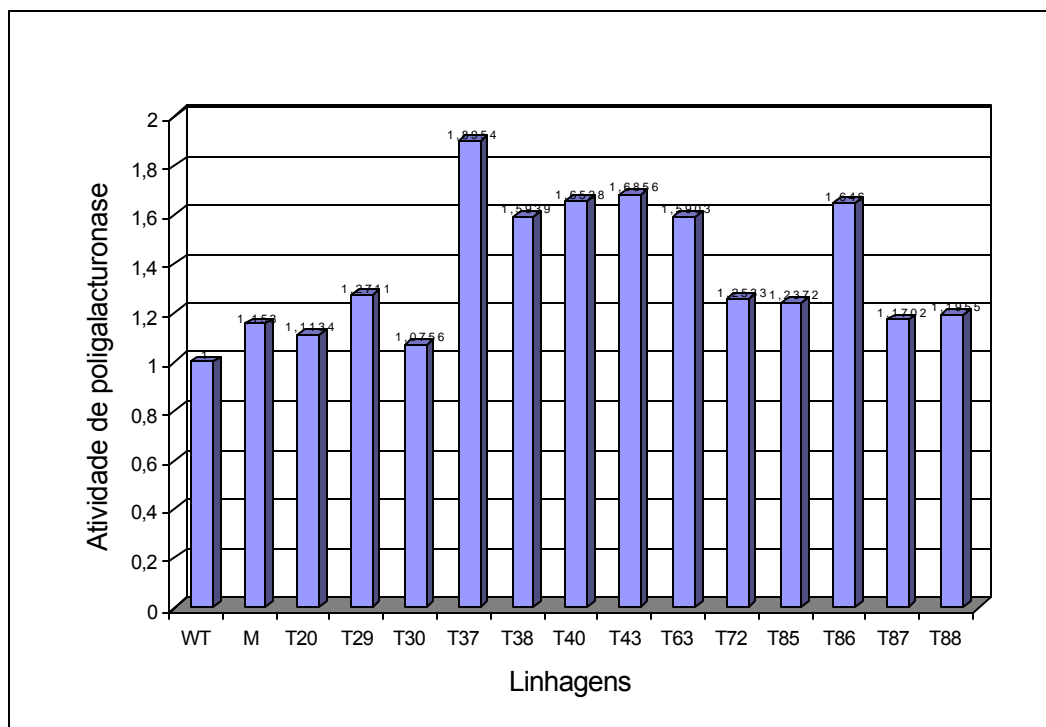
Linhagem	Halo (mm)	Linhagem	Halo (mm)	Linhagem	Halo (mm)
S	30,16	S	31,00	S	30,83
M	30,16	M	31,00	M	30,83
T1	30,16	T33	30,66	T63	30,83
T2	30,00	T34	30,66	T64	31,00
T3	30,33	T35	31,00	T65	31,00
T4	29,66	T36	30,50	T66	30,33
M	30,66	M	30,50	M	32,00
T5	30,00	T37	31,50	T67	32,83
T6	30,50	T38	31,33	T68	32,33
T7	30,83	T39	30,66	T69	31,50
T8	30,00	T40	31,66	T70	32,00
M	31,16	M	31,50	M	31,83
T9	31,00	T41	31,66	T71	32,00
T10	31,33	T42	31,83	T72	31,00
T11	31,33	T43	32,00	T73	32,00
T12	31,50	T44	31,66	T74	32,00
M	31,16	M	31,66	M	32,16
T13	31,00	T45	31,50	T75	32,16
T14	31,33	T46	31,66	T76	32,50
T15	31,55	T47	31,33	T77	32,33
T16	31,50	T48	31,83	T78	32,33
M	30,66	M	32,00	M	32,16
T17	31,16	T49	32,00	T79	32,50
T18	31,16	T50	30,50	T80	32,50
T19	31,00	T51	31,83	M	32,33
T20	31,33	T52	32,00	T81	32,33
M	31,33	M	32,00	T82	32,00
T21	31,16	T53	32,00	T83	32,66
T22	31,16	T54	32,16	T84	32,33
T23	31,16	T55	32,00	M	32,16
T24	31,6	T56	32,00	T85	33,00
M	30,66	M	32,00	T86	32,66
T25	29,33	T57	32,50	T87	32,66
T26	30,33	T58	32,16	T88	32,66
T27	30,66	T59	31,33	M	30,16
T28	29,50	T60	32,50	T89	30,16
M	30,50	M	32,00	T90	30,66
T29	31,66	T61	32,50	T91	30,00
T30	31,16	T62	32,33	T92	30,16
T31	30,83	-	-	-	-
T32	30,83	-	-	-	-

**TABELA 2.** Análise da atividade pectinolítica dos transformantes (T) de *P. expansum*.  
As linhagens selvagem (S) e mutante (M) foram utilizadas como controle

Linhagem	Halo	Linhagem	Halo	Linhagem	Halo
S	30,16	S	30,16	S	30,16
M	30,16	M	30,16	M	30,16
T93	30,00	T114	29,50	T135	30,33
T94	30,50	T115	29,83	T136	30,16
T95	30,00	T116	29,50	T137	30,50
T96	31,00	T117	29,66	T138	29,66
T97	30,50	T118	29,83	T139	30,00
T98	29,50	T119	30,16	T140	29,66
T99	29,50	T120	30,66	T141	29,66
T100	29,50	T121	30,00	T142	29,83
T101	29,50	T122	30,16	T143	30,16
T102	29,50	T123	29,83	T144	29,66
T103	30,00	T124	29,33	T145	30,16
T104	30,00	T125	29,66	T146	29,83
T105	30,00	T126	29,83	T147	30,00
T106	30,00	T127	29,66	T148	30,33
T107	30,00	T128	30,00	T149	30,16
T108	29,00	T129	30,00	T150	29,83
T109	30,16	T130	29,83	T151	30,50
T110	29,66	T131	30,00	T152	30,33
T111	28,16	T132	30,00	T153	29,50
T112	30,00	T133	30,00	T154	29,66
T113	30,00	T134	29,16	T155	30,00

No entanto, não se pode descartar a possibilidade desse fato ser decorrente da baixa sensibilidade da análise pela medida do halo de degradação da pectina. Por outro lado, todos os transformantes que apresentaram halos de degradação da pectina superiores ao isolado selvagem apresentaram atividade de PG também superior à atividade da linhagem selvagem. Outra explicação para a não correlação pode ser o fato da atividade de poligalacturonase depender da atuação prévia da pectinesterase, atuando somente sobre o ácido pécico com um grau de metilação abaixo de 60%. Deste modo, considerando que o substrato usado nesta análise é a pectina, mesmo que haja um transformante superprodutor de PG, este pode não ser identificado como tal porque a baixa relação pectinesterase/poligalacturonase estaria limitando o processo de degradação da pectina. Este problema é eliminado, ou pelo menos amenizado, na dosagem de açúcar redutor pelo método do DNS, pois, nesta análise, o substrato utilizado é o ácido poligalacturônico, o qual é o substrato natural de PG, diminuindo a possibilidade de subestimativa da produção desta enzima nas linhagens analisadas, o que é confirmado pelo fato da maioria dos transformantes ter apresentado aumento na atividade de PG em relação à linhagem selvagem e ao mutante *nia/pab/faw*, quando analisadas por este método.

Considerando que para a degradação da pectina a poligalacturonase deve atuar em sinergismo com a pectinesterase, o ideal seria aumentar o número de cópias de ambos os genes no genoma do fungo, visando eficiente degradação do substrato. CHRISTGAU *et al.* (1996) descreveram o isolamento do cDNA de um gene de PME de *A. aculeatus*. Esse gene foi clonado num vetor de expressão de *Aspergillus*, e usado na transformação de *A. oryzae* para a expressão heteróloga, purificação e caracterização da enzima.



**Figura 10.** Produção de poligalacturonase por linhagens selvagem (WT), mutante (M) e transformantes (T) de *P. expansum*. O padrão para comparação é a linhagem selvagem.

A PME I de *A. aculeatus* foi capaz de remover 75-85% dos grupos metil em pectina altamente metilada, e quando adicionada a pectina juntamente com poligalacturonases, observou-se rápida despolimerização. No entanto, seria muito interessante a realização de estudos visando estabelecer a relação ótima entre estas duas enzimas porque, embora seja necessária a ação conjunta das duas, a taxa PME/poligalacturonase é também importante, pois, uma atividade muito alta de PME pode tornar a desesterificação muito rápida, induzindo à formação de pectatos de cálcio insolúveis antes da hidrólise do ácido pécico pela poligalacturonase.

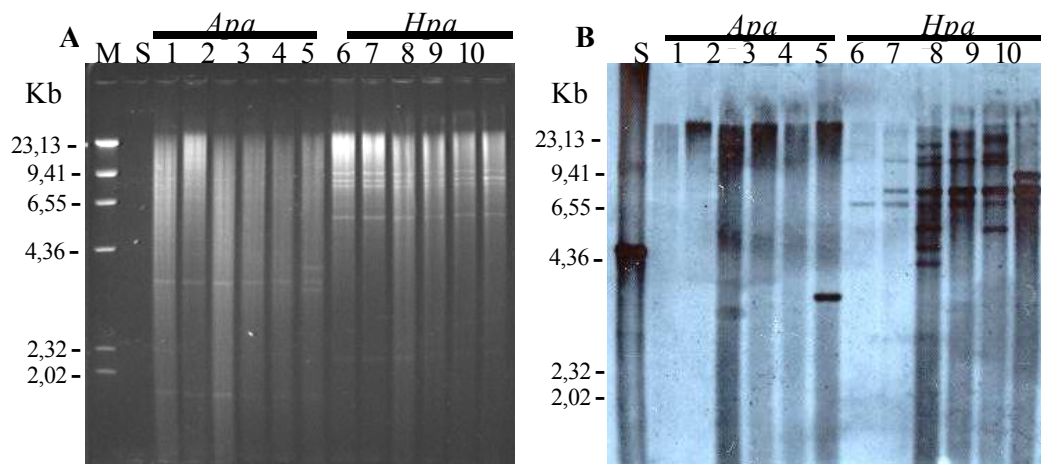
O aumento da atividade de PG nos transformantes de *P. expansum* não foi tão expressivo, quando comparado a dados da literatura, pois, BUSSINK *et al* (1990 e 1991) relataram a obtenção de linhagens transformantes de espécies de *Aspergillus* com aumentos variando de quatro a 55 vezes na atividade de PG em relação à atividade apresentada pela linhagem selvagem. Talvez, este fato pudesse ser explicado em razão do baixo número de integrações do gene de PG no genoma de *P. expansum*, mas BUSSINK *et al.* (1992) relataram que não houve correlação linear entre o aumento do número de cópias do gene de PG no genoma de *A. niger* e a atividade enzimática apresentada pelos transformantes. Esses autores sugeriram que a não correlação é devida à região de integração do gene no genoma. Portanto, é importante o desenvolvimento de sistemas de transformação altamente eficientes para que grande número de transformantes possa ser obtido e analisado, aumentando, assim, a possibilidade de obtenção de transformantes com integrações em regiões que permitam expressão eficiente e superprodução desta enzima. No entanto, o aumento do número de cópias de um gene no genoma nem sempre garante aumento na produção da enzima, pois, os fatores de transcrição gerais e específicos que regulam a expressão do gene podem não ser suficientes para controle eficiente da transcrição, o que explicaria o pequeno aumento da atividade de poligalacturonase detectado nos transformantes de *P. expansum* analisados.

Para análise do padrão de integração do gene *nia* de *Fusarium oxysporum* no genoma de *P. expansum*, foi feita hibridização do DNA total de alguns

transformantes, clivado com enzimas de restrição, usando como sonda o fragmento de 4,0 Kb de *Hind* III do pNH24, e verificou-se a ocorrência de integrações homóloga, heteróloga e em tandem do plasmídeo usado na transformação (dados não apresentados).

A hibridização do DNA total de alguns transformantes com o fragmento de DNA de 4,4 Kb, correspondente ao gene *pgpe1* de *P. expansum*, revelou a ocorrência de integrações heteróloga e em tandem do *pepg1* usado na transformação, semelhante ao que tem sido observado para outros fungos (ALEKSENKO *et al.*, 1995; QUEIROZ *et al.*, 1998). Não foi possível observar integração homóloga do gene *pepg1*, mas a possibilidade de sua ocorrência não pode ser descartada, considerando que o sinal de hibridização observado nas canaletas 1-6, onde a enzima usada na digestão do DNA não cliva o gene, ocorreu numa faixa de fragmentos de aproximadamente 20 Kb e o gel de agarose 0,8% não apresenta boa resolução para fragmentos de DNA nesta faixa de tamanho. No entanto, com a digestão do DNA das linhagens com a enzima *Hpa* I, que cliva o gene *pepg1*, e com a hibridização, foi demonstrado que todas as linhagens transformantes apresentam mais de uma cópia do gene, pois, o padrão de hibridização é bem diferente daquele da linhagem mutante (Figura 11).

Não houve correlação entre o número de cópias do gene e atividade de PG nos transformantes, o que pode ser exemplificado pela comparação dos transformantes T30 e T37, pois, o transformante T30 que aparentemente apresenta maior número cópias do gene dentre os transformantes analisados, apresentou menor atividade de PG. Por outro lado, no transformante T37, que apresenta menor número de cópias do gene, observou-se maior atividade de PG. Isto é provavelmente devido à ocorrência de integração em regiões do genoma que não favorecem a expressão do gene. O aumento da atividade de PG nesses transformantes de *P. expansum* é uma forte evidência de que o plasmídeo recombinante pPE 15 contém o gene *pepg1* completo, inclusive com sua região regulatória.



**FIGURA 11.** Análise dos transformantes de *P. expansum* por hibridização. **A** - Eletroforese em gel de agarose 0,8 % do DNA das linhagens selvagem (1 e 7), mutante (2 e 8) e transformantes T30, T37, T40 e T43 (3-6 e 9-12) clivado com as enzimas de restrição *Apa* I (1-6) e *Hpa* I (7-12), S: Fragmento de DNA de 4,4 Kb de *Sal* I do plasmídeo pPE 15, M: DNA do fago  $\lambda$  clivado com a enzima *Hind* III. **B** - Auto-radiografia da hibridização com o gene *pepg1* de *P. expansum*.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Trabalhos anteriores demonstraram que a linhagem de *P. expansum* isolada em Viçosa apresentou considerável atividade de poligalacturonase associada a baixa atividade celulolítica e nula produção da micotoxina patulina, nas condições de cultivo testadas, evidenciando sua potencial aplicação nas indústrias têxtil e alimentícia. Considerando a potencialidade desta linhagem, diversos estudos fisiológicos e genéticos foram desenvolvidos visando o melhoramento da produção dessas enzimas neste fungo, e uma estratégia que vem sendo utilizada é o isolamento de gene de PG e o aumento do número de cópias do gene no genoma visando à superprodução da enzima.

A partir do banco genômico de *Pencillium expansum*, foram isolados quatro fagos recombinantes denominados  $\lambda$ PEPG1,  $\lambda$ PEPG2,  $\lambda$ PEPG3 e  $\lambda$ PEPG4, utilizando como sonda um fragmento de DNA de 1,6 Kb contendo o gene *pgg1* de *P. griseoroseum*. Análise do padrão de restrição e hibridização do DNA dos fagos  $\lambda$ PEPG3 e  $\lambda$ PEPG4 mostrou fragmentos de DNA genômicos clonados de 14,5 e 16,6 Kb, e também permitiu verificar que estes diferem entre si e que são diferentes do fago  $\lambda$ PE15 que contém o gene *pepg1* de *P. expansum*.

Dois fragmentos de DNA de *Bam* HI de 3,6 e 5,1 Kb dos fagos  $\lambda$ PEPG3 e  $\lambda$ PEPG4, respectivamente, foram subclonados no vetor pBluescript<sup>®</sup> SK+, originando os plasmídeos recombinantes pEPG3 e pEPG4. A presença de um

fragmento de DNA interno de 1,6 Kb de *Xba* I no pEPG4 é uma indicação de que este plasmídeo contém um gene completo de poligalacturonase. Este fragmento de 1,6 Kb foi subclonado no mesmo vetor, dando origem ao plasmídeo pEPG4.1. A análise do mapa físico de restrição do plasmídeo pEPG3 mostrou que um fragmento de DNA de 1,0 Kb de *Bam*HI/*Sal* I hibridiza com a sonda. É possível que o plasmídeo pEPG3 não contenha um gene de PG completo, mas há forte indicação de que pelo menos a região codificadora esteja completa neste plasmídeo. Estes dados confirmam a ocorrência de uma família multigênica codificando as poligalacturonases de *P. expansum*.

A seqüência completa de nucleotídeos do gene *pepg1* foi determinada. A análise dessa seqüência mostrou que este gene apresenta dois possíveis introns de 58 pares de bases, um potencial cis elemento TATA na posição -151 e um potencial CAAT Box na posição -273. A região codificadora contém 1110 pb, após a retirada dos introns, e a partir desta seqüência foi deduzida uma proteína com 370 aminoácidos. Esta seqüência de aminoácidos apresenta grande homologia com poligalacturonases de outros fungos filamentosos, com massa molecular deduzida de 38,4 KDa e ponto isoelétrico teórico de 8,3. A partir do ponto isoelétrico teórico desta seqüência, foi possível inferir que o gene *pepg1* não deve codificar a PGI de *P. expansum*, podendo codificar a PGII ou a PGIII.

O gene *pepg1* foi usado na transformação de protoplastos do mutante *nia/pab/faw* de *P. expansum*, na presença de polietilenoglicol e CaCl<sub>2</sub>. Para a seleção dos transformantes em meio mínimo contendo nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, foi usado o gene *nia* de *Fusarium oxysporum*. Cento e cinquenta e cinco, dentre os 234 transformantes obtidos foram considerados estáveis quanto ao gene de nitrato redutase, e foram analisados quanto à produção de pectinase total em meio mineral sólido tamponado contendo pectina. Foram observadas linhagens transformantes apresentando halos de degradação da pectina maiores e menores que os da linhagem selvagem e mutante, mas a maioria dos transformantes apresentou resultado similar ao destas linhagens.

Cinquenta e três transformantes foram caracterizados quanto à produção de poligalacturonase. Foram observados transformantes com atividade de PG

inferior à da linhagem selvagem, mas a maioria dos transformantes analisados apresentou aumento na atividade dessa enzima, que variou de 10 a 89 % em relação à linhagem selvagem, comprovando que o plasmídeo pPE 15 contém o gene *pepg1* completo, inclusive sua região regulatória, e que é possível aumentar a atividade de PG neste fungo por aumento do número de cópias do gene. A hibridização do DNA total dessas linhagens, clivado com enzimas de restrição, revelou a ocorrência de integração heteróloga e de múltiplas cópias em tandem do gene. Não houve uma correlação linear entre a atividade de pectinase total e a atividade de PG, nem entre o número de cópias do gene e atividade de PG nestes transformantes, demonstrando que nem sempre o aumento do número de cópias do gene leva ao aumento na atividade da enzima.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAÑA, A.; GABILONDO, A.; GERNANDO, F.; MORAGUES, M. D.; DOMINGUES, J. B.; LLAMA, M. J. e SERRA. Pectin lyase production by a *Penicillium italicum* strain. **Appl. Environ. Microbol.** **55**:1612-1616, 1989.
- ALEKSENKO, A.Y.; MAKAROVA, N.A.; NIKOLAEV, I.V. Integrative and replicative transformation of *Penicillium canescens* with a heterologous nitrate-reductase gene. **Curr Genet** **28**:474-477, 1995b.
- ARMALEO, D.; YE, G.-N.; KLEIN, T.M.; SHARK, K.B.; SANFORD, J.C.; JOHNSTON, S.A. Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. **Curr. Genet.** **17**:97, 1990.
- AVILA, J., PÉREZ, M.D., BRITO, N., GONZÁLEZ, C., SILVERIO, J.M. Cloning and disruption of the YNR1 gene encoding the nitrate reductase apoenzyme of the yeast *Hansenula polymorpha*. **FEBS Letters** **366**:137-142, 1995.
- AZEVEDO, J. L., COSTA, S. O. P. Exercícios práticos de genética. São Paulo: ed. Nacional, EDUSP, 288p - 1973.
- BAILEY, M. J. e PESSA, E. Strain and process for production of polygalacturonase. **Enz. Microbiol. Technol.** **12**:266-271, 1990.
- BALLANCE, D.J. e TURNER, G. Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. **Gene** **36**:321-331, 1985.
- BANKS, G.R., SHELTON, P.A., KANUGA, N., HOLDEN, D.W. e SPANOS, A. The *Ustilago maydis* nar 1 gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. **Gene** **131**:69-78, 1993.

- BARACAT, M. C.; VALENTIM, C.; MUCHOVEEJ, J. J. e SILVA, D. O. Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibres. **Biotechnol. Lett.** **11**:899-902, 1989.
- BENTON, W.D. e DAVIS, R.W. Screening of Xgt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. **Science** **196**:180-183, 1977.
- BINNINGER, D.M.; CHEVATON, L.L, SKRZY尼亚, C.; SHUBKIN, C.D.; PUKKILA, P.J. Targeted transformation in *Coprinus cinereus*. **Mol. Gen. Genet** **287**:245, 1991.
- BLANCO, P. Purification and characterization of an endo-polygalacturonase produced by *Fusarium solani* in decayed cantaloupe fruit. **Phytopathology** **87**:108-110, 1998.
- BLANCO, P.; SIEIRO, C. e VILLA, T. Cloning and molecular characterization of a novel polygalacturonase- encoding gene from *Saccharomyces cerevisiae* IM1-8b. **Yeast Genetics and Molecular Biology**, 1998.
- BRITO, A. R. T. Isolamento e caracterização de mutantes de *Penicillium griseoroseum*. Viçosa, UFV. Imprensa Universitária, 68p., 1998 (Tese Mestrado).
- BROWN, A.J.P.; PURVIS, I.J.; SANTIAGO, C.T.; BETTANY, A.J.E.; LOUGHLIN, L.; MOORE, J. Messenger RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene** **72**:151-160, 1988.
- BUSSINK, H.J.D., BROWER, K.B., De GRAAFF, L.H., KESTER, H.C.M. e VISSER, J. Identification and characterization of a second polygalacturonase gene of *Aspergillus niger*. **Current Genetics** **20**: 301-307, 1991a.
- BUSSINK, H.J.D., BUXTON, F.P. e VISSER, J. Expression and sequence comparison of the *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubigenis* genes encoding polygalacturonase II. **Current Genetics** **19**:467-474, 1991b.
- BUSSINK, H.J.D., KESTER, H.C.M. e VISSER, J. Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding prepro-polygalacturonase II of *Aspergillus niger*. **Febs** **273**:127-130, 1990.
- BUSSINK, H.J.D., VAN DEN HOMBERGH, J.P.T.W., VAN DEN IJSSEL, P.R.L.A. e VISSER, J. Characterization of polygalacturonase-overproducing *Aspergillus niger* transformants. **Applied Microbiology and Biotechnology** **37**:324-329, 1992.
- CARY, J.M. BROWN, R., CLEVELAND, T.E., WHITEHEAD, M. e DEAN, R.A. Cloning and characterization of a novel polygalacturonase-encoding gene from *Aspergillus parasiticus*. **Gene** **153**:129-133, 1995.

- CHRISTGAU, S.; KOFOD, L.V.; HALKIER, T.; ANDERSEN, L.N.; HOCKAUF, M.; DÖRREICH, K.; DALBOGE, H. e KAUPPINEN, S. Pectin methyl esterase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast and characterization of the recombinant enzyme. **Biochem J.** **319**:705-712, 1996.
- COOPER, W.; BOUZAYEN, M.; HAMILTON, A.; BARRY, C.; ROSSALL, S. e GRIERSON, D. Use of transgenic plants to study the role of ethylene and polygalacturonase during infection of tomato fruit by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Pathology.** **47**:308-316, 1998.
- CUTLER, S.B.; COOLEY, R. N. Cloning of the nitrate reductase gene of *Stagnospora (Septoria) nodorum* and its use as a selectable marker for targeted transformation. **Curr Genet** **34**:128-137, 1998.
- D'ANGELO, M. A. C. Purificação Parcial e caracterização de poligalacturonases de *Penicillium griseoroseum*. Viçosa, UFV. Imprensa Universitária, (Monografia), ?p., 1998.
- DANTAS-BARBOSA, C.; ARAÚJO, E.F.; MORAES, L.M.P.; VAINSTEIN, M.H.; AZEVEDO, M.O. Genetic transformation of germinated conidia of thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* to hygromycin B resistance. **FEMS Microbiology Letters** **169**:185-190, 1998.
- DEAN, R. A. e TIMBERLAKE, W.E. Regulation of the *Aspergillus nidulans* pectate lyase gene (*pelA*). **Plant Cell** **1**:275-284, 1989a.
- DHAWALE, S.S., PAIETTA, J.V. and MARZLUF, G.A. A new, rapid and efficient transformation procedure for *Neurospora*. **Curr. Genet.** **8**:77-79, 1984.
- DIAS, E. S. Clonagem e caracterização parcial de um gene que codifica a enzima poligalacturonase em *Penicillium expansum*. Viçosa, UFV. Imprensa Universitária, 68p., 1997. (Tese Doutorado).
- DIAS, E. S., ARAÚJO, E. F., GUIMARÃES, W. V., COELHO, L. C., SILVA, D. O. Production and regeneration of *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum* protoplasts. **Revista de Microbiologia** **28**:116-120, 1997.
- DIAS, E. S.; QUEIROZ, M. V.; CARDOSO, P. G.; BARROS, E. G. e ARAÚJO, E. F. Transformation of *Penicillium expansum* with a heterologous gene which confers resistance to benomyl. **World Journal of Microbiology** ('in press'), 1999.
- DIOLEZ, A.; LANGIN, T.; GERLINGER, C.; BRYGOO, Y. e DABOUSSI, M.J. The *nia* gene of *Fusarium oxysporum*: isolation, sequence and development of a homologous transformation system. **Gene** **131**:61-67, 1993.

- DURAND, N.; REYMOND, P.E.; FEVRE, M. Transmission and modification of transformation markers during induced parasexual cycle in *Penicillium roqueforti*. **Curr. Genet.** **21**:377-383, 1992.
- ESMON, P.C.; ESMON, B.E.; SCHAUER, J.E.; TAYLOR, A.; SCHEKMAN, R. **J. Biol. Chem.** **262**: 4387-4394, 1987.
- FERNANDES-SALOMÃO, T. M., AMORIM, A. C. R., CHAVES-ALVES, V. M., COELHO, J. L. C., SILVA, D. O. e ARAÚJO, E. F., Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, **27**(1): 33-36, 1996.
- FERREIRA, G. Produção de patulina por *Penicillium* spp.. Viçosa, UFV. Imprensa Universitária, 46p., 2000 (Tese Mestrado).
- FINCHAM, J. R. S. Transformation in fungi. **Microbiological Reviews** **53**:148-170, 1989.
- FUNGARO, M.H.P.; RECH, E.; MUHLEN, G.S.; VAINSTEIN, M. H.; PASCON, R.C.; QUEIROZ, M.V.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment on intact conidia. **FEMS Microbiology Letters**, 125:293-298, 1995.
- GAO S, CHOI GH, SHAIN L, NUSS DL (1996) Cloning and targeted disruption of *enpg-1*, encoding the major in vitro extracellular endopolygalacturonase of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Appl Environ Microbiol** 62: 1984-1990
- GENBANK WEBSITE. 05 june 1998, submission date.[Online]. Arimoto Y, Arie T, Yamaguchi I Polygalacturonase encoding gene of *Penicillium digitatum*. [22 December 1999, last date accessed.]
- GIOVANNONI, J.J; DELLAPENNA, D.; LASHBROOK, C.C; BENNETT, A.B e FISCHER, R.L. Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic rin (ripening inhibitor) tomato fruit. In Bennet, A.B. e O'Neil, S.D. (eds.), **Horticultural Biotechnology**. Wiley-Liss, Inc., New York, p. 217-227, 1990.
- GOUKA, R.J.; PUNT, P.J.; and van den Hondel, C.A.M.J.J. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **47**:1-11, 1997.
- GURR, S.J., UNKLES, S.E., KINGHORN, J.R. The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. In: KINGHORN, J.R. (Ed.) **Gene structure in eukaryotic microbes**. Oxford: IRL Press, p.93-139, 1987.

- GYSLER, C., HARMSSEN, J.A.M., KESTER, H.C.M., VISSER, J., HEIM, J.. Isolation and structure of the pectin lyase D-encoding gene from *Aspergillus niger*. **Gene** **89**:101-108, 1990.
- HAAS, H., MARX, F., GRAESSLE, S., STÖFFLER, G. Sequence analysis and expression of the *Penicillium chrysogenum* nitrate reductase encoding gene (*niaD*). **Biochimica et Biophysica Acta** **1309**:81–84, 1996.
- HARMSSEN, J.A.M., KUSTERS-VAN SOMEREN, M., VISSER, J.. Cloning and expression of a second *A. niger* pectin lyase (*pelA*): indications of a pectin lyase family in *A. niger*. **Curr. Genet** **18**:161-166, 1990.
- HERRERA-ESTRELA, A., GOLDMAN, G. H. e VAN MONTAGU, M. High-efficiency transformation system for the biocontrol agents *Trichoderma* spp. **Mol. Microbiol.** **4**:839-843, 1990.
- HONDA, Y.; MATSUYAMA, T.; IRIE, T.; WATANABE, T.; KUWAHARA, M. Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*. **Curr Genet** **37**:209-212, 2000.
- HONG, S. B.; e TUCKER, M. L. Genomic organization of six tomato polygalacturonases and 5' upstream sequence identity with *tap1* and *win2* genes. **Molecular General Genetics** **258**:479-487, 1998.
- ISHIDA Y, KAKIBUCHI K, HIRAO Y, IZUMORI K. (1997) Cloning and characterization of a polygalacturonase-encoding gene from *Penicillium janthinellum*. **J Ferment Bioeng** **84**: 257-260.
- KAWANO, C.Y.; CHELLEGATTI, M.A.S.C.; SAID, S. e FONSECA, M.J.V. Comparative study of intracellular and extracellular pectinases produced by *Penicillium frequentans*. **Biotechnol. Biochem** **29**:133-140, 1999.
- KESTER, H.C.M. e VISSER, J. Purification and characterization of polygalacturonases produced by the hyphal fungus *Aspergillus niger*. **Biotechnol. Appl. Biochem.** **12**:150-160, 1990.
- KHAHN, N.Q., ALBRECHT, H., RUTTKOWSKI, E., LÖFFLER, F., GOTTSCHALK, M., JANY, K.D. Nucleotide sequence and derived amino acid sequence of a pectinesterase cDNA isolated from *Aspergillus niger* strain RH5344. **Nucleic Acids Res.** **18**:4262, 1990.
- KAHANH, N.Q.; LEIDINGER, K.; ALBRECHT, H.; RUTTKOWSKI, E.; GOTTSCHALK, M. Effects of promoters on the enhancement of pectin methyl esterase expression in *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters.** **14**:1047-1052, 1992.
- KITAMOTO N, MATSUI J, KAWAI Y, KATO A, YOSHINO S, OHMIYA K., TSUKAGOSHI N. Utilization of the TEF1- $\alpha$  gene (*TEF1*) promoter for

- expression of polygalacturonase genes, *pgaA* and *pgaB*, in *Aspergillus oryzae*. **Appl Microbiol Biotechnol** 50: 85-92, 1998.
- KUBICEK-PRANZ, E.M. GRUBER, F. KUBICEK, C.P. Transformation of *Trichoderma reesei* with the cellobiohydrolase as a mean for obtaining strains with increase cellulase production and specific activity. **Journal of Biotechnology** 20:83-94, 1991.
- KLEIN, T.M.; ARENTZEN, R.; LEWIS, P.A; FITZPATRICK-McELLIGOTT, S. Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. **Bio/Technology** 10:286, 1992.
- LANA, T. G. Isolamento e caracterização de linhagens diplóides e recombinantes em *Penicillium expansum*. Viçosa, UFV. Imprensa Universitária, (Tese Mestrado), 55p., 1999.
- LEUCHTENBERGER, A. e MAYER, G. Synthesis of different pectinases by filamentous growing *Aspergillus niger* mutants. **Folia Microbiol.** 36:362-66, 1991.
- LOPES-SHIKIDA, S. A. R. Isolamento seleção e preservação de fungos produtores de pectinases. Piracicaba, ESALQ, (Tese Mestrado), 114 p., 1995.
- MAY, G. S., GAMBINO, J.WEATHERBE, J. A. e MORRIS, N.R. Identification and functional analysis of  $\beta$ -tubulin genes by site-specific integrative transformation in *Aspergillus nidulans*. **J. Cell. Biol.** 100:712-718, 1985.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem** 31:426-428, 1959.
- MIRANDA, R.P. Purificação e Caracterização Parcial de Poligalacturonases de *Penicillium expansum*. Viçosa, UFV. Imprensa Univesitária, (Tese Mestrado), 55p., 1997.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MACDONALD, K. D. e BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics** 5:141-238, 1953.
- QUEENER, S.W., INGOLIA, T.D., SKATRUD, P.L., CHAPMAN, J.L. e KASTER, K.R. A system for genetic transformation of *Cephalosporium acremonium*. In Leive, L. (ed.), Microbiology – American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 468-472, 1985.
- QUEIROZ, M. V.; BARROS, A. O.; BARROS, E. G.; GUIMARÃES, W. V. e ARAÚJO, E. F. Transformation of *Penicillium griseoroseum* nitrate reductase mutant with the *nia* gene from *Fusarium oxysporum*. **Can. J. Microbio.** 44:1-3, 1998.

- RAMBOSEK, J.; LEACH, J. Recombinant DNA in filamentous fungi: Progress and prospects. **CRC Crit. Rev. Biotechnol.** **6**: 357-392, 1987.
- RIBON, A.O.B., COELHO, J.L.C., BARROS, E.G., ARAÚJO, E.F. Cloning and characterization of a gene encoding the endopolygalacturonase of *Penicillium griseoroseum*. **Biotechnology Letters** **21**:395-399, 1999.
- RODRIGUEZ-PALENZUELA, P. BURR, T.J, COLLMER A. Polygalacturonase is a virulence factor in *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. **J. Bacteriol.** **173**:6547-6552, 1991.
- ROSS, J. mRNA stability in mammalian cells. **Microbiol Rev.** **59**:423-450, 1995.
- RUTTKOWSKI, E. LABITZKE, R., KHANH, N.Q., LOFFLER, F., GOTTSCHALK, M. e JANY, K.D. Cloning and DNA sequence analysis of a polygalacturonase cDNA from *Aspergillus niger* RH5344. **Biochimica et Biophysica Acta** **1087**:104-106, 1990.
- RUTTKOWSKI, E.; KHANH, N. Q.; WIENTJES, F. J. e GOTTSCHALK, M. Characterization of a polygalacturonase gene of *Aspergillus niger* RH5344. **Molecular Microbiology** **5**:1353-1361, 1991.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2 ed. Cold spring harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory, s. n.p, 1989.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **74**:5463-5467, 1977.
- SANTIAGO, C.T.; PURVIS, I.J.; BETTANY, A.J.; BROWN, A.J.P. The relationship between mRNA stability and length in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Res** **14**:8347-8360, 1986.
- SHARMA, H. S. S. Screening of polysaccharide-degrading enzymes for retting flax stem. **International Biodeterioration** **23**:181-6, 1987.
- SIÉSSERE, V. FONSECA, M.J.V., SAID, S. Extra- cellular polygalacturonases from *Penicillium frequentans*. separation and regulatory aspects. **J. Gen. Microbiol.** **138**:1801-1805, 1991.
- SÓLIS.; FLORES, M.E. e HUITRÓN, C. Isolation of endopolygalacturonase hyperproducing mutants of *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. **Biotechnology Letters** **10**:751-756, 1990.
- SOMEREN, M.A.K.; HARMSSEN, J.A.M.; KESTER, C.M.; VISSER, J. Structure of the *Aspergillus niger* *pelA* gene and its expression in *Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans*. **Curr Genet** **20**:293-299, 1991.

- SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.** **98**:503-517, 1975.
- SPEACHT, C.A.; DIRUSSO, C.C.; NOVOTNY, C.P. e ULLRICH, R.C. - A method for extracting high molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. **Anal. Biochem.** **119**:158-163, 1982.
- TORRES, A.R. Isolamento e caracterização do gene que codifica nitrato redutase em *Penicillium expansum*. Viçosa, UFV. Imprensa Universitária, (Tese Mestrado) 50p., 2001.
- TUDZYNSKI, B., MENDE, K., WELTRING, K.M., KINGHORN, J. R., UNKLES, S.E. The *Gibberella fujikuroi niaD* gene encoding nitrate reductase: isolation, sequence, homologous transformation and electrophoretic karyotype location. **Microbiology.** **142**:533-539, 1996.
- TURNER, G.; BALLANCE, D.J. Cloning and transformation in *Aspergillus*. **In: Gene Manipulations in Fungi** (J.W. Bennett L.L. Lasure, eds.). Academic Press, 259, 1985.
- 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. Transformation of *Aspergillus niger* with the homologous nitrate reductase gene. **Gene** **78**:157-166, 1989.
- VRIES, J.A.; VORAGEN, A.G.L.J.; ROMBOUTS, F.M. e PILNIK, W. Structural studies of apple pectins with pectinolytic enzymes. In: Fishman, M.M.; Jen, J.J. (eds). Chemistry and function of pectins (ACS Symposium series, vol 310). American chemistry society, Washington DC, pp 38-48, 1986.
- WAGNER, F.; KUSSEROW, H.; SCHÄFER, W. Cloning and targeted disruption of two polygalacturonase genes in *Penicillium olsonii*. **FEMS Microbiology Letters** **186**:293-299, 2000.
- WHITEHEAD, M.P., SHIEH, M.T., CLEVELAND, T.E., CARY, J.W. e DEAN, R.A. Isolation and characterization of polygalacturonase genes (*pecA* and *pecB*) from *Aspergillus flavus*. **Applied and Environmental Microbiology** **61**:3316-3322, 1995.
- YELTON, M. M., HAMER, J.E., e TIMBERLAKE, W.E. Transformation of *Aspergillus niger* by using a trpC plasmid. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **81**:1470-1474, 1984.