PARASSEXUALIDADE E ELETROFUSÃO EM *Aspergillus niger*

VITOR WARWAR

Biólogo

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio Azevedo

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Agosto - 1990

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Warwar, Vitor

W299p Parassexualidade e eletrofusão em Aspergillus
niger. Piracicaba, 1990.
136p. ilustr.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Aspergilo - Ciclo parassexual 2. Aspergilo -
Eletrofusão 3. Fungo patogênico I. Escola Superior
de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 589.2

PARASSEXUALIDADE E ELETROFUSÃO EM *Aspergillus niger*

VITOR WARWAR

Aprovada em 09.10.1990

Comissão julgadora:

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

ESALQ/USP

Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Carneiro Vieira

ESALQ/USP

Prof. Dr. Renato Bonatelli Jr.

IB/UNICAMP

Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Orientador

Aqui

temos um passado

e um presente

Aqui

está nosso futuro.

Para

Ju

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com a contribuição fundamental de dois grandes pesquisadores. Primeiramente, o Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo cuja orientação e confiança foram o eixo deste trabalho. Ao Prof. Cesare Mansueto Giulio Lattes, do Instituto de Física "Gleb Wataghin" devo não só minhas citações sobre o Efeito Costa Ribeiro mas também o gosto pela pesquisa.

Acredito também que sem a convivência amigável dos colegas de laboratório, este trabalho seria consideravelmente mais difícil. Dentre estes amigos, destaco o técnico Carlos Nolasco cujo trabalho faz hoje parte desta dissertação.

A Universidade de São Paulo e a CAPES por todas as facilidades concedidas, meu profundo reconhecimento.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XI
RESUMO.....	XIV
SUMMARY.....	XVI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Eletrofusão.....	5
2.1.1. Eletrofusão em células vegetais	7
2.1.2. Eletrofusão em células animais.	14
2.1.3. Eletrofusão em fungos.....	18
2.1.4. Considerações teóricas.....	21
2.1.4.1. A membrana do ponto de vista eletrônico.....	21
2.1.4.2. Dielétroforese.....	23
2.1.4.3. Colápsso dielétrico da membrana.....	26
2.1.4.4. Colápsso dielétrico da membrana e o Efeito Costa Ribeiro.....	29
2.2. Produção de ácido cítrico.....	33
2.2.1. Histórico.....	33
2.2.2. Produção de ácido cítrico por	

<i>Aspergillus niger</i>	34
2.2.3. Melhoramento da produção de ácido cítrico e o ciclo parassexual em <i>Aspergillus</i> <i>niger</i>	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1. Microrganismos utilizados.....	45
3.1.1. <i>Aspergillus niger</i> 10V10.....	45
3.1.2. <i>Aspergillus niger</i> 391H6.....	45
3.2. Meios de cultura e soluções utilizadas.....	46
3.2.1. Meio mínimo.....	46
3.2.2. Meio completo.....	46
3.2.3. Meio mínimo líquido.....	47
3.2.4. Meio completo líquido.....	47
3.2.5. Meio farelo de trigo.....	47
3.2.6. Meio fermentação.....	47
3.2.7. Meio esporulação.....	47
3.2.8. Solução de vitaminas.....	48
3.2.9. Solução de caseína hidrolizada.	49
3.2.10. Suplementos adicionados ao meio mínimo.....	49
3.2.11. Solução salina.....	50
3.2.12. Solução Tween 80.....	50
3.2.13. Meio mínimo com 2% de meio completo.....	51

3.2.14. Meio mínimo com 4% de meio completo.....	51
3.2.15. Solução estoque de Benlate®...	51
3.2.16. Solução de polietileno glicol.	51
3.2.17. Soluções tampões.....	52
3.2.17.1. Tampão fosfato 0,125M pH 7,10	52
3.2.17.2. Tampão fosfato 0,020M pH 5,80	52
3.2.17.3. Tampão citrato 0,05M pH 4,80	53
3.2.17.4. Tampão malato 0,02M pH 5,80	53
3.2.18. Estabilizadores osmóticos.....	54
3.2.19. Reagente ácido dinitrosalisilico.....	55
3.3. Sistema de filtro para técnica de enriquecimento.....	56
3.4. Uso de palitos para transferência de colônias.....	56
3.5. Esterilização e incubação.....	56
3.6. Verificação da estabilidade genética..	57
3.7. Sobrevivência à luz ultravioleta.....	57
3.8. Obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos.....	58
3.9. Enriquecimento de mutantes por filtração.....	59
3.10. Isolamento e regeneração de protoplastos.....	60
3.11. Determinação da susceptibilidade ao polietileno glicol.....	61

3.12. Técnicas genéticas.....	62
3.12.1. Obtenção de diplóides.....	62
3.12.1.1. Ciclo parassexual.....	62
3.12.1.2. Fusão química de protoplastos.....	63
3.12.1.3. Eletrofusão de protoplastos.	63
3.12.2. Caracterização de diplóides...	68
3.12.3. Obtenção e caracterização de segregantes.....	69
3.13. Determinação de atividade celulolítica.....	69
3.13.1. Determinação da atividade de papel de filtro.....	70
3.14. Determinação da produção de ácido cítrico.....	71
3.14.1. Determinação da quantidade de ácido cítrico.....	71
3.15. Análises estatísticas.....	72
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
4.1. Sobrevivência à luz ultravioleta.....	73
4.2. Obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos após tratamento com luz ultravioleta.....	78
4.2.1. Determinação das frequências de reversão das mutações auxotróficas e morfológicas	

obtidas.....	83
4.3. Crescimento em meio completo e em meio de esporulação.....	84
4.4. Determinação da produção de ácido cítrico.....	86
4.5. Determinação da atividade celulolítica	90
4.6. Estudos genéticos.....	93
4.6.1. Verificação das estabilidade genética.....	93
4.6.2. Ciclo parassexual.....	94
4.6.3. Fusão química de protoplastos..	100
4.6.3.1. Susceptibilidade ao PEG.....	103
4.6.4. Eletrofusão de protoplastos....	105
4.7. Sobre os processos de hibridação e o melhoramento genético de <i>Aspergillus niger</i>	113
5. CONCLUSÕES.....	114
6. BIBLIOGRAFIA.....	117

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
01 - Esquema da membrana plasmática do ponto de vista eletrônico.....	22
02 - Representação diagramática do fenômeno de dielétroforese.....	25
03 - Ácido cítrico.....	34
04 - Diagrama de operação do equipamento BTX 401A.....	65
05 - Curva de sobrevivência da linhagem 10V10..	75
06 - Curva de sobrevivência da linhagem 391H6..	75
07 - Curva de sobrevivência da linhagem 391H6	77
08 - Mutantes morfológicos e auxotróficos da linhagem de <i>Aspergillus niger</i> 10V10.....	78
09 - Mutantes morfológicos e auxotróficos da linhagem de <i>Aspergillus niger</i> 391H6.....	79
10 - A esquerda a colônia selvagem da linhagem 391H6. A direita o mutante branco 391H6 _{why}	82
11 - 391H6 _{leu₁why₁} //391H6 _{arg₁} em meio completo mais Benlate®.....	99
12 - Configuração em "colar-de-contas" de protoplastos de <i>Aspergillus niger</i>	107
13 - Relação entre intensidade de campo elétrico e a percentagem de colônias	

prototróficas	obtidas.	Cruzamento	
391H6 _{leu^rwhy^r}	X 391H6 _{arg¹}		110
14 - Relação entre intensidade de campo			
elétrico e a percentagem de colônias			
prototróficas	obtidas.	Cruzamento	
391H6 _{leu^rwhy¹}	X 10V10 _{arg¹}		110

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
01 - Constantes termo-dielétricas de diferentes dielétricos.....	30
02 - Diferentes estabilizadores osmóticos para o isolamento e regeneração de protoplastos.....	59
03 - Amplitude em kV de campo elétrico utilizando câmara modelo Flat Electrode P/N 480.....	66
04 - Percentagem relativa de conídios da linhagem 10V10 de <i>Aspergillus niger</i> sobreviventes a luz ultravioleta.....	73
05 - Percentagem relativa de conídios da linhagem 391H6 de <i>Aspergillus niger</i> sobreviventes a luz ultravioleta.....	73
06 - Percentagem relativa de conídios sobreviventes do mutante morfológico branco à luz ultravioleta.....	76
07 - Simbologia utilizada para denominar os mutantes obtidos.....	79
08 - Frequência de reversão das mutações auxotróficas e morfológicas das linhagens 10V10 e 391H6.....	83
09 - Diâmetro médio da colônia da linhagem	

391H6 e 10V10 ao terceiro dia de crescimento.....	84
10 -Produção de ácido cítrico nas linhagens 391H6 e 10V10.....	86
11 -Análise de variância dos dados da Tabela 10.....	87
12 -Teste de Turkey para as médias dos diferentes tratamentos da Tabela 10.....	87
13 -Atividade celulolítica das linhagens 10V10 e 391H6 de <i>Aspergillus niger</i>	90
14 -Análise de variância da atividade celulolítica das linhagens 10V10 e 391H6.	91
15 -Obtenção de heterocários para a obtenção de diplóides (ROPER, 1952) e desenvolvimento de película.....	93
16 -Desenvolvimento de colônias heterocarióticas a partir de películas...	95
17 -Diâmetros médios de conídios (μm) e formação de setores produtos de cruzamento.....	97
18 -Análise mitótica do diplóide 391H6 _{arg₁} // 391H6 _{leu₁ why}	98
19 -Análise mitótica do diplóide 10V10 _{arg} // 391H6 _{leu₁ why}	99
20 -Isolamento e regeneração de protoplastos	

da linhagem 10V10 de <i>Aspergillus niger</i> ...	100
21 -Isolamento e regeneração de protoplastos	
da linhagem 391H6 de <i>Aspergillus niger</i> ...	100
22 -Efeito tóxico de solução de PEG.....	102
23 -Porcentagem relativa de colônias	
prototróficas obtidas por fusão química	
de protoplastos.....	103
24 -Parâmetros dieletroréticos de	
protoplastos de <i>Aspergillus niger</i>	104
25 -Frequência, tempo e amplitude de campo	
elétrico para indução da configuração	
"pearl-chain".....	105
26 -Viabilidade relativa de protoplastos de	
<i>Aspergillus niger</i> ao campo elétrico.....	107
27 -Porcentagem relativa de colônias	
prototróficas obtidas por eletrofusão de	
protoplastos.....	108

PARASSEXUALIDADE E ELETROFUSÃO EM *Aspergillus niger*

Autor: VITOR WARWAR

Orientador: PROF. DR. JOÃO LÚCIO AZEVEDO

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a avaliação de diferentes metodologias para a obtenção de heterocários do fungo filamentoso *Aspergillus niger*, linhagens 10V10 e 391H6. Foram avaliadas a metodologia parassexual clássica, fusão química de protoplastos e a eletrofusão de protoplastos. Também foram avaliadas a capacidade de produção de ácido cítrico das linhagens como também a atividade celulolítica.

Primeiramente foram obtidos mutantes auxotróficos e morfológicos por indução através de luz ultravioleta. Procedeu-se então o cruzamento pela via parassexual clássica, por fusão de protoplastos com o auxílio de polietileno glicol e por eletrofusão. A atividade celulolítica deu-se através da digestão de papel de filtro por enzimas produzidas pelo fungo. A produção de ácido cítrico foi avaliada por titulação do meio de fermentação.

Os resultados demonstraram que a eletrofusão de protoplastos foi a metodologia mais conveniente para a obtenção de heterocáries; as linhagens apresentaram uma alta atividade celulolítica e pelo menos a linhagem 10V10 demonstrou produzir ácido cítrico.

PARASEXUALITY AND ELECTROFUSION IN *Aspergillus niger*

Author: VITOR WARWAR

ADVISER: PROF. DR. JOÃO LÚCIO AZEVEDO

SUMMARY

Different methodologies to obtain heterocaries of *Aspergillus niger* were evaluated. In this work were used two industrial citric acid producer strains: 10V10 and 391H6. The classical parasexual methodology, chemical fusion of protoplasts and electrofusion of protoplasts were analyzed. It was also evaluated the ability of citric acid production and cellulolytic activity.

First of all, auxotrophic and morphological mutants were obtained by induction with ultraviolet light. After these crosses via parasexual cycle, protoplast fusion with polyetilen glicol and electrofusion were done. The cellulolytic activity was done by the digestion of filter paper by the enzymes produced by the fungi. The citric acid production, by its turn, was evaluated by title of the fermentation media.

The results show that the electrofusion of

protoplasts was the most suitable methodology to obtain heterocaries; both strains show a high cellulolytic activity and, not unsurprisingly, the strain 10V10 showed citric acid production.

1. Introdução.

A partir dos anos 80 os problemas relacionados com saúde, alimentação, fornecimento de matéria prima, energia e despoluição do meio ambiente passaram a ter um carácter diferente. Até há poucos anos atrás, tais questões poderiam ser equacionadas a partir das tecnologias pré-existentes.

Até o final deste século estima-se que a população mundial chegue a 6 bilhões de pessoas. Como consequência direta disso, haverá um aumento ainda maior das necessidades humanas básicas como, por exemplo, a alimentação e a preservação da qualidade da água.

É neste contexto que se insere o papel da biotecnologia. Biotecnologia, segundo GYLLENBERG (1986) é, em um sentido amplo, qualquer tecnologia que utilize organismos vivos (ou parte deles) para fazer ou modificar produtos, melhorar plantas e animais e desenvolver

microrganismos para usos específicos. A biotecnologia surge, então, como um instrumento capaz de preencher as necessidades da humanidade a partir de um maior aproveitamento da grande variabilidade existente no mundo vivo. É nesta variabilidade que se encontra a única fonte verdadeiramente renovável de energia, a biomassa.

Há 800 bilhões de toneladas de biomassa se apenas for considerado o material vegetal seco. O equivalente energético de toda essa biomassa é de cerca de 3.10^{22} joules, o que corresponde às atuais reservas de combustíveis fósseis.

Em todo o planeta, 73 bilhões de toneladas de material vegetal seco são produzidos anualmente, o que equivalem a vinte vezes mais que toda a energia fóssil consumida pela humanidade ou 200 vezes mais a energia contida na alimentação dos 4 bilhões de habitantes da Terra (CHATIER & MÉRIAUX, 1980). Destes 73 bilhões de toneladas produzidas apenas 3,3 bilhões são consumidas de alguma maneira pela humanidade, grande parte do restante é consumida pelos microrganismos (ESTERBAUER, 1986).

Esta biomassa de origem vegetal é constituída por três componentes básicos: celulose (25 a 50%), hemicelulose (20 a 40%) e lignina (10 a 35%). Até o final da II Grande Guerra Mundial, eram produzidos na Europa e nos Estados Unidos, açúcares como a glicose e pentose a partir do tratamento destes compostos

ligno-celulolíticos por ácidos e altas temperaturas. O baixo preço do petróleo no período pós-guerra fez com que esse processo se tornasse inviável economicamente para a produção de açúcares fermentáveis. Além disso a hidrólise ácida da celulose permite um aproveitamento de apenas 60% do estimado teórico possível.

A hidrólise enzimática é um outro processo de aproveitamento de materiais ligno-celulolíticos. Neste processo há uma vantagem, segundo CUSKEY et alli (1982), de uma eficiência de conversão de 90%.

A hidrólise enzimática permite que microrganismos não só participem da conversão desta biomassa em açúcares fermentáveis, como também permite a utilização destes açúcares para a síntese de substâncias como aminoácidos, vitaminas, proteínas e ácidos orgânicos.

A importância, então, que assume os microrganismos justificam o estudo de metodologias que permitam uma maior manipulação genética.

O presente trabalho utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus niger*, tem como objetivo principal a avaliação de metodologias que aumentem a eficiência dos processos de hibridação e recombinação.

Dentre as metodologias utilizadas destaca-se a eletrofusão. A eletrofusão tem permitido índices e combinações de fusão celular nunca antes obtidos, tanto em células animais quanto em células de origem vegetal.

O uso desta nova metodologia em fungos filamentosos é ainda muito restrita. Mas com o aumento cada vez maior do interesse e a maior importância assumida por estes microrganismos faz com que técnicas como a da eletrofusão (rápida e eficiente) tornem-se imprescindíveis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Eletrofusão

A eletrofusão é o processo pelo qual se obtém fusão de células através da indução de fenômenos físicos a nível de hialoplasma e membrana. Primeiramente as células são submetidas a um campo elétrico não uniforme, ou seja, com intensidade variável no tempo e no espaço. Tal campo elétrico faz com que as células assumam uma configuração em "colar-de-contas" (pearl-chain) resultando em um íntimo contato célula a célula. A este fenômeno dá-se o nome de dieletroforese (ZIMMERMANN, 1982).

Após a obtenção da dieletroforese as células, são então, submetidas a um campo elétrico de alta intensidade e curta duração provocando o colapso das membranas e a consequente fusão celular (ZIMMERMANN, 1982 e SAUNDERS, 1984).

Existem, além da eletrofusão, outras metodologias de fusão celular. Por exemplo existe a fusão celular induzida por vírus, descrita por POST & ALLISON (1973) mas restrita a células animais. MARTINEZ-BAZENET et alli (1988) descreveram a ocorrência de proteínas indutoras de fusão entre lipossomos e organelas de *Aspergillus niger*.

BINDING et alli (1988) descreveram metodologia que utiliza gel de agarose como agente fusogênico em protoplastos de plantas. Os protoplastos são simplesmente semeados em meio de cultura e por cima é adicionada uma camada de gel de agarose.

A fusão química de células e protoplastos é, sem dúvida, a mais utilizada e foi descrita primeiramente por KAO & MICHAYLUK (1974) e WALLIN et alli (1974) que induziram a fusão de protoplastos através do uso de polietileno glicol (PEG) em plantas. Em fungos filamentosos o primeiro relato de fusão quimicamente induzida foi feito por ANNÉ & PEBERDI (1975).

BATES (1983) E SAUDERS (1984) enumeram algumas vantagens e desvantagens da fusão celular induzida por campo elétrico. Entre as vantagens se destacam:

- a) Todo o procedimento pode ser monitorado através da observação do processo via microscopia óptica. Isto facilita a definição de parâmetros;
- b) A eletrofusão não provoca uma grande queda na

viabilidade das células ou protoplastos como os agentes fusogênicos químicos (HAYDU et alli, 1977);

- c) Foram observados índices de fusão celular superiores a 80%, tanto em protoplastos de origem vegetal como em células animais (ZIMMERMANN & SCHEURICH, 1981; BATES et alli, 1983 e FINAZ, 1984);
- d) Quando células são submetidas a eletrofusão apenas uma porção restrita da membrana é afetada. Nos processos em que a fusão ocorre através do uso de agentes químicos como PEG e Ca^{++} toda a membrana é afetada resultando numa maior perda de conteúdo celular e conseqüentemente em um decréscimo da viabilidade;
- e) Os procedimentos de eletrofusão são mais rápidos que os processos químicos, não durando mais que microsegundos.

KUMAR & COCKING (1987) definindo a importância da fusão de protoplastos no estudo da herança citoplasmática, colocaram como importante o monitoramento das condições de fusão para se obter bons resultados nesta área, uma vez que o monitoramento seria muito difícil de ser obtido com fusão química de protoplastos.

As desvantagens da eletrofusão seriam basicamente duas: alto custo inicial dos equipamentos envolvidos e a necessidade de um treinamento específico de recursos humanos envolvidos.

2.1.1. Eletrofusão em células vegetais

SENDA et alli, (1979) observaram pela primeira vez a fusão de protoplastos de *Rauwolfia serpentina* var. *Bentham* e cevada. Com o auxílio de microeletrodos, dois protoplastos foram colocados em contato. Em seguida um estimulador elétrico ligado aos microeletrodos emitiu um pulso elétrico com intensidade variando entre 5 e 12 μ amp por 5 mseg. Foi observada a fusão entre as duas células vegetais embora não se tenha regenerado o produto de fusão.

ZIMMERMANN & SCHEURICH (1981a) apresentaram pela primeira vez o fenômeno da dielectroforese associado com o colapso das membranas e a consequente fusão. Foram utilizados protoplastos de *Vicia faba* coletados por dielectroforese (amplitude = 500 v ; frequência = 500 kHz). A fusão deu-se a uma amplitude de 1,65 kv com a duração de 50 μ seg. Foi observado também que o processo de fusão celular se completa após 40 min da ocorrência do colapso de membrana. Foi também observado que os produtos de fusão eram formados pela fusão de 2 a 3 protoplastos.

ZIMMERMANN & SCHEURICH (1981b) observaram a ocorrência de eletrofusão em protoplastos de mesófilo de *Avena sativa*, *Zea mays*, *Vigna aconitifolia*, *Petunia axillaris* e *Amaranthus cruentus*. BATES et alli (1983) repetiram as mesmas técnicas e espécies utilizadas por ZIMMERMANN & SCHEURICH (1981b) e observaram que a metodologia era altamente reproduzível embora tenham

utilizado equipamentos distintos. Além de demonstrar a reprodutibilidade dos procedimentos de eletrofusão os autores conseguiram manter uma cultura de protoplastos de *Vignia aconitifolia* e observar a regeneração da parede celular assim como divisão celular.

VIENKEN et alli (1981) demonstraram que protoplastos e vacúolos provenientes de diferentes espécies vegetais e de diferentes tecidos podem ser fundidos por eletrofusão. Até então acreditava-se que havia uma grande incompatibilidade entre tonoplastos e membrana plasmática. Foi também demonstrado que a visualização do processo de eletrofusão (dieletroforese e fusão) pode ser otimizada quando se adiciona ao meio de fusão substâncias como Ficoll ou Percoll. Estas substâncias atuam impedindo que os protoplastos e vacúolos precipitem ou flutuem, dificultando a visualização do processo.

SALHANI et alli (1982) observaram que à medida em que a condutividade hidráulica da membrana aumenta e conseqüentemente a condutividade elétrica do meio aumenta também, a integridade da membrana dos protoplastos diminui. Os autores, trabalhando com protoplastos de *Avena sativa* e *Vicia faba* como modelo, usaram pela primeira vez uma fase intermediária entre a dieletroforese e a fusão. Esta fase denominada de compressão, é aquela onde a intensidade do campo elétrico é aumentada em 30% com a finalidade de aumentar a área de contato entre os

protoplastos. Ainda neste trabalho, SALHANI et alli (1982) demonstraram através de dados experimentais e de um modelo matemático que não há diferenças significativas na condutividade hidráulica da membrana (L_p) quando as células são submetidas a intensidades de campo elétrico semelhantes às intensidades utilizadas nos processos de eletrofusão. Em outras palavras, as mudanças a nível de membranas não comprometem irreversivelmente a estrutura das mesmas.

TEMPELAAR & JONES (1985) obtiveram e regeneraram o até nível de calo, protoplastos (erroneamente denominado de protoblastos pelos autores) de *Solanum brevidens* e *Nicotiana rustica*.

BATES & HASENKAMPF (1985) obtiveram 6% de heterocários entre *Nicotiana plumbaginifolia* e *Nicotiana tabacum*. Os parâmetros utilizados foram: dieletroforese: 750v, 600kHz; fusão: 2,5kV, 50 μ s.

O papel da membrana no processo de eletrofusão de protoplastos foi discutido por GLASER & DONATH (1987). Utilizando protoplastos de *Avena sativa* e modificadores de membrana como análogos de lisolecitina, cardiolipina, tetracaína e outros, os autores observaram que, quanto maior o dano a nível de membrana, menor a eficiência do processo de eletrofusão. MORIKAWA et alli (1988) trabalhando com protoplastos de *Coptis japonica* e *Euphorbia millii*, definiram diversos parâmetros físicos que

afetam a eletrofusão. Entre eles se destacam: potencial osmótico, densidade de protoplastos e o revestimento da câmara de fusão com substâncias hidrofílicas. Tal revestimento impede que protoplastos ou células fiquem aderidos aos eletrodos ou paredes da câmara de fusão. Esta aderência é causada pela eletricidade estática acumulada no material envolvido e pode causar perda de eficiência no processo porque, uma vez aderidas, as células dificilmente se soltam.

RECH et alli (1987) trabalhando com eletroporação de protoplastos de *Glicine canescens*, *Prunus avium*, *Prunus pseudocerasus*, *Pyrus communis*, *Solanum dulcamara* e *Solanum viarum*, observaram um aumento da taxa de divisão celular e de obtenção de calos embora haja uma perda na viabilidade dos protoplastos. Tal fato, também descrito por CUTLER & SALEEM (1987) e GUPLA et alli (1988), é explicado pelo aumento da permeabilidade da membrana celular aos macro e micro nutrientes dos meios de cultura envolvidos.

MORIKAWA et alli (1987) obtiveram produtos interespecíficos regenerados. Foram obtidos híbridos entre *Nicotiana glauca* ($2n = 24$) e *Nicotiana langsdorffii* ($2n = 18$). A análise citológica destes híbridos mostrou que o número de cromossomos dos produtos de fusão variavam de 60 a 66 ($2n$), o que indica ser um produto de fusão de três células. Embora os híbridos obtidos fossem férteis, a

autofecundação não produziu sementes férteis. SMITH et alli (1976) obtiveram os mesmos resultados que MORIKAWA et alli (1987) embora tenham usado polietileno glicol como agente fusogênico e com uma menor eficiência no processo de hibridização.

Também usando plantas do gênero *Nicotiana*, KAMATA & NAGATA (1987) desenvolveram um processo de enriquecimento de heterocários obtidos por eletrofusão. Trata-se da centrifugação da suspensão de células que foi submetida a eletrofusão em um gradiente de densidade. O gradiente foi formado por uma solução de água do mar e Percoll (concentração variando de 25 a 10%). A água do mar é utilizada neste caso como estabilizador osmótico, uma vez que estabilizadores como sacarose e sorbitol não permitem a migração dos protoplastos através do gradiente de densidade. Com o uso do gradiente, cerca de 70 a 80% dos heterocários foram isolados da interfase 20-15% do gradiente de densidade. A frequência de fusão variou entre 5 e 10% e desta quantidade 50% acusou fusão ao nível nuclear.

FISH et alli (1988) obtiveram híbridos somáticos entre duas espécies diferentes do gênero *Solanum*. SIHACHAKR et alli (1988) obtiveram também híbridos somáticos entre *Solanum melongena* (beringela) e *Solanum khasianum*. Neste trabalho foi observado 30% de fusão e 10% de regeneração de híbridos.

WALTON & BROWN (1988) obtiveram uma eficiência de 25% na eletrofusão de protoplastos de *Medicago sativa*, *Medicago scutellata* e *Medicago marina*. Houve regeneração.

CHAND et alli (1988) acrescentaram ao meio de eletrofusão PEG. Isto tornou o processo mais eficiente com a fusão chegando a 20%.

DIAMIANI et alli (1988) relataram um experimento fatorial com protoplastos de *Medicago sativa* L. e *Medicago arborea* L. Neste experimento foi testada como causa de variação a fonte do protoplasto (mesofilo ou calo), a intensidade de campo elétrico e a densidade de protoplasto. Estes três fatores mostraram ser altamente significativos no sucesso ou não da obtenção de híbridos. A interação entre origem do protoplasto e intensidade de campo elétrico também se mostrou significativa. Já a interação entre origem e intensidade e entre densidade e intensidade não se mostraram significativas.

MORIKAWA et alli (1988) trabalhando com a fusão intergenerica entre *Coptis japonica* e *Euphorbia millii* definiram que há três fatores importantes a serem considerados nos processos de eletrofusão. Primeiramente, o potencial osmótico da câmara de fusão. Quanto maior for o potencial osmótico da câmara, menor os índices de fusão. Isto porque o potencial osmótico é o responsável pela manutenção de uma flexibilização apropriada para a

membrana plasmática. Tal flexibilização é importante para que ocorra uma grande área de contato entre as células na fase de dieletroforese.

Um outro fator considerado foi a densidade do meio de fusão. No caso específico das espécies estudadas foi verificado que a densidade ideal para a formação de pares de células é de aproximadamente $1,13 \text{ g/cm}^3$ (densidade obtida através da adição de Percoll). Nesta densidade as células não flutuam e nem precipitam, facilitando a dielétroforese.

Nos processos de fusão envolvendo campos elétricos há uma tendência das células em ficar eletricamente aderidas aos eletrodos dificultando a sua remoção. Este fenômeno também pode ser observado nas fusões induzidas por PEG, embora por outra propriedade. Tal fenômeno pode ser evitado revestindo a câmara de eletrofusão de substâncias hidrofílicas tais como gel de poliacrilamida ou gelatina (MORIKAWA, 1988)

2.1.2. Eletrofusão em células animais

O primeiro registro de eletrofusão em animais foi o trabalho de RICHITER et alli (1981). Os autores usaram óvulos de *Paracentrotus lividus* (ouriço-do-mar). Por observação visual, detectou-se 60% de fusão celular. Para isso os óvulos foram antes tratados com

pronase para remover a camada externa de vitelo. Os ovulos após serem fundidos não perderam a capacidade de serem fertilizados embora tenham permanecidos vivos apenas por algumas clivagens.

VINKEN & ZIMMERMANN (1982) descreveram uma metodologia para obtenção de grandes quantidades de células heterocarióticas. Nesta metodologia foi ensaiada a produção de hibridomas de rato, que é o produto de fusão entre linfócitos e mielócitos capaz de produzir anticorpos monoclonais para um antígeno específico pré-determinado. Basicamente o sistema é composto por uma câmara de eletrofusão a qual se ligam duas seringas. Em cada seringa há um tipo de célula diferente (linfócitos ou mielócitos). Primeiramente os mielócitos são introduzidos na câmara e formam uma camada única de células. Logo após são introduzidos os linfócitos que se ligam aos mielócitos.

Tal trabalho supera a dificuldade que, ocorre quando se deseja fundir células de tamanhos e origem diferentes. Nestes casos, a probabilidade de se obter a combinação desejada de fusão é de aproximadamente 30 %, isto porque na etapa de alinhamento as células se arranjam de maneira aleatória, propiciando também fusão entre células do mesmo tipo. Com o procedimento adotado por VINKEN & ZIMMERMANN (1982) conseguiu-se entre 60 a 70% de fusões entre mielócitos e linfócitos.

TEISSIÉ et alli (1982) obtiveram

heterocários de fibroblastos de rato através de um campo elétrico de 1 kv/cm de duração de 50 μ s. Cerca de 20% das células submetidas ao campo elétrico tinham dois núcleos. Os autores identificaram 4 fatores fundamentais para o sucesso dos procedimentos de eletrofusão: (i) magnitude do pulso, (ii) duração, (iii) número de pulsos e (iv) presença de magnésio.

LO et alli (1984) obtiveram células de ratos híbridas que produziram anticorpos monoclonais em quantidades razoáveis.

FINAZ et alii (1984) fundiram fibroblastos de hamster e ratos a uma eficiência de 90%. A mesma fusão mas utilizando poli (etileno glicol), produziu 100 vezes menos células híbridas. Com o auxílio de marcadores enzimáticos e com análise dos cariótipos foi constatado que 70% dos produtos de eletrofusão eram realmente híbridos.

PODESTÁ et alli (1984) obtiveram híbridos entre células de Leydig (produtoras de testosterona) e células da glândula adrenal (produtoras de corticosterona). Este híbrido, produzido por 9 pulsos quadráticos de 3,75 kv/cm de intensidade com 15 μ s de duração cada um, apresentou produção tanto de testosterona quanto corticosterona.

Com uma intensidade de campo elétrico de 1,0 kv/cm e duração de 1 a 250 μ s, obteve-se 100% de fusão entre blastômeros de rato (KUBIAK & TARKOWSKI, 1985).

Citologicamente os produtos de fusão foram definidos como tetraplóides. Tais células não conseguiram desenvolver-se além da fase de blástula.

OHNISHI et alli (1987), fundindo células humanas e de ratos para a obtenção de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais, constataram que a presença de Ca^{2+} e Mg^{2+} no meio de eletrofusão e o tratamento das células com pronase melhoram a produção de hibridomas. A presença também de lipossomos ou proteínas hidrofóbicas melhoram as condições de obtenção de hibridomas. O processo se mostrou dez vezes mais eficiente que a fusão por PEG embora do total dos produtos de fusão, apenas 0,2 % demonstrassem a produção de anticorpos.

TEISSIÉ & CONTE (1988) e TEISSIÉ & ROLS (1988) apresentaram um processo de obtenção de policarióticas (até 12 n, células de ovário de Hamster) em culturas de baixa densidade celular. A eletrofusão é conduzida sobre um fluxo contínuo do meio onde as células se multiplicam. Com o auxílio de suportes a concentração celular aumenta e ocorre a fusão.

Um estudo comparando a eficiência de fusão entre PEG e eletrofusão de células humanas para a produção de anticorpos monoclonais mostrou que a eletrofusão chega a ser 33 vezes mais eficiente que a fusão por PEG (KARSTEN et alli, 1988). Além disso, foi constatado um crescimento mais vigoroso dos hibridomas eletrofundidos.

2.1.3. Eletrofusão em fungos

A primeira ocorrência de eletrofusão de protoplastos de fungos foi verificada por WEBER et alii (1981) utilizando protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae*. Os autores obtiveram uma frequência de fusão 200 vezes maior que a fusão utilizando polietileno glicol (de 10^{-5} a 10^{-4} , MARÁZ et alii, 1978).

HALFMANN et alii (1983) promoveram pela primeira vez a eletrofusão em fungos de maneira que foi possível detectar a ocorrência ou não de fusão nuclear.. Neste trabalho, foram utilizadas linhagens haplóides e auxotróficas de *Saccharomyces cerevisiae* do mesmo tipo de reação sexual (mating type). Foram obtidos dois tipos diferentes de células.

Primeiramente, foram obtidas células cujo fenótipo demonstrava a ocorrência de uma recombinação a nível de citoplasma, ou seja, plasmogamia (devido a recombinação de marcas relacionadas ao citoplasma). Tais células apresentavam um tamanho característico de células haploídes.

Em segundo lugar foram obtidas células cujo tamanho indicava uma constituição diplóide além de formarem esporos e apresentarem prototrofia a marcadores nucleares. Todos estes fatos levaram os autores a

concluir serem estas células fruto de uma fusão citoplasmática seguida por uma fusão nuclear. A frequência de cariogamia demonstrou ser dez vezes menor que a frequência de plasmogamia.

Métodos convencionais de fusão (SOLINGEN & PLAAT, 1977) resultam em uma frequência de cariogamia várias vezes menor que os procedimentos que envolvem o uso da eletrofusão.

BERG et alli (1984) promoveram a fusão celular entre vários organismos. Entre eles: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. lyopolitica*, *Bacillus thuringensis*, *B. cereus* e *Hordeum vulgare*. Neste trabalho não foram recuperados híbridos, mas foram visualizadas as fusões demonstrando assim, a grande flexibilidade que o método permite.

SCHNETTER & ZIMMERMANN et alli (1985) detectaram que a adição de soluções milimolares de Mg^{2+} e Ca^{2+} aumentam em dez vezes o número de híbridos entre *Saccharomyces cerevisiae*, muito provavelmente por esses íons terem uma participação direta no mecanismo de recuperação da membrana.

SONNENBERG & WESSELS (1987) observaram visualmente que 30% dos protoplastos do basidiomiceto *Schizophyllum commune* fundiam sob parâmetros de eletrofusão. Utilizando linhagens com deficiências nutricionais complementares foi observada uma regeneração de 7% de colônias heterocarióticas.

LYNCH et alli (1989) promoveram a eletrofusão entre protoplastos de *Aspergillus nidulans* e protoplastos de *Apium graveolens* L. Foi observado que, embora as espécies envolvidas sejam distantes filogeneticamente, ocorreu fusão com frequência de até 100% e os híbridos entre *Aspergillus nidulans* e *Apium graveolens* apresentaram uma alta taxa de consumo de O₂ mesmo após 3 horas do processo de eletrofusão. O autor discute a possibilidade do uso de eletrofusões desta natureza afim de que se obtenha produtos de interesse para estudos fisiológicos, além de ser um possível mecanismo de transferência de características genéticas de fungos para plantas.

KATENKAMP et alli (1989) obtiveram híbridos entre protoplastos de duas linhagens de *Trichoderma reesei* que se complementavam em termos auxotróficos. Os autores obtiveram recombinantes com relação às marcas auxotróficas e também com relação à repressão catabólica pela lactose. Este estudo demonstrou também que existe uma relação entre o número e a intensidade dos pulsos elétricos para a fusão. Foi concluído ser mais eficiente vários pulsos de baixa intensidade do que um único pulso de alta intensidade.

Em fungos, plantas, bactérias e também em animais é possível induzir um aumento da permeabilidade celular quando as células são submetidas a um campo elétrico de alta intensidade.

Os termos eletroporação, transfecção e eletropermeabilização são os encontrados para denominar o aumento da permeabilidade das células quando submetidas a um campo elétrico de alta intensidade e curta duração. O termo eletroporação está diretamente relacionado com a criação de um estado competente para a assimilação de moléculas de DNA exógeno pela célula, embora diversas substâncias tenham sido introduzidas nos mais variados tipos de células através da eletroporação.

NEUMANN et alli (1982) relataram pela primeira vez a transformação genética através da permeabilização de células de rato por campo elétrico.

Alguns dos principais relatos de eletroporação são: plantas (RIGGS & BATES, 1986); bactérias (FRIDLER & WIRTH, 1988), protozoários (GIBSON et alli, 1987) e em fungos, como a obtida em *Saccharomyces cerevisiae* e *Yarrowia lipolytica* em que se obteve 10^7 transformantes por μg de DNA (MEILHOC et alli, 1990)

2.1.4. Considerações teóricas

2.1.4.1. A membrana do ponto de vista eletrônico

Do ponto de vista eletrônico a membrana plasmática pode ser considerada como um capacitor. Capacitores são dispositivos que armazenam energia

elétrica. A Figura 1 ilustra a membrana plasmática como um capacitor.

Figura 1. Esquema da membrana plasmática do ponto de vista eletrônico. Onde a e b são espaço intra e extra celular; + e - representam os íons ao redor da membrana; $\vec{E}$ é o campo elétrico que se forma através da membrana quando esta é submetida a uma diferença de potencial.

Como qualquer outro material, a membrana se tornará polarizada na presença de um campo elétrico. A polarização ocorre porque há formação de dipólos ou orientação dos dipólos permanentes dentro das membranas e na solução eletrolítica que a circunda (ZIMMERMANN, 1982).

A geração de dipólos dentro das membranas faz com que haja primeiramente uma separação intracelular das cargas elétricas transformando a própria célula em um dipólo. Em segundo lugar, a célula se tornando um dipólo irá exercer uma força em seu redor, atraindo outros dipólos e formando com outras células uma configuração do tipo

colar-de-contas. Em outras palavras, o fenômeno da dieletroforese.

2.1.4.2. Dieletroforese (c.a.)

Ao submeter células a um campo elétrico não homogêneo, a força do campo elétrico no lado da célula mais próximo ao ponto de maior intensidade de campo elétrico, é maior que a força no lado oposto da célula. Como resultado desta relação de forças, a célula move em direção ao local de maior intensidade de campo elétrico. Ou seja, em uma câmara de eletrofusão, as células migram em direção aos eletrodos, formando uma cadeia de células uma ao lado da outra (configuração em colar-de-contas ou "pearl-chain"). (HOFMANN & EVANS, 1986).

A equação da força dieletroforética (F) (eq.1) é a equação que governa o movimento e o alinhamento das células em um campo elétrico não homogêneo (ou um campo elétrico alternado - C.A.) (BÜSCHL et alii, 1982)

$$F = r^3 \cdot E \cdot \text{grad } E \cdot \epsilon \cdot \frac{\epsilon - \epsilon_0}{\epsilon + 2\epsilon_0} \quad (1)$$

onde: r = raio da célula $\therefore r^3 \cong$ volume;

ϵ_0 = constante dielétrica da solução;

ϵ = constante dielétrica da célula;

E = intensidade de campo elétrico;

$\text{grad } E$ = medida da não homogeneidade do campo elétrico.

A eq. (1) permite realizar diversos comentários. Primeiramente, a constante dielétrica da célula (ϵ) diminui à medida em que a frequência do campo elétrico aumenta. Quando a constante dielétrica da célula é maior que a constante dielétrica da solução ($\epsilon > \epsilon_0$), as células tendem a migrar para as regiões de maior campo elétrico, ou seja, próximas dos eletrodos. Se a constante dielétrica da célula for menor que a constante dielétrica da solução ($\epsilon < \epsilon_0$), as células migrarão para regiões de menor intensidade de campo elétrico, ou seja, para a região equidistante dos eletrodos. Caso as duas constantes dielétricas forem iguais ($\epsilon = \epsilon_0$), não haverá força agindo sobre as células e conseqüentemente não haverá migração. Isto acontece se, por exemplo, houver um grande comprometimento da membrana permitindo a mistura do material intracelular com o material extracelular (solução). É o que ocorre em células mortas. A eq. 1 mostra também que, quanto maior as células, menor a intensidade de campo elétrico para a ocorrência de dielectroforese.

Uma outra relação interessante é a eq.2 (HOLFMANN & EVANS, 1986):

$$L \cong \sqrt{T \cdot V \cdot C \cdot r^4} \quad (2)$$

Onde: t = tempo de coleta (alinhamento) (s);

V = voltagem (v);

C = concentração (células/ml)

r = raio da célula (cm);

L = comprimento do "colar-de-contas" (cm);

Esta relação indica que, pelo menos ao nível teórico, quanto maior a intensidade do campo elétrico e o tempo a que as células são submetidas a este campo, maior será o comprimento da cadeia de células. A Figura 2 ilustra a sequência de eventos no fenômeno da dieletroforese.

Figura 2. Representação diagramática do fenômeno da dieletroforese.

São raros os relatos em que não se usa como solução de eletrofusão estabilizadores osmóticos orgânicos, como a sacarose e o sorbitol. Isto se deve ao fato de que quanto maior for a resistividade do meio, menor será o aquecimento do mesmo pelo efeito Joule. ZIMMERMANN et alli (1985) relataram várias alternativas para o uso de meios eletrolíticos tais como sistemas de refrigeração das câmaras de eletrofusão ou o uso de substâncias que provoquem a dielectroforese não pela atração dos dipólos, mas por fenômenos magnéticos através da incorporação de partículas de Fe_3O_4 pelas células (KRAMER et alli, 1984).

2.1.4.3. Colapso dielétrico da membrana (C.C.)

O colapso dielétrico da membrana é o passo fundamental no processo de eletrofusão. É nesta etapa em que as células, já justapostas pela dielectroforese ou por algum agente químico como o polietileno glicol, são submetidas a um campo elétrico de alta intensidade (kv) e curta duração (μs). É por este processo também que ocorre a eletroporação.

Para que o colapso dielétrico da membrana seja um fenômeno aplicável aos procedimentos de eletrofusão e eletroporação, é fundamental que a intensidade do campo elétrico aplicado e o tempo envolvido sejam de tal amplitude que cause um colapso dielétrico reversível

(ZIMMERMANN & VIENKEN, 1982). Caso a intensidade do campo elétrico exceda a intensidade crítica necessária para a voltagem de colapso por um fator de 2 a 6 vezes, ou se o tempo de exposição (comprimento do pulso) for muito longo, o fenômeno de colapso dielétrico da membrana atinge intensidade tal que a reorganização física da membrana se torne impossível, inviabilizando a célula.

O efeito do campo elétrico na membrana é a formação de poros, segundo ZIMMERMANN (1982) e ZIMMERMANN & VIENKEN, (1982). Esta explicação deve-se ao resultado de diversos trabalhos dos autores onde foi medida a resistência elétrica do meio intra e extra celular após a ocorrência do colapso dielétrico da membrana (BENZ & ZIMMERMANN, 1980). Os poros aumentariam, então, a permeabilidade celular a tal ponto, que permitiria o livre trânsito de íons para dentro e para fora da célula. Tais poros seriam os responsáveis pelo fenômeno de fusão propriamente dito, uma vez que ocorrendo em membranas de células adjacentes, causariam a invaginação de material citoplasmático e conseqüentemente a fusão celular.

O aumento da permeabilidade da membrana plasmática de uma célula de um determinado tamanho, é a resposta ao aumento da intensidade do campo elétrico. Pode ser explicada, ao menos teoricamente, pela eq. 3 , desenvolvida por HOLZAPFEL et alli (1982).

$$V_c = 1,5 \cdot a \cdot E_c \cdot \cos \gamma \quad (3)$$

Onde V_c é a voltagem em que ocorre o colapso dielétrico;

a é o raio da célula;

E_c é a intensidade crítica de campo elétrico; e

γ é ângulo entre um sítio da membrana e as linhas de campo elétrico.

A eq. 3 demonstra que qualquer lugar da membrana plasmática, cujo ângulo com as linhas de campo elétrico forem maior que 0 ($\gamma = 0^\circ$, $\cos\gamma = 1$), sofrerá menor ação do campo elétrico e, conseqüentemente, haverá uma menor formação de poros.

SUKHAREV (1989), trabalhando com fibroblastos de ratos, ensaiou a possibilidade do campo elétrico induzir a um estado fusogênico na célula que tornaria a célula pré-disposta a um processo de fusão. Tal experimento deu-se com o uso de força centrífuga para estabelecer o contato entre as células e posteriormente a aplicação de um pulso elétrico de 2 a 3 kV/cm, 20-50 μ s. E vice-versa, ou seja, a indução do colapso dielétrico da membrana com a posterior centrifugação das células para se estabelecer o contato.

Na literatura não há explicação plausível sobre o que realmente ocorre na membrana quando submetida a campo elétrico para que haja a formação de poros. Há apenas algumas evidências (BENZ & ZIMMERMANN, 1981; ZIMMERMANN et

alli, 1982) sobre a existencia de movimentação de cargas dentro da membrana quando submetida a um campo elétrico

2.1.4.4. Colapso dielétrico da membrana e o Efeito Costa Ribeiro

Uma das possíveis explicações sobre o que realmente ocorre na membrana plasmática quando a submetemos a um campo elétrico de alta intensidade pode ser o inverso do Efeito Costa Ribeiro (TAVARES, 1988).

O Efeito Costa Ribeiro (ECR) pode ser simplesmente definido como um rearranjo das cargas elétricas durante uma transição de fase de uma substância sem a aplicação de qualquer agente externo. Este rearranjo produz um campo elétrico quando há mudança de estado sólido para líquido em um sistema dielétrico (RIBEIRO, 1950). Um dielétrico é uma substância que não conduz eletricidade, ou seja, é um isolante (WATAGHIN, 1974).

Uma das hipóteses para o que ocorre a nível de membrana plasmática quando submetida a campo elétrico seria o inverso do ECR; o campo elétrico estaria induzindo uma mudança de estado físico da membrana. A membrana no caso se comporta como um dielétrico, assim como a cera de carnaúba utilizada por RIBEIRO (1945) para demonstrar o fenômeno.

Por meio de diversos e exaustivos

experimentos, RIBEIRO (1945) formulou as seguintes leis do efeito termodielétrico, agora denominado de Efeito Costa Ribeiro (ECR):

I) Lei das Intensidades

"Em um processo de solidificação que ocorra em uma taxa constante, a intensidade da corrente produzida (i) é proporcional ao tempo utilizado na mudança de fase eq.(4):

$$i = K_1 \, dm/dt \quad (4)$$

onde K_1 é a constante para um dado dielétrico."

II) Lei das Cargas

"Se um sistema dielétrico difásico passa de um estado de equilíbrio para um outro estado de equilíbrio, a carga elétrica total (Q) associada com a mudança de massa de uma das fases é proporcional a esta mudança de massa eq.(5):

$$Q = \int_1^2 i dt = k_2 (m_2 - m_1) \quad (5)$$

onde K_2 é a constante para um dado dielétrico.

III) A constante termodielétrica

"Em uma primeira aproximação, para o mesmo tipo de dielétrico, a constante K_1 e K_2 tem praticamente o mesmo valor $K = K_1 = K_2$."

A constante termodielétrica (k) é uma

constante física específica, característica para cada tipo de dielétrico. A Tabela 1 expressa determinados valores de K para algumas substâncias.

Tabela 1 - Constantes termo-dielétricas de diferentes dielétricos.

Dielétrico	k (10^{-9}C/g)
Naftaleno	2,8
Cêra de ouricuri	2,3
Cêra de carnaúba (preta)	-0,3
Cêra de carnaúba (branca)	-0,1

Fonte: RIBEIRO (1950)

RIBEIRO (1954) obteve experimentalmente o inverso do fenômeno agora denominado de Efeito Costa Ribeiro. A tal fenômeno o autor denominou de eletro-fusão, que aqui significa a fusão (mudança de estado físico) induzida por campo elétrico. O autor aplicou uma diferença de potencial elétrico entre os eletrodos (placas) de um capacitor aonde o dielétrico é parte sólido e parte líquido. Esta diferença de potencial aplicada causou uma acentuada modificação na taxa de mudança de fase em um sistema difásico como este.

Quando a diferença de potencial é aplicada enquanto está ocorrendo um processo de fusão, a taxa de

fusão do dielétrico é incrivelmente acelerada. A medição da corrente elétrica através do capacitor (sistema eletrodos mais dielétrico) e o cálculo da energia dissipada como consequência do efeito Joule, mostra que esta energia dissipada em forma de efeito Joule é várias centenas de vezes menor que o calor necessário para a fusão da massa de dielétrico observada.

RIBEIRO (1950) expoe algumas das possíveis explicações para a ocorrência do fenômeno:

- i. Diferença na velocidade das cargas positivas e negativas na passagem de uma fase para outra;
- ii. Diferença na adsorção das cargas positivas e negativas na interfase;
- iii. Orientação das moléculas dipólos;
- iv. Diferença nas densidades eletrônicas (densidade cúbica de elétrons dos átomos) entre as fases sólida e líquida.

De todas as possibilidades, o próprio RIBEIRO (1950) cita a (iv) como a mais convincente por permitir um tratamento teórico.

ZIMMERMANN (1982) embora não demonstrasse conhecimento do Efeito Costa Ribeiro, atribuiu os fenômenos que ocorrem na membrana plasmática quando submetidas a campo elétrico a fatores como a orientação de dipólos (iii) e também a saturação da orientação destes dipólos o que

levaria a um aumento da permissividade (ϵ) da membrana.

2.2. Produção de ácido cítrico

2.2.1. Histórico

O ácido cítrico (Figura 3), é um ácido tricarboxílico que apresenta uma enorme gama de aplicações nos mais diferentes ramos da indústria.

Na indústria de alimentos o ácido cítrico é utilizado como preservante, inibidor de oxidação (pois inibe enzima oxidativas) e ainda dá um agradável gosto azedo a refrigerantes. Na indústria farmacêutica é utilizado como produtor de efervescência em conjunto com bicarbonato. É utilizado entre outros, na indústria siderúrgica (tratamento de metais), na indústria química (como componente de sabões) e na indústria têxtil (como fixador de corantes), KAPOOR (1984).

Foi em 1784 que, pela primeira vez, o ácido cítrico (Figura 3) foi isolado de frutas cítricas. Em 1893 o ácido cítrico foi identificado como um produto do metabolismo de microrganismos, mais especificamente em fungos do gênero *Penicillium* (PRESCOTT & DUNN, 1940)

Em 1917 foi observado que o fungo filamentoso *Aspergillus niger* produzia ácido cítrico. Foi também neste mesmo ano, desenvolvido um meio de cultura que

possibilitasse a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*.

Figura 3 - Ácido Cítrico

Em 1922 a Itália produzia cerca de 90% das necessidades mundiais de ácido cítrico. Toda essa produção vinha precipitação de citrato de cálcio a partir de frutas cítricas.

Em 1923 surgem, nos Estados Unidos as primeiras iniciativas de produção de ácido cítrico a partir da fermentação de superfície por *Aspergillus niger*. Após três anos a produção de ácido cítrico na Itália deixa de ser viável e os Estados Unidos conquistam o mercado mundial (KAPOOR, 1984)

Dados de 1979 (BLAIR & TIENTY, 1979) demonstraram que a produção mundial de ácido cítrico chega a 250.000 toneladas anuais em um mercado crescente.

2.2.2 - Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*

Muitas das espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* produzem ácido cítrico: *A. niger*, *A. awamory*, *A. fonsecaeus*, *A. luchensis*, *A. wentii*, *A. saitoi*, *A. flavus* entre outros. Fora do gênero *Aspergillus* encontram-se produtores nos gêneros *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Ustilina*, *Botrytis*, *Ascohyta*, *Absidia*, *Talaromyces*, *Acremonium* e *Eupenicillium*, entre outros (KAPOOR, 1984)

Embora todas estas espécies produzam quantidades razoáveis de ácido cítrico, atualmente o *Aspergillus niger* continua o mais utilizado para este fim. Os processos modernos de produção empregam culturas submersas (o que reduz o tempo de fermentação), utilizam fontes de carbono pouco dispendiosas e meios com concentração controlada de diversos íons. Tais condições permitem obter 90% em peso de ácido cítrico da sacarose (KUBICEK & RÖHR, 1982).

Em se tratando de fungos filamentosos pode-se afirmar que o *Aspergillus niger* é a espécie considerada como a mais promissora em termos de produção. Dentre os fatores que afetam a produção de ácido cítrico por *A. niger*, os mais importantes são: acumulação de ácido cítrico, taxa de crescimento, sensibilidade aos metais, resposta ao pH ácido, morfologia celular, capacidade em crescer na presença de fontes de carbono alternativas e

susceptibilidade a contaminantes (BIGELIS, 1985).

CIMERMAN et alli (1982) observaram que os conídios de *A. niger* quando observados a nível de microscopia eletrônica apresentavam diferenças quando a linhagem era ou não produtora de ácido cítrico. SÁNCHEZ-MARROQUIÍN et alli (1970) relataram o efeito que certos íons como o Fe^{++} , Zn^{++} e Cu^{++} causam na produção de ácido cítrico. O trabalho demonstrou ser possível a obtenção de mutantes que continuasse produzindo ácido cítrico mesmo na presença de concentrações elevadas destes íons. SHU & JOHNSON (1947) notaram que a composição do meio de esporulação para a obtenção do inóculo tem um grande efeito na produtividade de linhagens de *A. niger*. Foi observado que a presença de Mn^{++} e extrato de malte no meio de esporulação reduzem a produção de ácido cítrico em fermentação submersa mas não alteram a produção em fermentação de superfície.

NOGUCHI & JOHNSON (1961) contornaram o problema da não acumulação de ácido cítrico em meios cuja fonte de carbono é rica em íons pelo tratamento destas em resinas que quelam íons. A resina utilizada foi a Dowex chelating resin A-1 (Dow Chemical Company).

AL OBAIDI & BERRY (1980) demonstraram que o papel da adenosina 3'-5' monofosfato (AMPc) está associado com o estado fisiológico relacionado com a produção de ácido cítrico pelo fungo. Muito provavelmente porque o AMPc

estimula a taxa de utilização da fonte de carbono, fundamental para a biossíntese de ácido cítrico.

SZCZODRAK & ILCZUK (1985) avaliaram o papel de íons ferro em meio de cultura de produção de ácido cítrico. Estes íons seriam cofatores das enzimas que degradam o ácido cítrico, em uma via metabólica normal como o Ciclo de Krebs. Foi observado um comportamento distinto das duas linhagens de *Aspergillus niger* ensaiadas. A linhagem 23 demonstrou uma redução de 94% da capacidade de acumular ácido cítrico quando havia no meio de fermentação concentrações maiores que $3,60 \cdot 10^{-3}$ M de íons Fe^{++} .

A linhagem Lez demonstrou uma queda relativamente pequena da acumulação de ácido cítrico (20%). Tais resultados demonstram que a linhagem Lez apresenta outras vias metabólicas capazes de manter a acumulação de ácido cítrico, vias estas denominadas de anapleróticas. A linhagem 23 acumula ácido cítrico apenas em condições de baixas concentrações de Fe^{++} , porque provavelmente perdeu a possibilidade de usar outra via metabólica para substituir o mecanismo de acumulação.

O desenvolvimento dos modos de fermentação para produção de ácido cítrico pode ser dividido em três fases.

A primeira fase foi caracterizada pelas condições de cultura em superfície. Esporos eram inoculados em tanques rasos e o processo tinha a duração de 7 a 12

dias. Após esse período os tanques eram drenados e, em muitos casos, o micélio reaproveitado por mais uma vez (PRESCOOT & DUNN, 1959). A segunda fase foi marcada por ser uma fermentação do tipo submersa, ou seja, sob agitação e aeração vigorosa. Também se caracteriza por ser um processo dividido em duas etapas: a primeira para o desenvolvimento do micélio e a segunda para a produção propriamente dita. O tempo de produção, envolvendo as duas fases, variava de 6 a 8 dias (KAPOOR, 1984).

A terceira fase, embora descrita por CAHAN (1935), para a produção de ácido cítrico é a fermentação em estado sólido. A fermentação em estado sólido é qualquer tipo de processo fermentativo cujo substrato não seja líquido. Tal tipo de fermentação é conhecida há séculos para a produção de queijos e molhos (HESSELTINE, 1972). Para a produção de ácido cítrico nestas condições, vários substratos podem ser utilizados como bagaço de cana-de-açúcar, polpa de maçã e outras frutas (CHANG & WOODAMS, 1987).

A influência qualitativa e quantitativa de diferentes fontes de carbono para a produção de ácido cítrico foi explorada por XU et alli (1989). Os resultados mostram que a alta concentração da fonte de carbono envolvida é fundamental para induzir uma alteração metabólica apropriada para a acumulação de ácido cítrico.

Atualmente as inovações nos processos de

produção de ácido cítrico são de difícil acesso. Geralmente as condições de cultura não são de domínio público, sendo protegidas por patentes com, na maioria das vezes, ausência completa de detalhes.

2.2.3. Melhoramento da produção de ácido cítrico e o ciclo parassexual em *Aspergillus niger*.

A importância do ciclo parassexual nos fungos foi abordada por PONTECORVO (1956). Neste ensaio PONTECORVO coloca o processo parassexual como um poderoso instrumento de variabilidade em fungos fitopatogênicos e em fungos de caráter industrial.

ROPER (1952) deu o primeiro passo para a descoberta de um processo de recombinação alternativo em fungos. Descreveu uma metodologia para a obtenção de heterocários diplóides do Ascomiceto *Aspergillus nidulans*. PONTECORVO & ROPER (1952) comunicam pela primeira vez a ocorrência de recombinação não meiótica, em *Aspergillus nidulans* e que mais tarde se convencionou denominar de ciclo parassexual.

Em *Aspergillus niger* o ciclo parassexual foi descrito por PONTECORVO et alli (1953). Neste trabalho foi demonstrada a possibilidade de sintetizar diplóides heterozigotos e de obter recombinantes a partir do processo mitótico.

PONTECORVO (1965) E AZEVEDO (1987) afirmam que o passo inicial do processo parassexual é a ocorrência da heterocariose. Esta heterocariose seria consequência de um processo precedente de anastomose de hifas de linhagens geneticamente distintas. O segundo passo é a fusão de núcleos resultando em diplóides heterozigotos.

O processo parassexual finaliza com a produção de recombinantes. Tais recombinantes são resultantes de processos de permuta gênica (ROPER & PRITCHARD, 1955; PONTECORVO E KÄFER, 1958), com uma ocorrência relativamente rara (uma permuta para cada 500 mitoses). KÄFER (1960) cita a ocorrência de segregantes haplóides, aneuplóides e diplóides pela perda de cromossomos levando a um estado de aneuplóides instáveis.

LHOAS (1961) utilizou um análogo de amino-ácido, o *para*-fluorofenilalanina (*p*Fa) para induzir haploidização em diplóides sintéticos de *Aspergillus niger*. O *p*Fa mostrou não alterar a viabilidade de conídios e induz a produção de setores haplóides com uma maior taxa de crescimento (mais vigorosos), tornado fácil a diferenciação de setores diplóides.

LHOAS (1967) estabeleceu seis grupos de ligação em *Aspergillus niger* analisando segregantes mitóticos haplóides (obtidos por indução por *p*Fa) de diplóides sintéticos obtidos pelo ciclo parassexual. Neste

trabalho, foi demonstradoas que taxas de recombinação mitótica e de haploidização são muito mais altas que em *Aspergillus nidulans*.

HASTIE (1970) observou que o fungicida Benlate[®] (methyl-I-(butyl carmoyl)-2-benzimidazole carbamate) induzia instabilidade em fungos. Tal instabilidade era devida a segregação espontânea após recombinação mitótica e não-disjunção mitótica. Os setores segregantes apresentaram-se mais vigorosos que o diplóide.

O uso do fungicida Benlate[®] como agente haploidizante e diferenciador entre linhagens diplóides e haplóides de *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus terreus* foi descrito por UPSHALL et alli (1977), tornando-se um dos mais utilizados agentes haploidizantes em fungos.

BONATELLI Jr et alli (1983) (BONATELLI Jr, 1981) observaram uma frequência maior ainda do que a obtida por LHOAS (1967) de recombinação mitótica. A este fenômeno, caracterizado por um estado diplóide efêmero seguido da formação de um grande número de recombinantes deu-se o nome de parassexualidade (BONATELLI Jr et alli, 1983).

A obtenção de heterocários com o objetivo melhorar a produção de ácido cítrico foi descrita por CIEGLER & RAPER (1957) embora os autores tenham obtido um aumento da produção de ácido cítrico de no máximo, 20% a mais da linhagem selvagem.

BONATELLI Jr (1981) obteve diplóides de *Aspergillus niger* cuja produção não era muito diferente da linhagem industrial. Mas observou que estas linhagens, embora similares em termos de produção, apresentavam maior estabilidade do que a linhagem industrial original em relação a produção de ácido cítrico

CHANG & TERRY (1973), trabalhando com a produção de ácido cítrico e amiloglucosidase, concluíram que os genes nucleares são os responsáveis em primeira instância pela produção de ácido cítrico e que a dosagem gênica envolvida não é a responsável pelo aumento da produção observada nos diversos trabalhos onde é analisada a produtividade de diplóides (GIEGLER & RAPER, 1957). A complementação intergênica é o proposto por CHANG & TERRY (1973) para o aumento da produção de linhagens diplóides de *A. niger*. Tais complementações gênicas corrigiriam os efeitos das mutações pleiotrópicas (causa não só das mutações auxotróficas como também das relacionadas com a síntese de ácido cítrico). BONATELLI Jr et ali (1983) encontraram uma maior estabilidade da produção de ácido cítrico no diplóide.

DAS & ROY (1978) obtiveram diversos mutantes auxotróficos através do tratamento com luz ultra-violeta. Tais mutantes produziam menos ácido cítrico que a linhagem original, embora o produto de fusão (diplóide) obtido através do ciclo parassexual tenha

produzido 1,2 vezes mais que a linhagem haploíde selvagem.

KIRIMURA et alli (1988) obtiveram diplóides por fusão de protoplastos cuja produção de ácido cítrico foi inferior a da linhagem industrial quando usou-se fermentação submersa. Em fermentação de estado sólido, a produtividade de alguns diplóides chegou a ser 20% maior que a linhagem original.

Os processos baseados em mutação e seleção têm apresentado mais sucesso que os processos onde o ciclo parassexual está envolvido. BONATELLI Jr et alli (1982) isolaram mutantes auxotróficos, morfológicos e resistentes ao fungicida Benlate. Foram obtidos mutantes auxotróficos e morfológicos que apresentaram uma produção de ácido cítrico maior que a linhagem selvagem. Neste trabalho, mais uma vez, é citada a ocorrência de efeito pleiotrópico uma vez que a reversão da marca auxotrófica dos mutantes implicava também na redução da produção de ácido cítrico.

MASIEIRO (1988) utilizou o ciclo parassexual em *Aspergillus niger* mas não obteve aumento da atividade amiloglicolítica em diplóides e recombinates. CALIL (1988) obteve aumento de 30% na atividade amiloglicolítica com a indução e seleção de mutantes. Cruzamentos utilizando o ciclo parassexual permitiram que os genes envolvidos no aumento da atividade amiloglicolítica, *hap* (high amylglucosidase production), fossem atribuídos a algum grupo de ligação.

BOS et alli (1989) apresentaram o resultado parcial de um meticuloso processo de construção de uma linhagem mestra de *Aspergillus niger*. Este processo envolve basicamente procedimentos pouco utilizados até o momento, mas fundamentais quando uma linhagem de caráter industrial está envolvida. A primeira característica deste processo de construção da linhagem mestra, foi a obtenção dos mutantes morfológicos e auxotróficos através da indução por doses baixas de mutagênicos, no caso luz ultra-violeta (BOS, 1987). Uma outra característica foi o desenvolvimento de uma nova técnica de enriquecimento que utiliza Novozym 234, que é altamente ativa a conídios germinando (DEBETS et alli, 1989).

Com a definição de pelo menos oito grupos de ligação (BOS et alli, 1989) e com um grande número de linhagens recombinantes, as perspectivas de melhoramento e manipulação gênica são excelentes.

O uso de sistemas de transformação gênica disponíveis desde 1985 para *Aspergillus niger* (KELLY & HYNES, 1985) e o desenvolvimento de metodologias eficientes para seleção e análise de linhagens produtoras melhora ainda mais as perspectivas para o melhoramento genético de linhagens industriais de *Aspergillus niger*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismos utilizados

3.1.1. *Aspergillus niger* 10V10.

Microorganismo industrial produtor de ácido cítrico originario da industria Fermenta S.A. (BONATELLI, 1981). Apresenta como características morfológicas: crescimento compacto e conidióforos normais.

3.1.2. *Aspergillus niger* 391H6.

Microorganismo industrial produtor de ácido cítrico originario da industria Fermenta S.A.. Apresenta como características morfológicas: crescimento difuso e conidióforos curtos.

3.2. Meios de Cultura e soluções utilizadas

3.2.1 Meio Mínimo (PONTECORVO et alli, 1953)

NaNO_3	6,00g
KH_2PO_4	1,50g
KCl	0,50g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,50g
FeSO_4	0,01g
ZnSO_4	0,01g
Glicose	10,00g
Agar Difco	15,00g
Água destilada	1000,00ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 10% (p/v).

3.2.2. Meio Completo (PONTECORVO et alli, 1953; modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973).

Foram adicionados ao Meio Mínimo (ítem

3.2.1):

Peptona	2,00g
Caseína hidrolizada	1,50g
Extrato de levedura	0,50g
Solução de vitaminas	1,00ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 10% (p/v).

3.2.3. Meio Mínimo Líquido (PONTECORVO et alli, 1953)

Foi preparado segundo o item 3.2.1, não sendo adicionado o ágar.

3.2.4. Meio Completo Líquido (PONTECORVO et alli, 1953; modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973)

Foi preparado segundo o item 3.2.2, não sendo adicionado o ágar.

3.2.5. Meio Farelo de Trigo (YOSHIOKA, 1982)

Farelo de trigo 5,00g
 Água destilada 5,00ml

3.2.6. Meio Fermentação (PRESCOTT & DUNN, 1959)

Sacarose 140,00g
 NH_4NO_2 2,23g
 KH_2PO_4 1,00g
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,23g

O volume foi completado para 1,00 l com água bi-destilada e deionizada. O pH foi ajustado para 2,00 com

solução de HCl 6,00 N. O meio foi distribuído em erlenmeyers de 125 ml, com 25,00 ml de meio em cada erlenmeyer. A esterilização foi com pressão de 0,50 atm a temperatura de 111°C por 30 minutos.

3.2.7. Meio de Esporulação (SHU & JOHNSON, 1947)

Sacarose	140,00g
NH_4NO_3	2,50g
KH_2PO_4	1,00g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25g
Ágar Dífco	15,00g

O volume foi completado para 1,00 l com água bi-destilada e deionizada. O pH foi ajustado para 4,50 com solução de HCl 6,00 N. Esterilizou-se com pressão de 0,50 atm a temperatura de 111°C por 30 minutos.

3.2.8. Solução de vitaminas

Biotina	0,20mg
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	10,00mg
Tiamina	50,00mg
Piridoxina	50,00mg
Ácido nicotínico	100,00mg
Riboflavina	100,00mg
Água destilada esterelizada	100,00ml

A solução foi esterilizada em banho-maria por 15 minutos e guardada no refrigerador a 4°C, em frasco escuro, sob clorofórmio.

3.2.9. Solução de caseína hidrolizada

A solução foi preparada dissolvendo-se 100,00mg de caseína em 10,00ml de água destilada esterilizada. A solução foi então aquecida em banho-maria por 15 minutos e conservada em refrigerador a 4°C.

3.2.10. Suplementos adicionados ao meio mínimo (aminoácidos e vitaminas)

Foram realizadas soluções estoques contendo 10 mg/ml do aminoácido. Para cada 20,00 ml de meio foram adicionados 0,10 ml de solução estoque.

Com relação as vitaminas, as soluções estoques foram feitas adicionando a 10,00 ml de água esterilizada.

Tiamina	1,00 mg
Riboflavina	1,00 mg
Ácido nicotínico	1,00 mg
Piridoxina	0,50 mg
Ácido para-aminobenzoico	0,50 mg
Biotina	0,40 mg

Foi adicionado 0,10 ml de solução estoque para cada 20,00 ml de meio.

As soluções foram armazenadas a 4°C sob clorofórmio.

3.2.11. Solução salina (0,85% p/v)

NaCl	0,85g
Água destilada	100,00ml

A solução foi distribuída em frascos (9,00ml por frasco), sendo, em seguida, autoclavada.

3.2.12. Solução de Tween 80 (0,1 v/v)

Tween 80	10,10
Água destilada	100,00ml

A solução foi distribuída em tubos de ensaio (2,50ml por tubo), autoclavada e mantida no refrigerador a

4°C.

3.2.13. Meio mínimo com 2% (v/v) de meio completo

Ao meio mínimo (ítem 3.2.3) foi adicionado meio completo numa proporção de 2% (v/v). As soluções resultantes foram distribuídas (2,50ml por tubo) e esterilizadas.

3.2.14. Meio mínimo com 4% de meio completo

Ao meio mínimo (ítem 3.2.3) foi adicionado meio completo numa proporção de 4% (v/v). As soluções resultantes foram distribuídas (2,50 ml por tubo) e esterilizadas.

3.2.15. Solução estoque de Benlate[®]

Benlate[®]0,20 mg

Água destilada.....9,00ml

O Benlate foi primeiramente dissolvido em 1,00 ml de acetona. Posteriormente foi misturado a água destilada previamente esterilizada e a solução armazenada a 4°C.

3.2.16. Solução de polietileno glicol (PEG)

Solução A:

CaCl_2 11,00g
 Água destilada1000,00ml

Solução B:

Glicina37,50g
 Água destilada1000,00ml

Foram adicionados 10,00ml da solução A em 10,00ml da solução B. O volume foi completado para 100,00ml com água destilada e o pH foi corrigido para 8,0 com NaOH 4% (p/v). Adicionou-se PEG 6000 para uma concentração final de 30% (30,00g). Esterilizado em autoclave.

3.2.17. Soluções tampões (GOMORI, 1955)

3.2.17.1. Tampão fosfato 0,125 M pH 7,0

Solução A:

KH_2PO_4 17,37g
 Água destilada1000,00 ml

Solução B:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 33,53g
 Água destilada1000,00 ml

39,00 ml de A é adicionado a 61,00 ml de B,

diluindo a um total de 200,00ml

3.2.17.2. Tampão fosfato 0,02 M pH 5,8

Solução A:

KH_2PO_4 2,78g
 Água destilada 1000,00 ml

Solução B:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5,36g
 Água destilada 1000,00 ml

92,00 ml de A é adicionado a 8,00 ml de B

diluindo a um total de 200,00 ml

3.2.17.3. Tampão citrato 0,05M pH 4,8

Solução A:

Ácido cítrico 10,50g
 Água destilada 1000,00 ml

Solução B:

$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 14,70g
 Água destilada 1000,00 ml

23,00 ml da solução A são adicionados a 27,00 ml da solução B, diluindo a um total de 100,00 ml.

3.2.17.4. Tampão malato 0,02 M pH 5,8

Solução A:

Ácido Maleico anidro1,96 g

Água destilada1000,00 ml

Solução B:

NaOH 0,80 g

Água destilada1000,00 ml

50,00 ml da solução A são adicionados a
20,80 ml da solução B, diluindo a um total de 200,00 ml.

3.2.18. Estabilizadores osmóticos**3.2.18.1. MgCl_2 0,4 M (DAS & GHOSH, 1989)**

MgCl_2 56,94g

Dissolveu-se a quantidade acima em tampão
malato 0,50 M, pH 5,80 (item 3.2.20) totalizando 1,00 l.

3.2.18.2 KCl 0,60 M

KCl44,73g

Dissolveu-se a quantidade acima em tampão
fosfato 0,20 M, pH 5,80 (item 3.2.20) totalizando 1,00 l.

3.2.18.3. Sorbitol 1,20 M

Sorbitol218,60g

Dissolveu-se a quantidade acima em tampão fosfato 0,20 M, pH 5,80 (item 3.2.20) totalizando 1,00 l.

3.2.18.4. Sorbitol 1,20 M para eletrofusão

Sorbitol21,86g

Histidina0,7758g

CaCl₂0,11g

Dissolveu-se a quantidade acima em água bi-destilada e deionizada, totalizando 100,00 ml.

3.2.18.5. Sacarose 0,60 M

Sacarose205,38g

Dissolveu-se a quantidade acima em tampão malato 0,50 M, pH 5,80 (item 3.2.20), totalizando 1,00 l.

3.2.19. Reagente ácido dinitrosalicílico (DNS)

Ácido 3,5-dinitrosalicílico 10,60g
 NaOH 19,40g
 Água destilada 1416,00ml

Dissolveur-se os reagentes acima e
 adicionou-se:

Tartarato de sódio e potássio .. 306,00g
 Fenol (aquecido a 50°C) 7,60ml
 Metassulfito de sódio 8,30g
 Conservar em refrigerador a 4°C.

3.3. Sistema de filtro para técnica de enriquecimento

No interior de funis de vidro foram fixadas 6 camadas de gaze com o auxílio de fita crepe. Este conjunto foi então envolvido em papel de alumínio e esterilizado.

3.4. Uso de palitos para transferencia de colônias

Foram utilizados palitos roliços para transferir conídios no caso de inoculação em placas de Petri.

3.5. Esterilização e incubação

Os meios de cultura e as soluções utilizadas foram esterilizadas em autoclave por 15 minutos a 121°C,

salvo instrução contrária nos itens 3.2.6 e 3.2.7..

A temperatura de incubação foi de 28°C.

3.6. Verificação da estabilidade genética

Inoculou-se em uma placa de Petri uma colônia isolada de *Aspergillus niger* contendo meio completo (item 3.2.2). As placas foram então incubadas por 96 horas visando a verificação da possibilidade de formação de setores.

3.7. Sobrevivência a luz ultravioleta

Uma suspensão de conídios de *Aspergillus niger* cultivado durante 7 dias em meio completo (item 3.2.2), foi diluída para a concentração de $1,0 \cdot 10^6$ conídios por ml. O volume de 19,00 ml desta suspensão de conídios foi colocado em uma placa de Petri previamente esterilizada, a distância de 14,00cm da fonte de luz ultravioleta da marca Mineralight® - Ultra-violet Prod. Inc. (San Gabriel, CA. USA). Antes do início da irradiação uma alíquota de 1,00ml foi retirada para que se pudesse estimar a viabilidade dos conídios e servir como controle. A placa foi exposta durante 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 minutos a fonte de luz ultravioleta. Uma alíquota de 1,00ml foi retirada da placa após cada período de irradiação. Essas

aliquotas, assim como a alíquota de contrôle, foram convenientemente diluídas em solução salina 0,85% (item 3.2.12) e 0,10ml de cada diluição foi semeada em placas contendo meio completo. As placas foram então incubadas durante 48 horas em estufa. A contagem de colônias isoladas foi feita após esse período.

3.8. Obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos

Uma suspensão de conídios de *Aspergillus niger* foi diluída em solução salina 0,85% e irradiada com luz ultravioleta segundo o item 3.8. O tempo de irradiação foi o necessário para a obtenção entre 5 a 1% de sobrevivência. Após a irradiação uma alíquota de 0,10ml da suspensão foi retirada, semeada em meio completo e incubada por 72 horas. As colônias, após esporularem, foram transferidas com o auxílio de palitos esterilizados (item 3.4) para placas de Petri contendo meio mínimo, em uma configuração 25+1 pontos. Após 48 horas de incubação, blocos de ágar onde não houve crescimento do fungo foram transferidos para placas de Petri contendo meio completo. Após 72 horas de incubação os conídios provenientes das colônias que cresceram em placas com meio completo foram novamente transferidos para meio mínimo. Não havendo crescimento em meio mínimo, tais colônias foram consideradas mutantes auxotróficos. Os mutantes

morfológicos foram selecionados através de observação visual.

Tendo em vista o ensaio das deficiências nutricionais dos mutantes obtidos, placas com meio mínimo mais 0,10ml de cada uma das soluções de caseína hidrolizada, de vitaminas e de extrato de levedura foram inoculadas com os mutantes obtidos e incubadas por 48 horas. Assim o crescimento dos mutantes em uma das placas e não em meio mínimo, indica a deficiência de cada um, sendo então transferidos para placas de Petri com meio mínimo mais cada uma das vitaminas e aminoácidos separadamente. A obtenção de duplos mutantes seguiu a mesma metodologia com a exceção de que o requisito nutricional referente a mutação simples seja adicionado à placa de Petri contendo meio mínimo.

3.9. Enriquecimento de mutantes por filtração

Após o tratamento apropriado com luz ultravioleta (item 3.8), 2,00ml de solução salina 0,85% com uma suspensão determinada de conídios foram incubados em um erlenmeyer de 250ml com 50,00ml de meio mínimo líquido e incubado por 18 horas em agitador orbital a 28°C e 150 rpm e filtrados (item 3.3). Após 12 horas, os 50,00 ml foram filtrados (item 3.3) e novamente incubados em agitador rotatório a 28°C e 150 rpm. Este último volume

foi filtrado (item 3.3) e centrifugado a 2500g por 15 minutos. O precipitado foi ressuspendido em solução salina (0,85%). Em seguida, procedeu-se como no item 3.9.

3.11. Isolamento e regeneração de protoplastos.

Uma suspensão de conídios de *Aspergillus niger* foi diluída em solução salina 0,85% (3.2.) para a concentração de 10^7 conídios por ml.

Um ml desta suspensão de conídios foi inoculada em erlenmeyers de 250 ml com 50,00 ml de meio completo líquido (item 3.2.4), e incubada sob agitação (150 rpm) durante 28 h a 28°C.

O micélio assim obtido foi filtrado a vácuo e lavado com solução estabilizadora osmótica apropriada para as diferentes metodologias usadas Tabela 2.

Tabela 2 - Diferentes estabilizadores osmóticos para o isolamento e regeneração de protoplastos.

	DAS & GHOSH (1989)	GOLDMAN (1988)
Lavagem do micélio	MgCl ₂ 0,40 M	KCl 0,60 M
Sistema lítico	MgCl ₂ 0,40 M	KCl 0,60 M
Regeneração	Sacarose 0,60 M	Sorbitol 1,20 M

Após a lavagem, o micélio foi pesado e

montado o seguinte sistema lítico:

Solução osmótica.....	4,00 ml
NovoZym 234 (Novo Industries) Lote PPM 1199....	12,50 mg
Celulase CP (John & Sturge).....	12,50 mg
Micélio (úmido).....	200,00 mg

O sistema acima foi incubado durante 3 horas a 28°C sob agitação de 150 rpm. Em seguida a suspensão obtida foi filtrada em intertela. Centrifugou-se a suspensão por 10 min a 25000 g por duas vezes com o estabilizador em uso. Na última lavagem o precipitado foi ressuspendido em 4,00 ml do estabilizador e feita a contagem de protoplastos em solução em câmara de Neubauer. Os protoplastos foram semeados em meio completo mais o estabilizador osmótico apropriado e incubados a 28°C por 72 horas. Após esse tempo a viabilidade dos protoplastos foi estimada, sendo expressa através da taxa de regeneração dos mesmos.

3.11. Determinação da susceptibilidade ao PEG

Protoplastos obtidos segundo o item 3.11 foram centrifugados a 2500g e resussuspendidos em 1,00 ml de solução de polietileno glicol (item 3.2.16). A suspensão foi então incubada por 10, 20 e 30 minutos após

o que foi novamente centrifugada, ressuspensa em solução osmótica e plaqueada em MC mais sorbitol 1,20 M (item 3.2.18.3).

3.12. Técnicas genéticas

3.12.1. Obtenção de diplóides

3.12.1.1. Ciclo parassexual (PONTECORVO et alii, 1953)

3.12.1.1.1. Obtenção de heterocários

Os conídios de linhagens auxotróficas , a uma concentração de 10^6 conídios por ml, foram misturados em tubos de ensaio contendo meio mínimo líquido mais meio completo líquido na proporção de 2% e 4% (itens 3.2.13 e 3.2.14). Após 5 a 10 dias de incubação a película que desenvolvida na superfície do líquido foi transferida para placa de Petri contendo meio mínimo sólido, sendo então incubadas por 7 a 8 dias.

3.12.1.1.2. Isolamento de colônias prototróficas

Conídios foram coletados de setores heterocarióticos (item 3.12.1.1) em solução Tween 80 e semeados em placas de Petri contendo meio mínimo sólido. Foram utilizados de 10^6 a 10^7 conídios por placa, sendo

que o número de conídios foi estimado em câmara de Neubauer. As placas foram então incubadas por 5 a 7 dias. As colônias de crescimento vigoroso e de morfologia uniforme foram selecionadas e seus conídios transferidos para placas de Petri contendo meio mínimo sólido por semeadura. Após 4 a 6 dias observou-se o crescimento de colônias isoladas.

3.12.1.2. Fusão química de protoplastos.

Protoplastos com marcas auxotróficas complementares foram misturados em quantidades aproximadamente iguais ($\cong 10^6$ protoplastos por ml). Esta solução foi então centrifugada a 2500g e ressuspendida em 1,00 ml de solução de poli-etilenoglicol (item 3.2.16) e mantido a 28° C por 10 minutos. Após esse período, a solução foi precipitada por centrifugação (2500g por 10 min) e ressuspendida em 4,00 ml de solução osmótica (item 3.2.18.). Feita as diluições apropriadas, os protoplastos foram semeados em meio mínimo mais 1,20 M de sorbitol para a regeneração dos possíveis diplóides.

3.12.1.3. Eletrofusão de protoplastos

3.12.1.3.1. Descrição dos equipamentos utilizados

O equipamento utilizado para a obtenção dos parâmetros de eletrofusão foi o Manipulador Elétrico de Células, modelo 401A, produzido pela BTX, Biotechnologies & Experimental Research, Inc., San Diego, CA 92102, Estados Unidos. A câmara para a eletrofusão foi o modelo Flat Electrode 480 de 0,25 ml de capacidade produzido pela mesma empresa.

O manipulador elétrico de célula utilizado pode ser descrito como um equipamento capaz de coordenar o tempo, a amplitude e a frequência de um impulso elétrico. Este impulso resulta em um campo elétrico na câmara de fusão. A frequência destes impulsos elétricos é dada por um gerador de ondas Wavetek, modelo 148A, com a capacidade de geração de frequências de até 20 MHz. Este gerador de ondas, embutido dentro do Manipulador Elétrico de Células tem por função, modular a frequência, a fase e a amplitude dos sinais emitidos pelo equipamento. Um esquema detalhado de operação do equipamento é dado pela Figura 4.

A determinação da resistência da solução osmótica empregada é fundamental para; primeiro determinar a intensidade real do campo elétrico, em segundo, para não operar o equipamento em condições de risco. A determinação da resistência (expressa em ohms), pelo menos ao nível de ordem de grandeza, foi realizada com o auxílio de um multímetro.

3.12.1.3.1. Determinação dos parâmetros de alinhamento.

Os parâmetros necessários foram: amplitude do campo elétrico, tempo e frequência. Tais parâmetros foram definidos através da observação via microscopia optica do comportamento dos protoplastos em diferentes situações de campo elétrico. Para a observação a nível de microscópio optico, foram utilizadas lâminas com eletrodos montados na sua superfície. Estes eletrodos estavam a uma distancia de 0,50 cm e simulavam as condições da câmara de fusão.

3.12.1.3.2. Determinação dos parâmetros de colápsio dielétrico.

Como revisto no capítulo anterior, o colápsio dielétrico da membrana é uma ocorrência fundamental para o processo de eletrofusão. A alteração da viabilidade dos protoplastos de *Aspergillus niger* submetidos a intensidades distintas de campo elétrico, indica a intensidade compatível com os objetos de fusão. A tabela 3 indica as intensidades a que foram submetidos os protoplastos para se avaliar as consequencias relativas a viabilidade. As suspensões de protoplastos foram colocadas e retiradas da câmara de fusão com o auxílio de uma seringa de 1,00 ml previamente esterilizada. Em seguida os

protoplastos foram semeados em meio completo mais o estabilizador osmótico apropriado.

Tabela 3 - Amplitude em kV de campo elétrico utilizando câmara modelo Flat Electrode P/N 480. A resistência elétrica da solução foi estimada em 30 kohms.

Amplitude nominal (V)	Amplitude real (kV)
0,00	0,00
100,00	1,92
200,00	3,85
300,00	5,77
400,00	7,69
500,00	9,61
600,00	11,54

A intensidade de um campo elétrico é dada pela eq. (6).

$$E = d \cdot V \quad (6)$$

Onde d é a distância em metros entre os eletrodos, V é a voltagem aplicada (volts) e E é a intensidade (volts) de campo elétrico. A eq. (6) pode ser

aplicada em sistemas ideais. Em sistemas como o utilizado a resistência interna da câmara de fusão (Flat electrode 480) e da solução utilizada não são desprezíveis, 100 ohms e 30.000 ohms respectivamente.

3.12.2. Caracterização de diplóides (CALIL, 1988)

Os diplóides foram caracterizados segundo os seguintes parâmetros:

i) Prototrofia - uma vez que os cruzamentos foram feitos com linhagens auxotróficas complementares, o produto de fusão deveria ser necessariamente prototrófico;

ii) Coloração de conídios - quando as linhagens haplóides envolvidas no cruzamento apresentavam coloração diferente, esperava-se uma colônia com coloração da linhagem selvagem;

iii) Diâmetro de conídios - o produto de fusão deveria apresentar um diâmetro cerca de 1,20 a 1,30 vezes maior que as linhagens selvagens haplóides, o que implica em um volume conídial duas vezes maior. O diâmetro de conídios foi medido com o auxílio de uma ocular micrométrica. Os conídios para tal finalidade foram retirados de colônias crescidas em meio mínimo (item 3.2.1) por 7 dias. Foram

medidos 30 conídios por linhagem;

iv) Teste com Benlate (HASTIE, 1970) - os possíveis diplóides foram inoculados em placas de Petri contendo meio completo (item 3.2.2) mais 1,00 $\mu\text{g/ml}$ de Benlate (item 3.2.15). A presença de setores com maior velocidade de crescimento que o possível diplóide indicou um processo de haploidização.

3.12.3. Obtenção e caracterização dos segregantes

O isolamento de segregantes foi realizado inoculando-se os diplóides obtidos através das metodologias descritas pelo item 3.2.1 em placas de petri contendo meio completo (item 3.2.2) mais 1,00 μg de Benlate por ml de meio (item 3.2.15). As placas foram incubadas por 5 a 7 dias. Os setores formados foram purificados, quando necessário, por estrias em meio completo. Os segregantes foram caracterizados quanto a coloração dos conídios e quanto a auxotrofia.

3.13. Determinação da atividade celulolítica (YOSHIOKA et alli, 1982; MANDELS et alli, 1976)

Foram realizadas suspensões de conídios das linhagens de *Aspergillus niger* (item 3.1) em solução de

Tween 80 a concentração de $1,0 \cdot 10^{-7}$ confídios por ml. Três erlenmeyer de 125ml contendo meio de farelo de trigo (item 3.2.5) foram inoculados com 1,00ml da suspensão acima e incubados por 96 horas a 28°C . Após esse período a extração das enzimas celulolíticas foi realizada com 30,00ml de água destilada, a 4°C , por frasco. Os frascos permaneceram em banho de gelo durante 4 horas, sendo seu conteúdo agitado por bastão de vidro a um intervalo de 40 minutos. Após a extração, o material foi filtrado em funil com gaze, sendo o filtrado centrifugado a 12000g por 30 minutos. Em seguida o sobrenadante foi conduzido aos ensaios enzimáticos. As análises foram feitas por espectofotometria. Unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar $1,0 \mu\text{M}$ de açúcar redutor por minuto.

3.13.1. Determinação da atividade de papel de filtro (FPA) (YOSHIOKA et alli 1982)

O sistema para a determinação da atividade de papel de filtro foi feito em tubos de ensaio contendo:

Tampão citrato 0,05 M pH 4,8 (item 3.2.20.3)...	5,00ml
Sobrenadante (item 3.14.1)	2,50ml
Papel filtro Whatman no 1	0,01g

Acrescentou-se 1 gota de tolueno por tubo.

Incubou-se os tubos em banho-maria a 50°C. Em tempos determinados, foi retirado uma alíquota de 1,00ml de cada tubo e misturado com 1,00 ml de DNS (ítem 3.2.24), homogeneizado em vortex e levado a banho-maria a 100°C por 5 minutos. O material então foi esfriado adicionando-se 14,00ml de água destilada. A leitura foi realizada em 540 nanômetros com a auxílio de um espectofotômetro.

3.14. Determinação da produção de ácido cítrico (PRESCOTT & DUNN, 1959)

Foram preparadas suspensões de conídios a partir de linhagens desenvolvidas em meio de esporulação (ítem 3.2.7) por 7 a 10 dias. A suspensão obtida, com cerca de 10^6 conídios por ml, foi inoculada em meio de fermentação (ítem 3.2.6).

O período de fermentação foi de 7 dias a 28°C. Após esse período, o meio foi filtrado em papel de filtro e determinada a quantidade de ácido cítrico.

3.14.1. Determinação da quantidade de ácido cítrico.

Uma alíquota de 1,00 ml do meio de fermentação (ítem 3.15) foi titulada com solução de NaOH 0,10 N, usando-se como indicador 2 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína 1% (peso por volume).

3.15. Análises estatísticas

Os dados relativos a produção de ácido cítrico, atividade celulolítica, crescimento de colônia e diâmetro de conídios foram analisados pelo Teste de F e pelo teste de Turkey (GOMES, 1987).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sobrevivência à luz ultravioleta

As Tabelas 4 e 5 mostram os dados relativos a curva de sobrevivência das linhagens 10V10 e 391H6 de *Aspergillus niger*, respectivamente. As Figuras 5 e 6 representam graficamente as curvas de sobrevivência à luz ultravioleta das linhagens 10V10 e 391H6 respectivamente.

Como pode ser observado, a linhagem 391H6 apresentou uma maior sensibilidade a luz ultravioleta do que a linhagem 10V10. O tempo necessário para que ocorresse 95% da mortalidade dos conídios na linhagem 391H6 foi entre 6 e 7 minutos de exposição a luz ultravioleta. Já com relação a linhagem 10V10, foi necessário de 8 a 9 minutos para alcançar 95% de mortalidade relativa.

Tabela 4 - Percentagem relativa de conídios da linhagem 10V10 de *Aspergillus niger* sobreviventes à luz ultravioleta. Média de três repetições.

Tempo (minutos)	Percentagem relativa de sobrevivência
0	100,00
1	84,54
2	50,18
3	23,64
4	15,32
5	13,64
6	10,91
7	7,81
8	6,09
9	3,33
10	0,67

Tabela 5 - Percentagem relativa de conídios da linhagem 391H6 de *Aspergillus niger* à luz ultravioleta. Média de três repetições.

Tempo (minutos)	Percentagem relativa de sobrevivência
0	100,00
1	62,56
2	36,51
3	25,14
4	9,77
5	6,05
6	1,00
7	0,86
8	0,36

Figura 5 - Curva de sobrevivência da linhagem 10V10.

Figura 6 - Curva de sobrevivência da linhagem 391H6

BONATELLI Jr.(1977) utilizando a mesma linhagem 10V10 observou que 5% de sobrevivência eram alcançados após uma exposição de praticamente 20 minutos a luz ultravioleta. Muito provavelmente, pode-se atribuir tal diferença a pontências diferentes de fonte de luz ultravioleta. As fontes comumente utilizadas para a indução de mutações em microrganismos tem uma decaimento acentuado com o passar de sua vida útil. Também a possíveis variações ocorridas na linhagem, uma vez que foram experimentos realizados com 14 anos de diferença. GOLDMAN (1988), utilizando a linhagem NRRL-337 de *Aspergillus niger* e utilizando a mesma fonte utilizada neste experimento chegou a resultados similares.

A mortalidade por luz ultravioleta está relacionada com o acúmulo de mutações causadas pelos efeitos da luz ultravioleta a nível de bases nitrogenadas do DNA.

A Tabela 6 e a Figura 7 ilustram o efeito da luz ultravioleta em um mutante morfológico branco da linhagem 391H6. Esta observação está de acordo com o observado por BOS *et alli* (1988). BOS *et alli* (1988) observa que, entre outros fatores, a cor do conídio tem uma fundamental importância na sobrevivência de conídios quando submetidos a luz ultravioleta. Utilizando linhagens de *Aspergillus nidulans* com conídios brancos e amarelos, e *Aspergillus niger* negros ficou evidente o papel da cor dos

conídios como proteção a luz ultravioleta. Neste mesmo trabalho, os autores demonstram que suspensões de esporos mais diluídas tornam os conídios

Tabela 6 Porcentagem relativa de conídios sobreviventes do mutante morfológico branco (391H6 why_1) à luz ultravioleta. Média de três repetições.

Tempo (minutos)	Porcentagem relativa de sobrevivência
0	100,00
1	48,87
2	42,86
3	12,03
4	6,01
5	2,26
6	1,00
7	0,00
8	0,00
9	0,00
10	0,00

Figura 7 - Curva de sobrevivência da linhagem 391H6 why_1

mais susceptíveis a luz ultravioleta. A relação entre curvas de sobrevivência, concentração de conídios e número de núcleos de conídios foi apresentada e discutida por ATWOOD & NORMAN (1949).

4.2. Obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos após o tratamento com luz ultravioleta.

Os mutantes morfológicos de *Aspergillus niger* foram obtidos segundo a metodologia descrita nos itens 3.8 e 3.6. A Figura 8 ilustra o "pedigree" dos mutantes morfológicos e auxotróficos da linhagem 10V10. A Figura 9 ilustra o "pedigree" dos mutantes morfológicos e auxotróficos da linhagem 391H6.

Figura 8. Mutantes morfológicos e auxotróficos da linhagem de *Aspergillus niger* 10V10.

Os símbolos *arg* e *met* representam respectivamente deficiências nutricionais para arginina e metionina. Os símbolos *why* e *fwn* representam respectivamente coloração de conídios brancos e marrom. O símbolo *mcy* representa coloração amarela do micélio. Ver Tabela 8.

Figura 9 .Mutantes morfológicos e auxotróficos da linhagem de *Aspergillus niger* 391H6.

Os símbolos *arg*, *bio* e *leu* representam respectivamente deficiência nutricional para arginina, biotina e leucina. O símbolo *why* representa coloração branca de conídios.

A Tabela 7 traduz a simbologia utilizada para denominar os mutantes obtidos e utilizada na Figura 8

e na Figura 9.

Tabela 8. Simbologia utilizada para denominar os mutantes obtidos.

Símbolos	Tradução
arg	deficiência para síntese de arginina
met	deficiência para síntese de metionina
leu	deficiência para síntese de leucina
bio	deficiência para síntese de biotina
pro	deficiência para síntese de prolina
cis	deficiência para síntese de cisteína
fwn	conídios de coloração marrom claro
mcy	micélio de coloração amarela
why	conídios de coloração branca

Os expoentes utilizados indicam que quando cruzados houve complementação, indicando mutação em passo biossintético distinto. Quando o mutante apresenta, em sua denominação, o mesmo expoente, é uma indicação de mutação no mesmo gene. Uma melhor análise sobre a questão da complementação será realizada no item 4.6.2 .

É interessante notar mutantes como 10V10 arg_4 que também apresenta auxotrofia para o

aminoácido prolina. Isto se deve a mutações em genes que atinge uma via biossintética comum. Neste caso tanto o aminoácido arginina quanto a prolina têm suas vias biossintéticas interdependentes. O passo inicial de ambos aminoácidos é a aminação do α -cetoglutarato pela ação da enzima L-glutamato-desidrogenase (LEHNINGER, 1976).

O mutante 10V10 met_1 apresenta auxotrofia para metionina e também para cisteína. Isto porque o percurso metabólico da metionina passa obrigatoriamente pela cisteína. Ambos aminoácidos apresentam em sua estrutura molecular o átomo de enxofre o que também pode implicar em uma mutação nos mecanismos de incorporação do enxofre inorgânico (LEHNINGER, 1976).

Com relação aos mutantes morfológicos obtidos, a natureza das mutações envolvidas pode ser variável. No caso dos mutantes fun_1 e mcy_1 podem ter ocorrido mudanças a nível de síntese de pigmento ou mudanças relacionadas com a fixação destes pigmentos nas paredes celulares. Nos mutantes why (conídios brancos) é provável que tenha ocorrido uma mutação ainda nos primeiros passos da via biossintética do pigmento. Alterações relacionadas com a fixação de pigmento, é improvável pois se observaria a acumulação de pigmentos em outras estruturas fúngicas ou até mesmo no meio de cultura. Em *Neurospora crassa* foi observado (GOLDIE & SURBDEN, 1973) um mutante morfológico (al_1) que não

apresentava sua cor alaranjada característica. Análises bioquímicas demonstram que o caroteno estava presente em altas concentrações mas em um arranjo molecular que não permitia o aparecimento da cor. A Figura 11 ilustra a linhagem 391H6 e o mutante 391H6 w_1 .

Figura 10. A esquerda a colônia selvagem da linhagem 391H6. A direita o mutante branco 391H6 why_1 .

A luz ultravioleta foi um mutagênico eficiente. Na linhagem 391H6, das 1071 colônias ensaiadas por isolamento total, foram obtidos 5 mutantes resultando em uma frequência de 0,47 %.

Na linhagem 10V10, 587 colônias foram ensaiadas por isolamento total após tratamento com luz ultravioleta de onde foram obtidos 3 mutantes

morfológicos resultando em uma frequência de 0,51% de obtenção de mutantes. Com esta linhagem também foi ensaiada a metodologia de enriquecimento por filtração (item 3.10). Utilizando-se desta metodologia, foram ensaiadas 598 colônias de onde foram constatados 3 mutantes auxotróficos, resultando em uma frequência de 0,50% de obtenção de mutantes.

O rendimento na obtenção de mutantes por isolamento total foi semelhante com o obtido por GOLDMAN (1988). A técnica de enriquecimento por filtração não se mostrou eficiente como nos trabalhos de GOLDMAN (1988), BAGALHI (1987) e FUNGARO (1984). MASIERO (1988) também não obteve resultados positivos com a técnica de enriquecimento. Muito provavelmente o tempo de incubação não deve ter sido o mais apropriado.

4.2.1. Determinação das frequências de reversão das mutações auxotróficas e morfológicas obtidas por exposição a luz ultravioleta das linhagens 10V10 391H6.

A Tabela 8 demonstra as frequências de reversão dos mutantes morfológicos e auxotróficos. Como pode ser observado não houve reversão na maioria das marcas. Os conídios dos mutantes foram semeados em placas de Petri com meio mínimo (item 3.2.1)

A não ser a linhagem mutante 10V10_{metwhy} que não é citada nesta tabela, não houve reversão. Neste mutante ocorreu um interessante fenômeno de uma altíssima taxa de reversão. A reversão que ocorria foi mais surpreendente ainda porque ocorria com a marca morfológica, não apenas com a auxotrófica como seria o esperado.

Tabela 8. Frequência de reversão das mutações auxotróficas e morfológicas das linhagens 10V10 e 391H6.

Mutantes	conídios ensaiados	Frequência de reversão
10V10arg ₁	2,93.10 ⁵	< 2,93.10 ⁻⁵
10V10arg ₄	1,47.10 ⁵	< 1,47.10 ⁻⁵
10V10met ₁	7,05.10 ⁵	< 7,05.10 ⁻⁵
10V10why ₁	1,74.10 ²	< 1,74.10 ⁻²
10V10mcy ₁	1,45.10 ²	< 1,45.10 ⁻²
391H6arg ₁	7,05.10 ⁵	< 7,05.10 ⁻⁵
391H6arg ₂	3,76.10 ⁵	< 3,76.10 ⁻⁵
391H6why ₁	1,03.10 ²	< 1,03.10 ⁻²
391H6why ₁ bio ₁	2,60.10 ⁵	< 2,60.10 ⁻⁵
391H6why ₁ leu ₁	9,87.10 ⁴	< 9,87.10 ⁻⁴
391H6arg ₃	4,77.10 ⁵	< 4,77.10 ⁻⁵
391H6leu ₁	6,03.10 ⁵	< 6,03.10 ⁻⁵

4.3. Crescimento em meio completo e em meio de esporulação

A Tabela 9 demonstra o diâmetro médio de colônia das linhagens 10V10 e 391H6, aos 3 dias de crescimento, de acordo com os itens 3.2.4 e 3.2.7 e a comparação de acordo com o teste de Turkey. Os resultados mostram uma diferença significativa entre linhagens apenas quando em condições de cultivo diferentes. Dentro da mesmas condições de cultivo, não houve contrastes suficientes para uma diferenciação. A diferença observada entre a taxa de crescimento em meio completo e meio de fermentação está, evidentemente, relacionada com a quantidade de nutrientes prontos no meio completo.

Tabela 9. Diâmetro médio da colônia da linhagem 391H6 e 10V10 ao terceiro dia de crescimento. Média de três repetições.

Linhagens	Meios de cultura	Médias
391H6	Meio completo	4,1667 *
10V10	Meio completo	3,1667
391H6	Meio de esporulação	2,0000
10V10	Meio de esporulação	1,900

*Médias não ligadas pelo mesmo traço indica que são significativamente diferentes a nível de 5%.

O formato das colônias e a quantidade de esporos também variaram de acordo com o meio utilizado. Utilizando o meio de esporulação, as colônias apresentaram um bordo não uniforme e baixa esporulação. O cultivo em meio completo propiciou, por sua vez, uma colônia com bordo uniforme e com elevada esporulação.

4.4. Determinação da produção de ácido cítrico.

A determinação da produção de ácido cítrico foi realizada segundo o item 3.15 e 3.15.1. A Tabela 11 ilustra a produção de ácido cítrico pelas linhagens de *Aspergillus niger*, com e sem a passagem pelo meio de esporulação.

A quantificação da produção de ácido cítrico por titulação é uma metodologia amplamente utilizada por ser simples e não dispendiosa. BONATELLI Jr (1977) encontra uma correlação entre o título e a produção de ácido cítrico altamente significativa.

As linhagens 10V10 e 391H6 apresentaram morfologias distintas quando desenvolvidas em meio de fermentação. A linhagem 10V10 apresentava um crescimento vigoroso, formando uma consistente película na superfície do meio, sem a formação de esporos. Já a linhagem 391H6 apresentava um micélio não tão consistente mas apresentou

uma grande produção de esporos. Diversos autores, entre eles PRESCOTT & DUNN (1959), SHU & JOHNSON (1947 e KUBICEK & RÖHR (1982) citaram como uma característica quase sempre ligada a alta produtividade de ácido cítrico, a ausência de esporulação quando desenvolvimento em meio de fermentação.

Tabela 10. Produção de ácido cítrico nas linhagens 391H6 e 10V10, passando ou não pelo meio de esporulação.

Linhagens	Repetições			
	I	II	III	IV
391H6 (MC)*	0,68	0,52	0,59	0,67
391H6 (ME)	0,51	0,55	0,40	0,68
10V10 (MC)	2,28	1,86	2,22	2,40
10V10 (ME)	6,00	3,76	4,02	10,45
Contrôle**	0,30	0,30	0,30	0,30

* As letras entre parênteses indicam: MC: esporos provenientes de placas de meio completo. ME: esporos provenientes de esporulação.

** Foram utilizados como controle erlenmeyers contendo meio de fermentação sem terem sido inoculados. O valor titulado foi devido a acidez do meio de fermentação.

A análise de variância dos dados acima é

exposta na Tabela 11. O teste de Turkey é explicitado na Tabela 12.

Tabela 11. Análise de variância dos dados da Tabela 9.

G.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	3	82,5441	27,5147	10,43**
Resíduo	12	31,6493	2,6374	
Total	15	114,1934		

** significativo a nível de 1%.

Tabela 12. Teste de Turkey para as médias dos diferentes tratamentos da Tabela 9.

Linhagem e tratamento	Médias (ml de NaOH 0,1N)
10V10 (ME)**	6,13 *
10V10 (MC)	2,19
391H6 (MC)	0,53
391H6 (ME)	0,53

* Médias não ligadas pelo mesmo traço indica que são significativamente diferentes a nível de 5%.

** ME significa fermentação com esporos oriundos de placas de Petri com meio de esporulação (item 3.2.7)

MC significa fermentação com esporos oriundos de placa de Petri com meio completo (item 3.2.2)

Como pode ser observado na Tabela 12, não houve diferença significativa quando o inóculo foi obtido através de desenvolvimento em meio completo. Quando as linhagens foram cultivadas em meio de esporulação (item 3.2.7), houve um aumento significativo da produção de ácidos totais na linhagem 10V10. Tal resultado confirma a característica de linhagem produtora mesmo em condições de laboratório.

BONATELLI Jr (1977), trabalhando com a mesma linhagem, encontrou uma produção média 100% maior que a encontrada neste trabalho. A causa para a queda da eficiência na produção da linhagem 10V10 pode ser explicada pela instabilidade genética, o que pode ter causado mudanças a nível genético destas linhagens. É importante citar que a linhagem 10V10 ficou um grande período estocada em condições que não favoreciam a manutenção do patrimônio genético da linhagem. Um outro fator que poderia causar queda na produtividade da linhagem, foi uma condição desfavorável para a acumulação de ácido cítrico no meio de fermentação (item 3.2.6). Diversos autores (PRESCOTT & DUNN, 1959; SHU & JOHNSON, 1947; SZCZODRAK & ILCZUK, 1985 entre outros) citam como um fator fundamental para a acumulação de ácido cítrico, a ausência de íons metálico. Estes íons participariam como cofatores de enzimas envolvidas em vias biossintéticas onde o ácido cítrico participaria. É provável que as

condições de cultivo utilizadas não permitiram a acumulação de ácido cítrico.

A linhagem 391H6 não apresentou acumulação significativa de ácido cítrico, embora seja originária de uma indústria produtora de ácido cítrico. Esta linhagem também, quando em condições de cultivo para acumulação de ácido cítrico, apresentou morfologia característica de linhagem não produtora (formação intensa de esporos).

A ausência de acumulação de ácido cítrico pela linhagem 391H6 pode ter sido o uso de uma metodologia não adequada para tal. As condições na indústria não são as mesmas que as condições oferecidas em laboratório. Aliado a este fato, podem estar relacionados os outros dois fatores para a não acumulação de ácido cítrico apontados anteriormente para a linhagem 10V10.

KUBICEK-PRANZ *et alli* (1990) demonstraram que a frutose 2,6-bifosfato é um poderoso agente controlador da produção de ácido cítrico. Este relato indica, mais uma vez, que pesquisas envolvendo o melhoramento da produção de ácido cítrico, tem que incluir obrigatoriamente estudos de natureza bioquímica para que se possa direcionar uma abordagem genética da questão.

4.5. Determinação da atividade celulolítica.

A determinação da atividade celulolítica

das linhagens 10V10 e 391H6 foi feita de acordo com metodologia descrita no item 3.14. A Tabela 13 ilustra a atividade celulolítica das linhagens 10V10 e 391H6 expressa em micromoles (μM) de açúcar redutor por mililitro de sobrenadante enzimático (item 3.14.1).

Tabela 13. Atividade celulolítica das linhagens 10V10 e 391H6 de *Aspergillus niger*. Média de 3 repetições.

Linhagem	μM açúcar redutor em 1,00 ml de sobrenadante enzimático.			
	Média	Repetições		
		I	II	III
391H6	15,76	17,34	14,10	15,84
10V10	7,80	8,00	7,20	8,20

As médias da Tabela 13 diferem a nível de 1% pelo teste de Tukey ($\Delta = 5,5530$).

A Tabela 13 ilustra a análise de variância da atividade celulolítica das linhagens 10V10 e 391H6.

A partir da Tabela 13 e da Tabela 14 pode-se concluir que nas condições ensaiadas a linhagem 391H6 tem uma maior atividade celulolítica que a linhagem 10V10.

Os fungos *Aspergillus niger* e *Trichoderma viride* são importantes fontes de celulase para propósitos industriais (VIDMAR et alli, 1985). Estes mesmos autores isolaram e caracterizaram duas endoglucanases diferentes a partir do resíduo industrial de uma industria de ácido cítrico.

Tabela 14. Análise de variância da atividade celulolítica das linhagens 10V10 e 391H6.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Linhagens	1	95,04	95,04	65,31**
Resíduo	4	5,82	1,46	
Total	5	100,86		

** Significativo ao nível de 1%.

Esta relação entre produção de ácido cítrico e enzimas celulolíticas é de extrema importância pois permitirá em um futuro próximo o uso de uma mesma planta para a produção de ambas matérias primas e também o uso de fontes de carbono menos nobres para a produção de ácido cítrico. TOYAMA, 1976, apresenta o uso de celulases de *Trichoderma viride* como um meio de produção de açúcar a

partir de resíduos agrícolas e urbanos.

Como pode ser observado na Tabela 13 a atividade celulolítica da linhagem 391H6 pode ser considerada como promissora, principalmente se compararmos com o trabalho de GOLDMAN (1988) onde linhagens produtoras de celulases (*Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*) tiveram atividade celulolítica semelhante.

4.6. Estudos genéticos

4.6.1. Verificação da estabilidade genética.

A verificação da estabilidade genética das linhagens 391H6 e 10V10 foi realizada segundo o item 3.7.

Com relação a linhagem 391H6, em nenhum momento foi observada a formação de setores em colônias desenvolvidas em meio completo. Já na linhagem 10V10, setores de tonalidades diferentes e padrões diferentes de esporulação foram observados com frequência.

BONATELLI Jr (1977) observou apenas um setor em 160 placas de Petri com meio completo. O mesmo autor encontrou que, em placas de Petri contendo meio mínimo, o aparecimento de setores foi maior (300 em 160 placas de Petri com meio mínimo). Em meio mínimo suplementado com extrato de levedura não houve formação de setores.

4.6.2. Ciclo parassexual.

4.6.2.1. Obtenção de colônias prototróficas.

A Tabela 15 mostra os resultados na obtenção ou não de película nos diversos cruzamentos realizados.

Tabela 15. Obtenção de heterocários para a obtenção de diploides (ROPER, 1952) e desenvolvimento de película (ítems 3.2.13 e 3.2.14)

Linhagens	MM + 2% MC	MM + 4% MC
391H6 _{bio₁ why₁} + 391H6 _{leu}	-	++
391H6 _{bio₁ why₁} + 391H6 _{arg₁}	+	++
391H6 _{bio₁ why₁} + 391H6 _{arg₂}	+	++

Tabela 15. Continuação...

Linhagens	MM + 2% MC	MM + 4% MC
391H6 _{leu₁why₁} + 391H6 _{arg₂}	+	++
391H6 _{leu₁why₁} + 391H6 _{arg₁}	+	++
10V10 _{met₁} + 391H6 _{arg₁}	+	+++
10V10 _{met₁why₁} + 391H6 _{arg₁}	-	-
10V10 _{met₁} + 10V10 _{arg₂}	-	+++
10V10 _{arg₁} + 391H6 _{leu₁why_I}	-	+++
10V10 _{met₁} + 10V10 _{arg₂}	-	+++
10V10 _{arg₁} + 10V10 _{met_I}	-	-
10V10 _{arg₁} + 391H6 _{arg₂}	-	++
10V10 _{arg₂} + 391H6 _{arg₂}	-	-
10V10 _{arg₂} + 391H6 _{arg₁}	-	+++
391H6 _{arg₁} + 10V10 _{met₁}	-	+
10V10 _{arg₂} + 10V10 _{arg₁}	-	+
10V10 _{arg₁} + 391H6 _{arg₁}	-	-
10V10 _{arg₂} + 391H6 _{leu_Iwhy₁}	-	-
391H6 _{arg₁} + 391H6 _{arg₂}	++	+++

- indica ausência de crescimento; + a +++ indicam crescimento em ordem crescente de vigor.

A Tabela 15 ilustra que a clássica metodologia parassexual permite obter o desenvolvimento de película. Esta película é o primeiro passo para a ocorrência da parassexualidade. É nesta etapa em que pode ocorrer a anastomose de hifas possibilitando ou não a evolução para um estado heterocariótico e ocorrendo fusão de núcleo, o estado diplóide (AZEVEDO, 1987).

É importante salientar a importância dos requisitos nutricionais para o desenvolvimento da película e consequentemente de colônias heterocarióticas

A Tabela 16 ilustra a fase posterior ao desenvolvimento da película, que é a indução de um relacionamento mais íntimo entre as linhagens mutantes através da transferência das películas para placas de Petri com meio mínimo (item 3.2.1.).

Tabela 16. Desenvolvimento de colônias heterocarióticas a partir de películas.

Cruzamentos	Formação de heterocários
391H6 _{leu₁why₁} X 391H6 _{arg₂}	+++
391H6 _{bio₁why₁} X 391H6 _{arg₁}	++
10V10 _{arg₁} X 391H6 _{arg₂}	+++
10V10 _{met₁} X 391H6 _{arg₂}	+

Tabela 16. Continuação...

Cruzamentos	Formação de heterocários
10V10 _{arg₁} X 391H6 _{leu₁ why}	+
10V10 _{arg₁} X 10V10 _{met₁}	+

+ a +++ indicam crescimento em ordem crescente de vigor.

A Tabela 15 ilustra que não houve síntese de heterocários em todos os cruzamentos considerados. Na mesma tabela podemos definir algumas mutações complementares indicando que as mutações nestes casos podem ter ocorrido em um mesmo locus funcional.

Não foi possível calcular a frequência de diplóides obtidos porque as colônias obtidas foram colônias heterocarióticas. Colônias diplóides foram obtidas após diversas passagens de suspensões conidiais de heterocários por meio mínimo. Após essas passagens obteve-se algumas colônias com um crescimento diferenciado que foram isoladas e levadas a uma caracterização segundo o item 3.12.2.

A Tabela 17 abaixo, mostra o diâmetro médios de conídios e a formação de setores na presença de agente haploidizante.

Tabela 17. Diâmetros médios de conídios (μm) e formação de setores de produtos de cruzamento.

Cruzamentos	Setor	diâmetro (μm)
$391\text{H6}_{\text{leu}_1 \text{why}_1} \times 391\text{H6}_{\text{arg}_2}$	sim	6,1176
$391\text{H6}_{\text{bio}_1 \text{why}_1} \times 391\text{H6}_{\text{arg}_1}$	não	4,5100
$10\text{V10}_{\text{arg}_1} \times 391\text{H6}_{\text{arg}_2}$	sim	6,1233
$10\text{V10}_{\text{met}_1} \times 391\text{H6}_{\text{arg}_2}$	sim	6,4313
$10\text{V10}_{\text{arg}_I} \times 391\text{H6}_{\text{leu}_1 \text{why}_1}$	sim	6,4321
$10\text{V10}_{\text{arg}_1} \times 10\text{V10}_{\text{met}_I}$	não	4,5163

A Tabela 17 mostra que foram isolados 4 diplóides cuja confirmação se deu pela obtenção de setores e pelo diâmetro maior, confirmando o dobro de volume de uma colônia haplóide.

A Figura 11 ilustra uma colônia diplóide $391\text{H6}_{\text{leu why}} // 391\text{H6}_{\text{arg}}$ segregando setores.

Figura 11. $391H6_{leu_1 why_1} // 391H6_{arg_2}$ em meio completo mais Benlate[®].

A Tabela 18 ilustra a análise mitótica do diplóide $391H6_{leu_1 why_1} // 391H6_{arg_2}$, e a Tabela 19 ilustra a análise mitótica do diplóide $10V10_{arg_1} // 391H6_{leu_1 why_1}$.

Tabela 18. Análise mitótica $391H6_{leu_1 why_1} // 391H6_{arg_2}$. Analisados 22 segregantes.

<i>arg</i>			<i>why</i>			<i>why</i>		
	+	-		+	-		+	-
+	16	6	+	12	10	+	10	6
<i>leu</i>			<i>leu</i>			<i>arg</i>		
-	0	0	-	0	0	-	2	4

Tabela 19. Análise mitótica do diplóide 10V10_{arg} // 391H6_{leu why}. Analisados 35 segregantes.

<i>arg</i>			<i>why</i>			<i>why</i>		
+ -			+ -			+ -		
leu	17	11	arg	19	9	leu	11	13
-	7	0	-	2	5	-	10	1

Embora a análise mitótica tenha sido realizada com auxílio de agente haploidizante (Benlate item 3.2.15), os diplóides obtidos e descritos na Tabela 16 apresentaram, embora em menor frequência, setores mesmo quando cultivados em meio mínimo. Estes setores prototróficos são recombinantes e frutos do fenômeno da paramiose, descrito por BONATELLI Jr et alli (1983) em *Aspergillus niger*, e por BAGALHI (1987) em *Metarhizium anisopliae*.

4.6.3. Fusão química de protoplastos

A fusão química de protoplastos foi realizada segundo metodologia estabelecida no item 3.13.1.2.. Para tanto, foram ensaiadas duas metodologias distintas para a obtenção e regeneração de protoplastos de *Aspergillus niger*. Os resultados obtidos estão na Tabela 20 e 21.

Tabela 20 - Isolamento e regeneração de protoplastos da linhagem 10V10 de *Aspergillus niger*, segundo as metodologias de DAS & GHOSH (1989) GOLDMAN (1988).

	DAS & GHOSH (1989)	GOLDMAN (1988)
Protoplastos Obtidos	$3,05.10^6$	$1,50.10^6$
Regeneração (%)	12,33%	65,73%

Tabela 21 - Isolamento e regeneração de protoplastos da linhagem 391H6 de *Aspergillus niger*, segundo as metodologias de DAS & GHOSH (1989) e GOLDMAN (1988).

	DAS & GHOSH (1989)	GOLDMAN (1988)
Protoplastos Obtidos	$6,08.10^6$	$6,65.10^6$
Regeneração (%)	5,97%	24,95%

A eficiência das diferentes metodologias de obtenção e regeneração de protoplastos de *Aspergillus*

niger variam muito. Como se observa na Tabela 19 e na Tabela 20, a metodologia estabelecida por GOLDMAN (1988) foi a mais eficiente tanto para o processo de regeneração quanto para o processo de obtenção de protoplastos. Nota-se também que a linhagem 10V10 possui uma maior eficiência no processo. Não é incomum encontrar na literatura relatos contraditórios com relação ao estabilizador osmótico mais eficiente. KIRIMURA *at alli* (1988) obtiveram maior eficiência utilizando KCl 0,7M tanto na fase de isolamento quanto na fase de regeneração de protoplastos.

A causa desta grande variação nos diferentes processos de protoplastização não é conhecida. Pode-se afirmar apenas que diferentes estabilizadores causam mudanças a nível de número de núcleos e grau de vacuolização do protoplasto (GOLDMAN, 1988 e PEBERDY, 1979).

Os resultados obtidos com relação a linhagem 10V10 se assemelham muito com os resultados obtidos por BORGES (1987) utilizando a mesma linhagem. Isto demonstra que as variações existentes entre linhagens da mesma espécie são suficientes para alterar as respostas destas linhagens aos processos de protoplastização.

Aditivos como 2-deoxy-glucose (BOS & SLAKHORST, 1980) e 2-mercaptoetanol (KATENKAMP *at alli*, 1989) tem sido utilizados com sucesso no melhoramento dos

processos de obtenção de protoplastos em fungos.

4.6.3.1. Susceptibilidade ao PEG (item 3.12)

A toxicidade apresentada pelo PEG pode tornar inviável esse processo de fusão celular (HAYDU et al, 1977). A Tabela 22 apresenta o efeito tóxico da solução de PEG (item 3.2.19) em protoplastos de *Aspergillus niger*, linhagens 10V10 e 391H6.

Tabela 22. Efeito tóxico de solução de PEG, em % relativa.

Média de três repetições.

Tempo	(m)	391H6	10V10
0		0,00	0,00
10		75,54	92,87
20		84,04	94,69
30		87,80	94,66

A Tabela 22 demonstra que a solução de polietileno glicol é altamente tóxica aos protoplastos. KADISH & WENC (1983) observaram o mesmo efeito em células animais. Tais efeitos seriam, segundo os autores, causado por aldeídos formados a partir de soluções de PEG armazenadas ou autoclavadas em condições impróprias. A

perda da viabilidade de protoplastos pode resultar em uma queda da eficiência do processo de fusão fazendo com que ocorram dificuldades no melhoramento de linhagens de caráter industrial.

A Tabela 23 mostra o resultado de alguns cruzamentos realizados via fusão química de protoplastos. Os parentais foram escolhidos baseados em sucesso anterior no cruzamento via ciclo parassexual clássico (Tabela 17).

Tabela 23. Porcentagem relativa de colônias prototróficas obtidas por fusão química de protoplastos.*

Cruzamento		% relativa de colônias prototróficas
391H6 _{leu why}	X 391H6 _{arg2}	0,2353
391H6 _{leu why}	X 10V10 _{arg1}	0,3089

*A taxa de fusão foi determinada como sendo a relação do número de colônias em meio mínimo e meio completo mais estabilizador osmótico (1,20 M sorbitol)

As frequências de fusão obtida através da fusão química de protoplastos foram similares às obtidas por DAS *at alli* (1989), cuja frequência de fusão variou de 0,004% a 0,54%, dependendo das linhagens envolvidas.

4.6.4. Eletrofusão de protoplastos.

Os parâmetros da primeira fase do processo de eletrofusão foram definidos segundo o item 3.12.1.3.1..

A Tabela 24 ilustra os parâmetros dieletroforéticos obtidos para protoplastos de *Aspergillus niger*.

Tabela 24. Parâmetros dieletroforéticos de protoplastos de *Aspergillus niger*.

Concentração de protoplastos	4,05.10 ⁶ /ml	Meio
utilizado	item 3.2.18.4	Diâmetro
médio dos protoplastos	8,4375 μ m	Resistividade do
sistema	$\cong$ 30	K Ω

A Tabela 25 mostra a amplitude e a frequência de campo elétrico necessárias para a indução da configuração em "colar-de-contas" em protoplastos de *Aspergillus niger*.

Tabela 25. Frequência, tempo e amplitude de campo elétrico para indução da configuração pearl-chain.

Frequência	Faixa de amplitude	Tempo
1 Mhz	0,40 a 0,50 kV/cm	20 s
5 Mhz	0,25 a 0,30 kV/cm	20 s

Os dados da Tabela 25 aplicados à eq.2 do item 2.2.5.2 implicariam em um comprimento das cadeias de células variando de 0,01 a 0,05 cm, o que não ocorreu. Isto porque a equação definida por HOLFMANN & EVANS (1986) é uma equação para condições ideais. As condições do experimento realizado, estão longe de serem ideal, principalmente com relação à temperatura e resistividade do meio. Um outro fator que não pode ser excluído é a grande variabilidade encontrada no tamanho dos protoplastos, o que influencia muito todas essas relações. Esta variabilidade no tamanho dos protoplastos está diretamente relacionada com o tempo de permanência dos protoplastos no sistema lítico (NEIROTI, 1988).

KATENKAMP et alii (1989) obteve a configuração em "colar-de-contas" em uma amplitude inferior (500 V/cm) mas com a mesma frequência. Tal

resultado contradiz um das relações da dieletroforese que relaciona o tamanho das células com a intensidade de campo elétrico necessário. Neste caso, protoplastos de *Trichoderma reesei*, os diâmetros variavam de 4,2 a 5,3 μm .

LYNCH et alii (1989) utilizando protoplastos de *Aspergillus nidulans*, obteve resultados semelhantes aos da Tabela 24, sendo também semelhante o tamanho dos protoplastos utilizados.

A Figura 11 ilustra a configuração em "colar-de-contas" de protoplastos de *Aspergillus niger*.

A Tabela 26 ilustra a viabilidade dos protoplastos de *Aspergillus niger* quando submetidos a diferentes intensidades de campo elétrico. Este é um dos principais parâmetros do processo de eletrofusão, pois permite conhecer o quanto a célula foi danificada, de forma irreversível pela ação do campo elétrico.

Figura 11. Configuração em "colar-de-contas" de protoplastos de *Aspergillus niger*. 1Mhz, 5kV.cm^{-1} .

Tabela 26. Viabilidade relativa de protoplastos de *Aspergillus niger** a campo elétrico. 5 Pulsos.

Amplitude (kV/cm ¹)	Viabilidade relativa (%)
0,00	100,00
1,92	96,78
5,77	89,20
9,61	70,45
13,46	45,06

* Protoplastos da linhagem 10V10.

A Tabela 26 mostra que para as amplitudes utilizadas nos processos de fusão (de 1,00 a 6,00 kV) a viabilidade dos protoplastos não é alterada a ponto de comprometer o processo de obtenção de híbridos. Esta baixa perda no processo é um dos principais motivos apontados por ZIMMERMANN (1982) e SAUNDERS (1984) para o sucesso desta técnica. A perda de viabilidade dos protoplastos, embora pequena, poderia ser diminuída com um controle maior da temperatura da câmara de fusão (BATES, 1983).

A Tabela 27 mostra os resultados obtidos com o processo de eletrofusão no cruzamento de linhagens

de *Aspergillus niger*.

Tabela 27. Porcentagem relativa de colônias prototróficas obtidas por eletrofusão de protoplastos.*

Cruzamento	% relativa de colônias prototróficas
391H6 _{leu₁ why₁} X 391H6 _{arg₁}	5,0905
391H6 _{leu₁ why₁} X 10V10 _{arg₂}	2,9500

*A taxa de fusão foi determinada como sendo a relação do número de colônias em meio mínimo e meio completo mais estabilizador osmótico (1,20 M sorbitol).

As Figuras 12 e 13 representam, a amplitude onde surgiram colônias prototróficas após diferentes intensidades de campo elétrico (C.C.). A Figura 12 representa os dados obtidos pelo cruzamento 391H6_{leu₁ why₁} X 391H6_{arg₁}. A Figura 13 representa os dados relacionados com o cruzamento 391H6_{leu₁ why₁} X 10V10_{arg₁}.

Os dados das Figuras 12 e 13 são relativos, e as Figuras foram compostas com resultados de vários experimentos distintos. A Tabela 27 indica o máximo de eficiência encontrado na metodologia. Os protoplastos foram submetidos a 5 pulsos de C.C..

Figura 13. Relação entre intensidade de campo elétrico (C.C.) e a percentagem de colônias prototróficas obtidas. Cruzamento 391H6^{leu+} X 391H6^{arg+}. A Figura indica as frequências máximas e mínimas.

Figura 14. Relação entre intensidade de campo elétrico (C.C.) e a percentagem de colônias prototróficas obtidas. Cruzamento 391H6^{leu+} X 10V10^{arg+}. A Figura indica as frequências máximas e mínimas.

Os parâmetros onde a frequência de obtenção de heterocários foram maiores (Tabela 27) foram:

a - Alinhamento:

Frequência: 1 Mhz

Amplitude: 400 V.cm⁻¹

Tempo: 20 s

b - Compressão:

Frequência: 1Mhz

Amplitude: 520 V.cm⁻¹

Tempo: 5 s

c - Fusão:

Amplitude: 5,77 kV.cm⁻¹

Tempo: 30 µs

Número de pulsos: 5

Os poucos relatos existentes utilizando fungos filamentosos em procedimentos de eletrofusão (LINCH at alli, 1989 e KATENKAMP at alli 1989) mostram uma similaridade muito grande entre os parâmetros utilizados nas fases de alinhamento e fusão. Isso reforça a idéia exposta por ZIMMERMANN (1982) de que este processo depende basicamente de parâmetros físicos, e não tanto biológicos como na metodologia parassexual clássica.

Com relação a eficiência da eletrofusão sobre a fusão química de protoplastos, pode-se afirmar que

o processo é mais eficiente considerando também o efeito tóxico do polietileno glicol. KARSTEN et alli (1988), utilizando células animais para a produção de hibridomas encontraram na eletrofusão, um processo 33 vezes mais eficiente (33 vezes mais híbridos) que a fusão por polietileno glicol. Não apenas, os hibridomas obtidos desenvolveram-se com mais vigor e em menos tempo.

Com relação ao aumento de vigor e aumento de viabilidade, que são características comumente citadas como presentes em células submetidas a campos elétricos (ZIMMERMANN, 1982 e KARSTEN et alli, 1988) não observou no presente trabalho tais características. Observou-se uma queda no tempo de regeneração dos protoplastos, tanto da linhagem 10V10 e 391H6, se comparado com os protoplastos tratados com polietileno glicol.

A quantidade de colônias prototróficas obtidas está longe das frequências de fusão obtidas em plantas e animais (KAMATA & NAGATA, 1987; SIHACHAKR et alli, 1988; WALTON & BROWN, 1988). Em animais há o relato de FINAZ et alli (1984) onde se obteve 90% de fusão. Estes índices devem ser avaliados com cuidado pois, na maioria das vezes eles indicam a quantidades de células fundidas, avaliadas por observação direta do processo. Um índice deste tipo não foi possível determinar neste trabalho uma vez que, em primeiro lugar, os protoplastos de fungo são cerca de 10 vezes menores que os protoplastos de plantas e

células animais. Em segundo lugar, observações deste tipo exigiriam condições não disponíveis.

NEIROTI (1988) realizou tentativas de hibridação de protoplastos de *Humicola*_{sp}. Provavelmente, não obteve sucesso, embora utiliza-se parâmetros razoáveis, porque utilizou solução de NaOH para ajustar o pH para 7,0. Tal procedimento fez com que provavelmente ocorresse efeito joule na câmara de eletrofusão.

4.7. Sobre os processos de hibridação e o melhoramento genético em *Aspergillus niger*.

O processo de eletrofusão demonstrado neste trabalho foi mais eficiente que as outras metodologias empregadas, considerando apenas a frequência de colônias prototróficas obtidas. No caso de *Aspergillus niger* houve dificuldade de se obter diplóides estáveis, a ocorrência do fenômeno da paramiose (BONATELLI Jr et alli, 1983) que dificultam uma análise melhor dos processos.

Por ser uma metodologia mais rápida e com uma eficiência maior, a eletrofusão de protoplastos, embora seja uma técnica dispendiosa, permitiu maior frequência de produtos de fusão. A eletrofusão aliada a metodologias de genética quantitativa, pode ser um valioso instrumento no melhoramento genético de *Aspergillus niger*.

5. Conclusões

O conjunto de experimentos realizados com as linhagens 10V10 e 391H6 de *Aspergillus niger*, permitem as conclusões a seguir:

a) A linhagem 10V10 recuperou a capacidade de produção de ácido cítrico após passagem por meio de esporulação com baixa quantidade de íons metálicos;

b) a linhagem 391H6 não produziu ácido cítrico e também não apresentou características morfológicas próprias de linhagens produtoras;

c) a linhagem 391H6 apresentou uma atividade celulolítica maior que a linhagem 10V10;

d) a luz ultravioleta foi um instrumento eficaz nos procedimentos de obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos;

e) o cruzamento através do, ciclo parassexual clássico (ROPER, 1952) foi eficiente para a obtenção de colônias diplóides prototróficas, sendo os parâmetros utilizados para diferenciar diplóides de haploides eficientes;

f) o sistema lítico mais eficiente para o isolamento de protoplastos foi o que continha KCl 0,6 M como estabilizador osmótico; e o estabilizador osmótico mais eficiente para a regeneração dos protoplastos foi solução de sorbitol 1,2 M;

g) a solução de sorbitol 1,2 M mais histidina e CaCl_2 foi eficiente para a determinação dos parâmetros de eletrofusão;

h) o polietileno glicol mostrou ser altamente tóxico aos protoplastos de *Aspergillus niger*;

i) a eletrofusão se mostrou como uma técnica eficiente

para fusão de protoplastos de *Aspergillus niger*. .

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL OBADI, Z.S.; BERRY, D.R. cAMP concentrations, morphological differentiation and citric acid production in *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, Kew, 2:5-10, 1980.
- ANNÉ, J. & PEBERDY, J.F. Conditions for induced fusion on fungal protoplasts in poly ethylene glycol. *Archives of Microbiology*, Berlin, 105:201-205, 1976.
- AZEVEDO, J.L.. Recombinação em fungos filamentosos. In: COSTA, S.O.P. *Genetica Molecular e de Microrganismos*. São Paulo, Ed. Manole, 1987. Cap.24, p.393-408.
- BALL, C.; HAMLYN, P.F. Genetic recombination studies with *Cephalosporium acremonium* related to the production of industrially important antibiotic. *Revista Brasileira de Genética*, São Paulo, 5:1-13, 1982.
- BATES, G.W.; GAYNOR, J.J.; SHEKHAWAT, N.S. Fusion of plant protoplast by electric field. *Plant Physiology*,

Mariland, 67:849-853, 1983.

BENZ, R.; ZIMMERMANN, U. Pulse-length dependences of electrical breakdown in lipid bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, New York, 507:637-642, 1982.

BIGELIS, R. Primary metabolism and industrial fermentation. In. Gene manipulation on fungi. Academic Press, New York, 1985

BINDING, H.; ZUBA, M.; RUDMICK, J.; MORDITORST, G. Protoplast gel fusion. *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, 133:409-413, 1988.

BLAIR, G.T.; ZIENTY, M.F. Citric Acid: Properties and reaction, Elkahart, Miles Laboratories, 1979, 85p.

BONATELLI Jr, R. Estabilidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, 1977. 101p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP).

BONATELLI Jr., R. Parassexualidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, 1981. 91p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiros" - USP).

BONATELLI Jr., R.; AZEVEDO, J.L.; VALENT, G.U. Parassexuality in a citric acid producing strains of *Aspergillus niger*. *Revista Brasileira de Genética*, São Paulo, 4:399-405, 1982.

BONATELLI Jr., R.; AZEVEDO, J.L.; VALENT, G.U. Citric

- acid production by *Aspergillus niger* mutants. *Revista Brasileira de Genetica*, São Paulo, 5:483-492, 1982.
- BORGES, M.I. Técnicas de protoplastização e isolamento de DNA de alto peso molecular de *Aspergillus niger*. Campinas, 1987, (Mestrado. Universidade Estadual de Campinas.)
- BOS, J. Induction and isolation of mutants in fungi at low mutagen doses. *Current Genetics*, Heidelberg, 12: 471-474, 1987.
- BOS, C.J.; DEBETS, A.J.M.; SWART, K.; GOOSEN, T.; VAN der BROCK, H.W.J. Genetics analysys and gene manipulation in the imperfect fungus *Aspergillus niger*. In: ALKO WORKSHOP ON MOLECULAR BIOLOGY OF FUNGI. Helsinki, 1989. *Proceedings of the EMBO*. Helsinki, NEVALAINEN, H.; PENTILLA, M. ed., 1989. p.21-30.
- BÜSCHL, R.; RINGSDORF, H.; ZIMMERMANN, U. Electric field-induced fusion of large liposomes from natural and polymerizable lipids. *FEBS Letter*, Amsterdam, 150:38-42, 1982.
- BUXTON, F.P.; GWYNE, D.I.; DAVIES, R.W. Transformation of *Aspergillus niger* using the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene*, Amsterdam, 37:207-214, 1985.
- CAHN, F.J. Citric acid fermentation on solid materials. *Industrial and Engineering Chemistry*, Washigton, 27: 201-203, 1935

- CALIL, M.R. Isolamento e análise genética de mutantes de *Aspergillus niger* com aumento na produção de amiloglicosidase. 1988. 108p. (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas)
- CHAND, P.K.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B.; COCKING, E.C. An improved procedure for protoplast fusion using polyethylene glycol. *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, 133:480-485, 1988.
- CHANG, L.T.; TERRY, C. Intergenic complementation of glucoamylase and citric acid production in two species of *Aspergillus*. *Journal of Bacteriology*, Washington, 25:890-895, 1973.
- CIEGLER, A.; RAPER, K.B. Application of heterokaryon of *Aspergillus* to commercial-type fermentation. *Applied Microbiology*, 5:106-110, 1957.
- CIMMERMAN, A.; LEGIŠA, M.; URBANC-BERČIČ, O.; BERBEROVIČ, R. Morphology of conidia of citric acid producing *Aspergillus niger* strains by scanning microscopy. *Biološki Vestnik*, Ljubljana, 30:23-32, 1982.
- CUTLER, A.J. & SALEEM, M. Permeabilizing soybean protoplasts to macromolecules using electroporation and hypotonic shock. *Plant Physiology*, Mariland, 81:24-28, 1987.
- DAS, A.; ROY, P. Improvement production of citric acid by a diploid strain of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Genetics*, Québec, 24:622-625, 1978.

DAS, A.; GHOS, H. Breeding by protoplast fusion for glucoamylase production. *Biotechnology Letters*, Kew, 10:705-708, 1989.

DAS, A.; GOKHALE, D.V.; PEBERDY, J.F. Protoplast fusion and genetic recombination in intra- and interstrain crossing in *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbiology and Technology*, Guilford, 4:2-5, 1989.

DEBETS, A.J.M.; SWART, K.; BOS, C.J. Mitotic mapping in linkage group V of *Aspergillus niger* based on selection of auxotrophic recombinantes by Novozym enrichment. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 1989.

DIAMIANI, M.; PEZZOTI, S.; ARCIONI, S. Electric field mediated fusion of protoplast of *Medicago sativa* L. and *Medicago arborea* L. *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, 132:474-479, 1988.

ESTERBAUER, H. Production of fermentable sugars from lignocellulosic raw materials by an enzymatic process. *Economic Bulletin for Europe*, Oxford, 38:123-129, 1986.

EVANS, G.S. A new crystal growing technique: The reciprocal of the thermodielectric effect. *Journal Chemical Society Faraday Transactions*, London, 1:2243, 1984.

FINAZ, G.; LEFEVRE, A.; TEISSIÉ, J. Electrofusion: A new highly efficient technique for generating somatic cell hybrids. *Experimental Cell Research*, Stockholm,

150:477-482, 1984.

FISH, N.; KARPA, A.; JONES, M.G.K. Production of somatic hybrids by electrofusion in *Solanum*. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 76:260-266, 1988.

GLASER, A. & DONATH, E. Influence of membrane modification on electrofusion of oat protoplasts. *Studia Biophysica*, Berlin, 119:93-96, 1987.

GOLDMAN, G.H. Estudos genéticos e produção de celulase em *Aspergillus niger*. 1988. 152p. (Mestrado - Esalq - Universidade de São Paulo).

GOMES, F.P. *Curso de Estatística Experimental*. 12 ed. Piracicaba, Editora Nobel S.A., 1987, 467p.

GOMORI, G. Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Methods in Enzymology*, New York, 1:139-146, 1955.

GOOSEN, T.; BLOEMHEUVEL, G.; GYSLER, L.; DE BIE, D.A.; VAN DER BROEK, H.W.J.; SWART, K. Transformation of *Aspergillus niger* using the homologous orotidine-5'-phosphate-decarboxylase gene. *Current Genetics*, Heidelberg, 11:499-503, 1987.

GUPLA, H.S.; RECH, E.L.; COCKING, E.C.; DAVEY, M.R. Electroporation and heat shock stimulate division of protoplasts of *Pennisetum squarulatum*. *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, 133:457-459, 1988.

GYLLENBERG, H.G. National biotechnology development and

- strategies. *Economic Bulletin for Europe*, Oxford, 38:161-166, 1986.
- HALFMANN, H.J.; EMEIS, C.L.; ZIMMERMANN, U. Electrofusion of haploid *Saccharomyces* yeast cells of identical mating type. *Archives of Microbiology*, Berlin , 134:1-4, 1983.
- HAMLYN, R.F.; BRADSHAW, R.E.; MELLON, F.M.; SANTIAGO, C.M.; WILSON, J.M.; PEBERDY, J.F. Efficient protoplast isolation from fungi commercial enzymes. *Enzyme Microbiology Technology*, Guilford, 3:321-325, 1981.
- HANG, Y.D.; WOODMAS, E.E. Effect of substrate moisture content on fungal production of citric acid in a solid state fermentation system. *Biotechnology Letters*, Kew, 9:183-186, 1987. HAYDU, Z.; LAZAR, G.; DUFITZ, D. Increased frequency of polyethylene glycol induced protoplast fusion by dimethylsulfoxide. *Plant Science Letters*, Amsterdam, 10:357-360, 1977.
- HASTIE, A.C. Benlate-induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature*, London, 226:771, 1970.
- HOLFMANN, G.A.; EVANS, G.A. Physical and biological aspects of cellular electromanipulation. 39p. BTX publish, San Diego, 1986.
- HOLZAPFEL, G.; VIENKEN, J.; ZIMMERMANN, U. Rotation of cells in an alternating electric field: theory and experimental proof. *Journal Membrane Biology*, New York , 67:13-26, 1982.

- KADISH, J.L.; WENG, K.M. Contamination of polyethylene glycol with aldehydes: Implications for hybridoma fusion. *Hybridoma*, New York, 2:87-89, 1983.
- KÄFER, E. High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, London, 186:619-620, 1960.
- KAMATA, Y.; NAGATA, T. Enrichment of heterokaryocytes between mesophyll and epidermis protoplasts by density gradient centrifugation after electric pulse. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 75:26-29, 1987.
- KAO, K.N. & MICHAYLUK, M.R. A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta*, Hidelberg, 115:335-337, 1974.
- KARSTEN, U.; STDLEY, P.; WALTHER, I.; PAPSDORF, G.; WEBER, S.; CONRAD, K.; PASTERNA, K.L.; KNOPP, J. Direct comparison of electric field-mediated and PEG-mediated cell fusion for the generation of antibody producing hybridomas. *Hybridoma*, New York, 7:627-633, 1988.
- KATENKAMP, U.; JACOB, H.; KERNS, G.; DALIHOW, E. Hybridization of *Trichoderma reesi* protoplasts by electrofusion. *Bioelectrochemistry Bioenergetics*, Lausanne, 22:57-67, 1989.
- KELLY, J.M.; HYNES, M.J. Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *Embo Journal*, Oxford, 4:475-479, 1985.

- KRIMURA, K.; NAKAJIMA, I.; LEE, S.P.; KWABE, S.; USAMI, S. Citric acid production by the diploid strains of *Aspergillus niger* obtained by protoplast fusion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, New York, 27:504-506, 1988.
- KOS, A.; KUIJENHOVEN, J.; WERNARS, K.; BOS, G.J.; VAN der BROEK, H.W.J.; POUWELS, P.H.; VAN den HONDEL, G.A.M.J.J. Isolation and characterization of the *Aspergillus niger trpC* gene. *Gene*, Amsterdam, 39:231-238, 1985.
- KUMAR, A. & COCKING, E. Protoplast fusion: A novel approach to organelle genetics in higher plants. *American Journal of Botany*, New York, 74:1289-1303, 1987.
- KUBICEK, C.P.; RÖHR, M. Novel trends in physiology and technology of citric acid production. In: KRUMPHANZL, V.; SIKYTA, B.; VANĚK, Z., ed. *Overproduction of Microbial Products*. New York, Academic Press, 1982. p.253-262.
- LEHNINGER, A.L. Biossíntese dos aminoácidos e de alguns derivados; o metabolismo do nitrogênio inorgânico.. *Bioquímica*. 2 Ed. São Paulo, Editora Edgard Blücher, 1976. vol. 2, cap. 25.
- LHOAS, P. Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with *para*-fluorophenylalanine. *Nature*, London, 190:726, 1961.

- LO, M.; TSONG, T.; CONRAD, M.; STRITTMATTERS, S.; HASTER, L.; SNYDER, S. Monoclonal antibody production by receptor-mediated electrically induced cell fusion. *Nature*, London, 310:792-794, 1985.
- LYNCH, P.T.; ISAAC, S.; COLLIN, H.A. Electrofusion of protoplast from celery (*Apium graveolens* L.) with protoplast from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Planta*, Hildelberg, 178:207-214, 1989.
- MARÁZ, A.; KISS, M.; FERENCZY, L. Protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae* strains of identical and opposite mating types. *FEMS Microbiology Letters* Amsterdam, 3:319-322, 1978.
- MASIERO, M. Parassexualidade e produção de amiloglicosidase em *Aspergillus niger*. 1988. 110p. (Tese de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas)
- MARTINEZ-BAZENET, C.; AUDIGIER-PETIT, C.; FROT-COUTAZ, J.; GOT, R.; NICOLAU, C.; LÉTOUBON, R. Protein-mediated fusion of liposomes with microsomal membranes of *Aspergillus niger*: evidence for a complex mechanism dealing with membranous and cytolitic fusogenic protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, New York, 963:35-42, 1988.
- MORIKAWA, H. ET ALI. Interspecific hybrid plant formation by electrofusion on *Nicotiana*. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 75:1-4, 1987.
- MORIKAWA, H.; ASSADA, M.; YAMADA, Y. Effects of physical

- parameters upon protoplasts electrofusion. *Plant Cell Physiology*, Tokio, 29:659-664, 1988.
- NAIROTTI, E.R. Produção de celulasas e fusão de protoplastos em *Humicola* sp. Piracicaba, 1988. 167p. (Doutorado - Esalq/Universidade de São Paulo)
- OHNISH, K.; CHIBA, J.; GOTO, Y.; TOKUNAGA, T. Improvement in the basic technology of electrofusion for generation of antibody-producing hybridomas. *Journal of Immunological Methods*, Amsterdam, 100:181-189, 1987.
- PEBERDY, J.F. Fungal protoplasts: Isolation, reversion and fusion. *Annual Review of Microbiology*, New York, 33:21-29, 1979.
- PODESTÁ, E.; SOLANO, A.; MOLINA, Y.; VEDIA, L.; PALADINI, A.; SÁNCHEZ, M. Production os steroid hormone and cyclic AMP in hybrids of adrenal and Leydig cells generated by electrofusion. *European Journal of Biochemistry*, Heidelberg, 145:329-332, 1984.
- POSTE, G. & ALLISON, A.C. Membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta*, New York, 300:421-465, 1973.
- PONTECORVO, G. Non-random distribution of mutiple mitotic crossing-over among nuclei of heterozygous diploid *Aspergillus*. *Nature*, London, 170:204-205, 1952.
- PONTECORVO, G. The parasexual cycle in fungi. *Annual Review of Microbiology*, Paolo Alto, 10:393-400, 1953.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A. Genetic analysis without.

sexual reproduction by means of polyploidy in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, London, 6:vii, 1952. Apud: Reports of the Proceedings of the Society for General Microbiology, Manchester, vii, 1951. (Resumo).

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; FORBES, E. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *Journal General Microbiology*, London, 8:198-210, 1953.

PONTECORVO, G.; KÄFER, E. Genetic analysis based on mitotic recombination. *Advances in Genetics*, New York, 9:71-104, 1958.

PRESCOTT, S.C.; DUNN, C.G. The citric acid fermentation. in: *Industrial Microbiology*. McGraw Hill Book Co. New York, 1959.

RECH, E.L.; OCHATT, S.J.; CAHAND, P.K.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Electro-enhancement of division of plant protoplast-derived cells. *Protoplasma*, Berlin, 141: 169-176, 1987.

RIBEIRO, J.C.

Anais da Academia Brasileira de Ciencias, 17:2-3, 1945.

RIBEIRO, J.C. On the thermo-dielectric effect. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, Rio de Janeiro, 22:325-348, 1950.

RIBEIRO, J.C. Electrofusion: A new phenomena observed in the phase changes of dielectrics under the influence of

- electric field. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, Rio de Janeiro, 26:349-355, 1959.
- RICHTER, H.; SCHEURICH, P.; ZIMMERMANN, U. Electric field-induced fusion of sea urchin eggs. *Development Growth and Differentiation*, Hiroshima, 23:479-486, 1981.
- ROPER, J.A. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, Basilea, 8:14-15, 1952.
- ROPER, J.A.; PRITCHARD, H. Recovery of complementary products of mitotic crossing over. *Nature*, London, 175:639, 1955.
- SALHANI, N.; SCHNABLE, H.; KUEPPERS, G.; ZIMMERMANN, U. The hydraulic conductivity as criterion for the membrane integrity of protoplasts fused by an electric field pulse. *Planta*, Hildelberg, 155: 140-145, 1982.
- SÁNCHEZ-MARROQUÍN, A.; CARREÑO, R.; LEDEZMA, M. Effect of trace elements on citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology*, New York, 20:888-892, 1970.
- SAUNDERS, J.A. Electrically induced fusion of cells and protoplasts. In: JONHN, J.B.S.; BERLIN, E.; JACKSON, P.C., ed. *Frontiers of membrane research in agriculture*. Totowa, Roeman & Allanheld, 1984. cap.10, p.147-156.
- SCHNETTLER, R.; ZIMMERMANN, U. Influence of the

composition of the fusion medium on the yeeld of electrofused yeast hybrids. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, 27:139-252, 1985.

SENDA, M.; TAKEDA, J.; ABE, S.; NAKAMURA, T. Induction of cell fusion of plant protoplast by electrical stimulation. *Plant & Cell Physiology*, Tokio, 20: 1441-1443, 1979.

SHU, P.; JOHNSON, M.J. Effect of the composition of the sporulation medium on citric acid production by *Aspergillus niger* in submerged culture. *Journal of Bacteriology*, New York, 54:165-167, 1947.

SIHACHARKR, D.; HAIRCOUR, R.; SERRAF, I.; BARRIENTOS, E.; HERBRETEAU, C.; DUCREAU, G.; ROSSOGNOL, L.; SOUVANNAVONG, U. Electrofusion for the production of somatic hybrids plants of *Solanum melongena* L. and *Solanum khasianum* C.B. Clark. *Plant Science (SHANNON)*, 57:215-224, 1988.

SMITH, H.H.; KAO, K.N.; COMBATTI, N.C. Interespecific hybridization by protoplast by protoplast fusion in *Nicotiana*. *Journal of Heredity*, Washington, 67:123-128, 1976.

SOLINGEN, P.; PLAAT, J.B. Fusion of yeast spheroplasts. *Journal of Bacteriology*, Washington, 136:946-947, 1977.

SONNENBERG, A.S.M.; WESSELS, J.G.A. Heterokaryon formation in the basidiomycete *Schizophyllum commune* by electrofusion of protoplast. *Theoretical and Applied*

Genetics, Berlin, 74:654-658, 1987.

SUKHAREU, S.I. On the role of intermembrane contact in cell electrofusion. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, Lausanne, 21:179-191, 1989.

SZCZORAK, J.; ILCZUK, Z, Effect of iron on the aconitate hydratase and synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Zbl Mikrobiolol*, , 140:567-574, 1985.

SZYMANSKI, A.; LABES, M.M. Influence of electric fields on the rate of growth of molecular solids. *Nature*, London, 220:159, 1968.

TAVARES, A.D. The Costa Ribeiro effect and allied phenomena. *Journal of Molecular Liquids*, Amsterdam, 39:171-194, 1988.

TEISSIÉ, J. & CONTE, P. Electrofusion of large volume of cells in culture. Part I. Anchorage-dependent strains. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, Lausanne, 19:49-57, 1988.

TEISSIÉ, J.; KNUTSON, V.; TSONO, T.; LANE, M. Electric pulse-induced fusion of 3T3 cells in monolayer culture. *Science*, Washington, 216:537-538, 1982.

TEISSIÉ, J. & ROLS, M.P. Electrofusion of large volume of cells in culture. Part II. Cells growing in suspension. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, Lausanne, 19:59-66, 1988.

TEMPELAAR, M. & JONES, M. Direct electrofusion between protoblasts with different responses in a mass fusion

system. *Plant Cell Reports*, Berlin, 4:92-95, 1985.

TOYAMA, N. Feasibility of sugar production from agricultural and urban cellulosic wastes with *Trichoderma viride* cellulase. *Biotechnology & Bioengineering Symposium*, New York, 6:207-219, 1976.

UPSHALL, A.; GIDDINGS, B.; MORTIMORE, I.P. The use of Benlate for distinguishing between haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus terreus*. *Journal of General Microbiology*, London, 100:413-418, 1977.

VAN DER HARTINGSUELDT, W.; MATTERN, I.E.; VAN ZEIJL, C.M.J.; POWELS, P.H.; VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. Development of homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the *pyrG* gene. *Molecular General Genetics*, Berlin, 206:71-75, 1987.

VIDMAR, S.; PURK, U.; KREGAR, I. Cellulolytic complex of *Aspergillus niger* under conditions for citric acid production. Isolation and characterization of two β -(1 $\rightarrow$ 4)glucan hydrolases. *Applied Microbiology and Biothechnology*, Berlin, 20:226-330, 1985.

VIENKEN, J.; GANSER, R.; HAMP, D.R.; ZIMMERMANN, U. Electric field-induced fusion of isolated vacuoles and protoplasts of different developmental and metabolic provenience. *Physiologica Plantarum*, Copenhagen, 53:64-70, 1981.

VIENKEN, J. & ZIMMERMANN, U. Electric-field induced

fusion: Electro-hydraulic procedure for production of heterokaryon cells in high fields. *Febbs Letters*, Amsterdam, 137(1):11-13, 1982.

WALLIN, A.; GLIMELIUS, K.; ERIKSSON, T. The induction of agregation and fusion of *Daucus carota* protoplast by polyethylene glicol. *Zeitung Pfan Zenphysiology*, Berlin, 74:64-80, 1974.

WALTON, P.D.; & BROWN, D.C.W. Electrofusion of protoplasts and heterokaryon survival in genus *Medicarp*o. *Plant Breeding*, Berlin, 101:137-142, 1982.

WARD, K.; WILSON, L.J.; CARMONA, C.L.; TURNER, G. The *oliC3* gene of *Aspergillus niger*. Isolation sequence and use as a selectable marker for transformation. *Current Genetics*, Heidelberg, 14:37-42, 1988.

WARWAR, V.; AZEVEDO, J.L. Genética eletrônica e sua aplicação em fungos filamentosos. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 16, Recife PE, 1989. Anais, Recife, Sociedade Brasileira de Genética, 1989 p.33.

WATAGAIN, G. Eletromagnetismo e óptica. Editora Universidade de Campinas, Campinas, 1975, 333p.

WEBER, H.; FÖSTER, W.; BERG, H. JACOB, H.E. Parasexual hybridization of yeast by electric field stimuleted fusion of protoplast. *Current Genetics*, Heidelberg, 4:165-166, 1981.

XU, D.; MADRID, L.P.; RÖHR, M; KUBICEK, C.P. The influence of type and combination of the carborn source

on production of citric acid by *Aspergillus niger*.
Applied Microbiology and Biotechnology, New York
30:553-558, 1989.

YOSHIOKA, H.; ANRAKU, S.I.; HAYASHIDA, S. Production and
 purification of a novel type of CMase from *Humicola*
grisea var. *thermoidea* YH-78. *Agriculture and*
Biological Chemistry, Tokio, 46:75-82, 1982.

ZIMMERMANN, U. Electric field-mediated fusion and related
 electrical phenomena. *Biochimica et Biophysica Acta*,
 New York, 694:227-277, 1982.

ZIMMERMANN, U.; PILWAT, G.; PÉQUEUX, A.; GILLES, R,
Journal Membrane Biology, New York , 54:103-113, 1980

ZIMMERMANN, U. & SCHEURICH, P. High frequency fusion of
 plant protoplast by electric fields. *Planta*,
 Hildelberg, 151:36-32, 1981.

ZIMMERMANN, U.; VIENKEN, J. Electric field-induced
 cell-to-cell fusion. *Journal of Membrane Biology*,
 New york, 67:165-182, 1982.

ZIMMERMAN, U.; VIENKEN, J.; HALFMANN, J.; EMEIS, C.C.
 Electrofusion: A novel hybridization technique.
Advances in Biological Process, New York , 4:79-90,
 1985.