***Phanerochaete chrysosporium*: MAPA GENÉTICO, EXPRESSÃO
HETERÓLOGA E PADRÃO DE TRANSCRIÇÃO DE GENES DE
CELULASE**

MARCELO AFONSO VALLIM
Biólogo

Orientadora: Profa. Dra. **ALINE A. PIZZIRANI-KLEINER**

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia, Área de
Concentração: Genética e Melhoramento de
Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 1997

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Vallim, Marcelo Afonso

Phanerochaete chrysosporium: mapa genético, expressão heteróloga e padrão de transcrição de genes de celulase / Marcelo Afonso Vallim. - - Piracicaba, 1997.
87 p.

Tese (doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.
Bibliografia.

1. Celulase 2. Celulose 3. Fungo celulolítico 4. Gene 5. Genética molecular 6. Mapeamento genético 7. Sacarificação I. Título

CDD 5

***Phanerochaete chrysosporium*: MAPA GENÉTICO, EXPRESSÃO
HETERÓLOGA E PADRÃO DE TRANSCRIÇÃO DE GENES DE
CELULASE**

MARCELO AFONSO VALLIM

Aprovada em: 12.12.1997

Comissão julgadora:

Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner	ESALQ/USP
Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira	ESALQ/USP
Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo	ESALQ/USP
Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona	FCB/UNESP
Profa. Dra. Marisa Veira de Queiroz	CCB/UFV

Profa. Dra. ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER
orientadora

Dedico

Aos meus pais, e
irmãos

Ofereço

À minha dedicada
esposa

Agradecimento Especial

À Renata C. Pascon, por todo o seu apoio, paciência e compreensão durante este tempo difícil, o que espero poder retribuir.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner por sua orientação, apoio e amizade durante toda a minha pós-graduação.

To Dr. Daniel Cullen, USDA, Forest Products Laboratory, Madison, WI for his commitment to me and my Ph.D. and his precious advisement, comments and suggestions during the development of this work.

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo a sua contribuição para minha formação

To Jill Gaskell, USDA, Forest Products Laboratory, Madison, WI for her help with my research and also for her friendship.

Ao José Antonio Silva por sua amizade ,colaboração e confiança.

À minha família pelo apoio que sempre me deram.

Aos colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos, Wellington Araújo, Margarete Nadalin, Rosemeire Bueno, Luciana Ribeiro, Luciana Regitano, André Lima, João Pamphile, Carlos Aguilar, Chirlei Glinke, Gilda Mühlen, pela alegre e inesquecível convivência.

Aos corpo docente do Departamento de Genética o meu muito obrigado por sua calaborar em minha formação.

Aos colegas do Departamento de Genética pelo companheirismo durante “estes muitos” anos.

À Carmen M.S.F. Pilotto por sua ajuda e preciosa amizade durante estes anos.

À Candica Vandeléia de Oliveira, Silvana M. Gregório e Aparecida Elizabeth Silva por toda a ajuda e amizade durante meu curso de pós-graduação.

Aos queridos amigos Mônica Rosa Bertão, Salete Gaziola, Adriana C. Longo, Marisa V. Queiroz, Silvia M. G. Molina, Nirlei A. Silva, Vanessa M. Pedro, Eloisa Peres, João Henrique Kanan, Claudio Martinez, minha imensa saudade.

To my dearest friends from USDA - Forest Products Laboratory, Madison, WI, Bernard Jansen, Thomas Johansson, Phillip Stewart, Amber Wymelenberg and many others, my greatful thanks for the nice time I had joining you for research and friendship.

Ao CNPq por financiar minha bolsa de doutorado no país e bolsa “sandwich” em Madison, WI, USA.

Ao Conselho Britânico pela bolsa de treinamento na Universidade de Nottingham, sob a orientação do Prof. Dr. John F. Peberdy.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE ABRAVIAÇÕES.....	xvii
RESUMO.....	xviii
SUMMARY.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 - Considerações gerais sobre <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	4
2.2 - Microrganismos celulolíticos.....	5
2.3- Enzimas celulolíticas.....	7
2.3.1 - Modo de ação.....	7
2.3.2 - Mecanismos de indução e repressão enzimática.....	9
2.4 - Celulases em <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	11
2.5 - Organização Genômica de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	15
2.6 - Amplificação de mRNA de genes de <i>P. chrysosporium</i> via RT-PCR seguido de quantificação baseada em “competitive template”	23
2.7 - Expressão heteróloga de celulases em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : considerações gerais.....	27

3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 - Linhagens de Fungo e Bactéria.....	30
3.1.1 - Fungo.....	30
3.1.2 - Bactéria.....	30
3.1.3 - Plasmídios.....	30
3.2 - Meios.....	31
3.2.1 - LB (Luria-Bertani).....	31
3.2.2 - Extrato de Malte.....	31
3.2.3 - YPD.....	31
3.2.4 - Meio mínimo para Levedura.....	32
3.3 - Soluções e Tampões.....	32
3.3.1 - TE (Tris-HCl-EDTA).....	32
3.3.2 - TBE 10X (Tris, Borato e EDTA).....	32
3.3.3 - SSC 20X.....	32
3.3.4 - SSPE 20X.....	33
3.3.5 - TAE 50X (Tris-acetato).....	33
3.3.6 - Tampão MOPS 10X para “Northern Blot”.....	33
3.3.7 - Tampão de amostra para RNA.....	33
3.3.8 - Tampão LETS.....	34
3.3.9 - Tampão de amostra para DNA.....	34
3.3.10 - Tampão de extração de mRNA poliA de lascas de madeira(“binding buffer”).....	34
3.3.11 - Tampão de lavagem para Dynabeads OLIGO (Dt) ₂₅ Kit (Dynal, Inc).....	34
3.3.12 - Tampão de Lise para levedura.....	34
3.3.13 - Solução de fenol estabilizada.....	35
3.3.14 - Solução estoque de RNase.....	35

3.3.15 - Solução X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactoside).....	35
3.3.16- Solução de Brometo de etídeo.....	35
3.3.17 - Solução para extração de DNA cromossomal de fungos filamentos.....	36
3.3.18 - Solução para extração de DNA cromossomal de fungos filamentos crescido em placas de Petri.....	36
3.3.19 - Soluções para extração de DNA plasmidial.....	36
3.3.19.1 - Solução I.....	36
3.3.19.2 - Solução II.....	36
3.3.19.3 - Solução III.....	37
3.3.20 - Soluções de hibridização.....	37
3.3.20.1 - Solução de Pré-hibridização para Oligonucleotídeos.....	37
3.3.20.2 - Solução de Hibridização para Oligonucleotídeo.....	37
3.3.21 - Solução de Denhardt 50X.....	37
3.3.22 - Solução de Hibridização para “Northern Blot”.....	38
3.3.23 - Solução de Requerimentos Nutricionais 10 X.....	38
3.3.24 - “Plate mix”.....	39
3.4 - Atividade celulolíticas em placas.....	39
3.5 - Extração de DNA cromossomal de fungo filamentoso.....	40
3.6 - Extração de DNA cromossomal de fungo filamentoso crescido em placa de Petri.....	41
3.7 - Extração de mRNA poliA de lascas de madeira (Aspen).....	42
3.8 - Extração de DNA plasmidial.....	43
3.9 - Transformação de levedura (KAISER <i>et al.</i> , 1994).....	44
3.10 - Extração de plasmídeo de levedura para transformação de <i>E.</i>	

<i>coli</i> (KAISER <i>et al.</i> , 1994).....	45
3.11 - Extrato de Proteína a partir de células de levedura (KAISER <i>et al.</i> , 1994).....	46
3.12 - Isolamento de RNA de levedura (KAISER <i>et al.</i> , 1994).....	47
3.13 - Digestão com enzimas de restrição.....	48
3.14 - Técnica de "Southern Blot".....	48
3.15 - Técnica de "Northern Blot".....	49
3.16 - Hibridização.....	49
3.16.1 - Hibridização para "Southern Blot".....	49
3.16.2 - Hibridização para "Northern Blot".....	50
3.17 - Reação de marcação da sonda de oligonucleotídeo.....	51
3.18 - Reação de sequenciamento automático.....	52
3.19 - Amplificação de DNA através da técnica de PCR (polymerase chain reaction).....	52
3.19.1 - PCR para mapeamento.....	52
3.19.2 - PCR para amplificação de <i>cbh1-1</i> com <i>pfu</i> polimerase.....	53
3.19.3 - PCR para preparação dos "competitive templates".....	53
3.19.4 - PCR para amplificação de cDNA e "competitive template".....	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1 - Mapeamento de genes em <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	60
4.2 - Quantificação da transcrição de genes codificando para celobiohidrolases e celobiose desidrogenase em lascas de madeira.....	67
4.3 - Clonagem e expressão do gene <i>cbh1-1</i> de <i>P. chrysosporium</i> em <i>S. cerevisiae</i>	77

5. CONCLUSÕES.....	84
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Mapa genético e físico atualizado de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> . Barra na lateral esquerda representa os tamanhos moleculares estimados em Mb; pares de cromossomos dimórficos são representados pelo mesmo padrão de cor. Setas bidirecionais pretas representam distâncias gênicas. Setas bidirecionais verdes representam as distâncias em kilobase determinada pela técnica de "chromosome walking". (Figura reproduzida sob permissão de Dr. Daniel Cullen, USDA, Forest Products Laboratory, Madison, WI).....	22
2. "Southern Blot" mostrando diferenciação alélica para <i>cbh1-4</i> . Basidiosporos 14 a 15 e 19 e, a linhagem parental <i>Phanerochaete chrysosporium</i> BKM-F-1767 foram amplificados (via PCR) com "primers" específicos para <i>cbh1-4</i> (Tabela 5). Com o sequenciamento dos produtos de PCR foi possível desenhar dois oligonucleotídeos alelo-específicos (porção inferior da figura) que foram utilizados como sondas. Letras em negrito representam diferenças alélicas.....	64
3. Variação da transcrição dos genes codificando para CBH I de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> de acordo com o período de cultivo em lascas de madeira. No eixo Y, a concentração é dada em picogramas. Nota-se a prevalência dos transcritos de <i>cbh1-5</i> a partir da 4ª semana sobre os demais transcritos, seguido por <i>cbh1-3</i> , <i>cbh1-1</i> e <i>cbh1-4</i> respectivamente.....	74

4. Gráfico mostrando a variação da transcrição do gene que codifica para CBH II de *Phanerochaete chrysosporium* no período de 10 semanas de cultivo em lascas de madeira. No eixo Y, a concentração é dada em picogramas..... 75
5. Variação da transcrição do gene que codifica para CDH de *Phanerochaete chrysosporium* no período de 10 semanas de cultivo em lascas de madeira. No eixo Y, a concentração é dada em picogramas. Nota-se o pico da transcrição ocorrendo na quarta semana..... 75
6. Painel mostrando o padrão de transcrição de *cbh1-1*, *cbh1-3*, *cbh1-4*, *cbh1-5*, *cbh2* e *cdh* após a quarta semana. Números à esquerda indicam tamanho molecular, em pares de bases, do produto de PCR para o "competitive template" (superior) e do transcrito (inferior). Números na parte de baixo indicam quantidade em picogramas de "competitive template" adicionada em cada reação de amplificação..... 76
7. "Northern Blot" mostrando resultado da hibridização com a sequência de cDNA de *cbh1-1* (1,4 Kb) e o gene de GAPDH (980 bp) contra RNA total. Poços 1 a 6, clones que foram transformados com pCBH1-1; poço 7, clone transformado com pCBH; poço 8, linhagem Y294 de levedura. Nota-se que a banda referente a GAPDH está presente em todos os poços. A banda relativa ao transcrito de *cbh1-1* é observada apenas nos poços de 1 a 6..... 83

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Descrição das condições da reação para amplificação por PCR, empregadas como padrão no presente trabalho.....	55
2. Descrição das condições de reação para amplificação por PCR utilizando a enzima <i>pfu</i> polimerase, empregada para amplificação do gene <i>cbh1-1</i> de <i>P. chrysosporium</i>	56
3. Descrição das condições de reação para transcrição reversa.....	56
4. Oligonucleotídeos empregados para amplificação de sequências genômicas e cDNA por PCR	57
5. Oligonucleotídeos empregados para amplificação gênica para o mapeamento genético.....	58
6. Oligonucleotídeos empregados como sonda para diferenciação alélica de genes no mapeamento genético. Negritos representam diferenças alélicas.....	59
7. Frequência de recombinação (%) entre genes de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> . Valores em parênteses representam o número de indivíduos analisados.....	65
8. Dados mostrando as frequências de recombinação (%) entre o gene de <i>β-tubulina</i> e os genes de lignases (<i>lip</i>) e, <i>β-tubulina</i> e elementos transponíveis (Pce). Valores entre parênteses representam o número de indivíduos analisados.....	66
9. Segregação de alguns genes de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> . Valores de χ^2 para segregação dos alelos ao nível de 5% (*) para 1 grau de liberdade. Valores não significativos são representados por ns. Genes cuja segregação de seus alelos foi de 1:1 não estão incluídos nesta tabela.....	67

10. Concentração em picogramas (pg) dos transcritos de genes codificando para CBH I de *Phanerochaete chrysosporium* após cultivo por diferentes intervalos de tempo em lascas de madeira. Não foi observado transcrição para *cbh1-2* e *cbh1-6*..... 73

11. Concentração em picogramas (pg) dos transcritos de genes que codificam para CBH II e CDH de *Phanerochaete chrysosporium* após cultivo por diferentes intervalos de tempo em lascas de madeira..... 74

12. Oligonucleotídeos empregados como “primers” para amplificação de *cbh1-1* (linhas 1 e 2) e, oligonucleotídeo empregado para sequenciamento da junção *cbh1-1* e PGKt (linha 3). Sequências (sublinhadas representam o sítio de *EcoRI*. Codons em negrito representam codon de iniciação (linha 1) e codon de terminalização (linha 2)..... 82

LISTA DE ABREVIações

aad - aril-álcool desidrogenase

α - tipo sexual alfa

bp - pares de bases

cbh - celobiohidrolase

cdh - celobiose desidrogenase

gapdh - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

glx - glioxal oxidase

h4.2 - histona

his - histidina

hsp - "heat shock protein"

Kb - 10^3 pares de bases

leu - leucina

lip - lignina peroxidase

Mb - 10^6 pares de bases

mp - lignina peroxidase dependente de manganês

Pce - elemento transponível ("transposon like element")

trp - triptofano

ura - uracila

w - selvagem

***Phanerochaete chrysosporium*: MAPEAMENTO GENÉTICO, EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PADRÃO DE TRANSCRIÇÃO DE GENES DE CELULASE**

Autor: Marcelo Afonso Vallim

Orientadora: Profa. Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner

RESUMO

O fungo *Phanerochaete chrysosporium* é conhecido por sua capacidade de degradar lignina e celulose. Entretanto, não se tem muito conhecimento a respeito da genética deste fungo, bem como da expressão de seus genes codificando para celulasas, o que possibilitaria a construção de linhagens as quais podem ser empregadas em bioprocessos como delignificação e sacarificação da celulose. Neste trabalho, 13 novos genes foram mapeados. Foi determinada a ligação entre *cbh1-5* e *aad* (3,38 unidades mapa). O resultado do mapeamento genético associado ao mapeamento físico pela separação de cromossomos e hibridização, possibilitará a ampliação do mapa já existente. Seis genes distintos codificando para celobiohidrolase I (CBH I) foram isolados e caracterizados em *P. chrysosporium*, mas seus produtos enzimáticos não são conhecidos. Também neste trabalho, o gene *cbh1-1* foi expresso em levedura. Entretanto, nenhuma atividade enzimática pôde ser detectada para este gene, bem como para o controle positivo *cbh1-4*. O padrão de transcrição de seis genes codificando para CBH I, um para CBH II e um para CDH foi determinado quando *P. chrysosporium* foi cultivado em lascas de madeira. Este padrão de transcrição difere do previamente descrito, quando este fungo está crescendo em meio de cultura definido, suplementado com celulose. Isto sugere que a transcrição de diferentes *cbhs* é regulada de acordo com o substrato presente no meio de cultura.

***Phanerochaete chrysosporium*: GENETIC MAPPING, HETEROLOGOUS EXPRESSION AND TRANSCRIPTION PATTERN OF CELLULASE GENES**

Author: Marcelo A. Vallim

Supervisor: Dr. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

SUMMARY

The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* is well known for its ability to degrade lignin-cellulose substrate. However, not much is known about its genetics and cellulase gene expression, that would allow the construction of strains which can be employed in bioprocess such as biopulping and cellulose saccharification. This work presents the genetic mapping results for 13 new genes. These results when associated with physic mapping by chromosome separation and hybridization will amplify the already existing genetic map. A significant linkage was determined between *cbh1-5* and *aad* (3,38 map units). Six genes coding for cellobiohydrolase I (CBH I) were isolated, nevertheless their enzymatic product are not known. This work also presents the attempt to express *cbh1-1* in *Saccharomyces cerevisiae*. However, no enzymatic activity was observed for this gene, as well as for the positive control *cbh1-4*. The transcription pattern of six genes coding for CBH I, one for CBH II and one for CDH was determined when *P. chrysosporium* is growing on wood chips. The transcription pattern found here is different from the previously determined when this same fungus is growing on defined media supplemented with cellulose. This finding suggests that differential *cbhs* transcription is depending upon the substrate type.

1. INTRODUÇÃO

O basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* é conhecido por sua habilidade em degradar substratos contendo lignina e celulose. Esta característica o torna uma espécie interessante de fungo com grande potencial para ser empregado em processos biotecnológicos, como a sacarificação da celulose, com posterior utilização na fermentação alcoólica e, também, ser empregado em processos de bio-delignificação da madeira para obtenção da celulose para indústrias de papel.

Genes relacionados ao complexo lignino-celulolítico de *P. chrysosporium* foram isolados e caracterizados. Entretanto, a genética clássica neste fungo é limitada em função da dificuldade da obtenção de mutantes pois o mesmo produz esporos binucleados e esporos assexuais multinucleados. Estudos de mapeamento genético e físico só se tornaram possíveis com o emprego de marcadores moleculares e separação de cromossomos. No entanto, poucos marcadores foram empregados em função da não disponibilidade dos mesmos, dificultando a obtenção de linhagens melhoradas via cruzamento ou mesmo por fusão de protoplastos. Associado a esta

limitação, tem se ainda, tanto para as celulases como para as ligninases, a ocorrência de multiplicidade gênica, o que dificulta acessar a atividade específica de cada produto. Como exemplo, podem ser citados seis genes que codificam celobiohidrolase I (CBH I) e um outro gene que codifica CBH II (SIMS *et al.*, 1988; COVERT *et al.*, 1992a,b; TEMPELAARS *et al.*, 1994).

A existência de múltiplos genes que codificam para celobiohidrolase I associada à falta de anticorpos específicos para estas enzimas, tem impossibilitado os estudos da expressão e regulação destes genes. Mais recentemente, um sistema de expressão heteróloga das CBHs foi desenvolvido em *Saccharomyces cerevisiae* (RENSBURG *et al.*, 1996), abrindo perspectivas para o estudo individualizado destes genes. Além disto, metodologias para a determinação quantitativa da transcrição destes genes em diferentes substratos, como a adaptada por COVERT *et al.* (1992a) e VANDEN WYMELENBERG *et al.* (1993), que empregaram meio definido, suplementado com celulose, podem evidenciar a transcrição de diferentes celulases.

Em vista do quadro atual em que se encontra o estudo deste assunto e diante da necessidade da construção de linhagens que atendam aos interesses biotecnológicos, se faz necessária a ampliação do mapa genético, assim como a compreensão individualizada da atividade das enzimas celulolíticas produzidas por este fungo, bem como a especificidade das mesmas ao substrato. A obtenção conjunta destas informações poderá

contribuir no futuro para a construção de linhagens que poderão ser moduladas de acordo com os processos biotecnológicos onde serão empregadas.

Assim, o presente trabalho foi desenvolvido objetivando: ampliar o mapa genético de *P. chrysosporium*, traçar o padrão de transcrição para as *cbhs* e *cdh* no substrato natural lascas de madeira e verificar a eficiência de um vetor de expressão de *cbhs* em *S. cerevisiae*.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Considerações gerais sobre *Phanerochaete chrysosporium*

O nome *Phanerochaete chrysosporium* foi proposto por BURDSALL JUNIOR & ESLYN (1974) para a forma teleomórfica de *Sporotrichum pulverulentum* Novobranova. O nome proposto não foi aceito e várias publicações foram realizadas utilizando o nome anamórfico (BURDSALL-JUNIOR, 1981). Em 1978 STALPERS, afirmou ser *S. pulverulentum* a forma anamórfica de *P. chrysosporium*.

Trabalhos realizados demonstraram que *P. chrysosporium* e *S. pulverulentum* têm o mesmo padrão de degradação da madeira. As variações observadas entre eles não foram diferentes dos encontrados entre isolados da mesma espécie (ROSENBERG, 1978).

BURDSALL JUNIOR (1981) observou que um isolado de *S. pulverulentum* é capaz de produzir o teleomorfo *P. chrysosporium* quando crescido em meio de cultura contendo ácido gálico.

RAEDER *et al.* (1989), utilizaram a técnica de RFLP para comparar *S. pulverulentum* e *P. chrysosporium*. Foi verificado que as duas espécies são muito similares. Estes resultados, portanto, confirmaram a classificação taxonômica de

BURDSALL & ESLYN (1974), onde esses dois fungos são relacionados os estágios anamórficos e teleomórficos, respectivamente.

P.chrysosporium é encontrado no solo, crescendo em madeira em decomposição. Seu substrato natural está definido como sendo ligninocelulose. Este fungo apresenta um complexo ligninolítico constituído de pelo menos 10 genes codificando para ligninases (GASKELL *et al.*, 1994) e três codificando para lignino-peroxidase dependente de manganês (PEASE *et al.*, 1989; PRIBNOW *et al.*, 1989; ORTH *et al.*, 1994). O complexo celulolítico compreende sete genes codificando para celobiohidrolase (SIMS *et al.*, 1988; COVERT *et al.*, 1992a,b; TEMPELAARS *et al.*, 1994). Embora cinco enzimas com atividade de endoglucanase e duas com atividade de β -glucosidases tenham sido isoladas (ERIKSSON & PETTERSSON, 1975a, DESHPANDE *et al.*, 1978), nenhum gene que codifique para estas enzimas foi detectado. Recentemente uma outra enzima, celobiose desidrogenase, está sendo relacionada com a degradação da celulose, pois seus níveis de expressão aumentam quando o fungo está crescendo em meio contendo celulose como única fonte de carbono (RAICES *et al.*, 1995).

2.2 - Microrganismos celulolíticos

A celulose é de longe a mais abundante fonte renovável de carboidrato com uma síntese anual de 4×10^7 toneladas por ano (KUBICEK, 1992), sendo a forma preferencial pela qual a energia solar captada pela fotossíntese é

armazenada (SANDHU & SIDHU, 1985; SANDHU & SIDHU, 1986).

A celulose é um homopolímero linear de glicosídeos ligados na posição β -1,4, de aproximadamente 8000 a 12000 unidades de glicose, os quais são mantidos juntos por pontes de hidrogênio formando uma unidade cristalina (BROWN JUNIOR, 1982). Esta estrutura pode ser convertida em glicose a qual poderá ser empregada em outros processos tais como alimentação, fermentação alcoólica, entre outros (SANDHU & SIDHU, 1985; ACEBAL *et al.*, 1988b; ELLISTON *et al.*, 1991; FOWLER, 1993).

A degradação da celulose em subunidades de glicose pode ser feita por animais bem como por microrganismos. A hidrólise da celulose via ação microbiana é a principal forma de tal conversão, sendo portanto, um dos mais importantes processos na natureza (ERIKSSON & WOOD, 1985).

Vários microrganismos têm sido descritos capazes de realizar esta degradação. Entre eles podemos citar o fungo deuteromiceto *Trichoderma*, o basidiomiceto *Phanerochaete*, a bactéria *Clotridium thermocellum*, entre muitos outros. Dentro do gênero *Trichoderma*, várias espécies têm sido pesquisadas, destacando-se *T. reesei* que tem sido amplamente estudada e a partir da qual grande compreensão sobre o complexo celulolítico tem sido obtido. A bactéria *C. thermocellum* também tem contribuído para o entendimento do complexo celulolítico, embora tenham sido encontradas algumas dificuldades no isolamento e caracterização de suas enzimas celulolíticas, (ERIKSSON & WOOD, 1985;

ELLISTON *et al.*, 1991; MORAG *et al.*, 1991). O fungo *P. chrysosporium*, tem contribuído não só para o estudo do sistema celulítico mas também para o entendimento do complexo ligninolítico. Este fungo, geralmente, é caracterizado como modelo para degradação de ligninocelulose.

2.3 - Enzimas celulolíticas

2.3.1 - Modo de ação

A degradação da celulose cristalina é um processo complexo. Para o gênero *Trichoderma*, três grupos de enzimas celulolíticas foram descritas como sendo necessárias para a sacarificação da celulose: endoglucanases, celobiohidrolases e β -glucosidase (SIDHU & SANDHU, 1984; KOLAR *et al.*, 1985; SIDHU & SANDHU, 1985; CHIRICO & BROWN JUNIOR, 1987; ACEBAL *et al.*, 1988a,b; HOFER *et al.*, 1989).

Estas enzimas celulolíticas, as celulases, são altamente específicas na catálise das pontes de glicosídeos β -1,4 na celulose cristalina, celodextrinas solúveis e alguns derivados como carboximentil cellulose (CMC), hidroxietil cellulose (HEC) e glicosídeos cromofóricos de celodextrinas (ENARI *et al.*, 1987).

Inicialmente, estas celulases foram classificadas em C₁ e C_x (REESE *et al.* (1950), citado por COUGHLAN, 1985), na tentativa de obter uma melhor compreensão de sua ação sobre a celulose. Os componentes do grupo C₁ seriam responsáveis pela formação de cadeias curtas e lineares a partir da celulose

cristalina. As cadeias geradas por C_1 seriam então hidrolisadas por C_x , a qual também seria capaz de hidrolisar derivados solúveis de celulose. Desta forma, C_1 foi considerada como sendo um fator pré-hidrolítico. Postulou-se que microrganismos celulolíticos verdadeiros são aqueles possuidores do sistema " C_1 - C_x ". Posteriormente, vários outros sistemas foram sugeridos na tentativa de melhor elucidar esta hipótese (ERIKSSON & WOOD, 1985).

O modelo atualmente mais aceito para a degradação da celulose compreende 3 grupos de enzimas, 1) Endoglucanases (E.C.3.2.1.4. - EG, endo-1,4- β -D-glucan glucanase), as quais atacam ao acaso regiões amórficas de celulose clivando ligações β -1,4; 2) Celobiohidrolases (E.C.3.2.1.91 - CBH, exo-1,4- β -D-glucan celobiohidrolase), as quais liberam celobiose a partir das extremidades não reduzidas das cadeias de celulose; 3) β -glucosidase (E.C.3.2.1.21) que hidrolisa celobiose e celodextrinas em glicose (HENRISSAT *et al.*, 19985, BÉGUIN, 1990).

Uma quarta enzima, celobiose desidrogenase (CDH), tem sido, ultimamente, relacionada com a degradação de celulose. Esta enzima é uma oxidase e o seu papel na degradação da celulose seria de oxidar celobiose e assim evitar que o acúmulo deste subproduto iniba as celobiohidrolases (WESTERMARK & ERIKSSON, 1974; RAICES *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1997).

Sinergismo entre CBHs e EGs tem sido reportado, mas a forma como tal evento ocorre não foi ainda determinado (BÉGUIN, 1990). Sinergismo entre CDH e

as outras celulasas foi recentemente observado (BAO & RENGANATHAN, 1992).

Em bactérias, o complexo celulolítico apresenta, como em *T. reesei*, os três grupos de celulasas. As celulasas podem estar livres, como em *Thermotoga* sp (RUTTERSMITH & DANIEL, 1991), ou associadas em um complexo chamado celulosoma como em *C. thermocellum* (MORAG *et al.*, 1991). Em ambos os casos, a degradação da celulose cristalina leva à formação de celobiose a qual pela presença da β -glucosidase é convertida em glicose. Também para bactérias, o acúmulo de celobiose é inibidor para as celobiohidrolases (JOHNSON *et al.*, 1982).

O complexo celulolítico de *P. chrysosporium* será discutido com mais detalhe nos próximos itens.

2.3.2 - Mecanismos de indução e repressão enzimática

O mecanismo pelo qual a biossíntese das celulasas ocorre tem sido foco de pesquisas desde os anos 80 (SZAKMARY *et al.*, 1991). As enzimas celulolíticas são induzidas por celulose, soforose e celobiono-sigma-1,5-lactone (MISHRA *et al.*, 1989; GOMES *et al.*, 1992). Acredita-se que a celulose por si só não induza a biossíntese de celulasas em virtude desta ser uma molécula extremamente grande e, portanto, incapaz de transpor a parede celular e/ou a membrana plasmática (KUBICEK, 1992). Acredita-se que o produto da degradação da celulose e/ou da soforose é que irá atuar na síntese das celulasas (GRITZALI & BROWN JUNIOR,

1979).

A indução das celulasas ocorre intensamente quando soforose ou celobiono-sigma-1,5-lactone são adicionados ao meio e o micélio é crescido sem aeração (STENBERG & MANDELS, 1979). Estes dois componentes foram verificados em filtrados de cultura onde o micélio foi crescido com celulose como única fonte de carbono (VAHERI, 1982). Porém, não atuam na indução de β -glucosidase pois não servem como substrato à ela (STAZMARY *et al*, 1991).

Conídios de *T. reesei*, crescidos em meio com celulose como única fonte de carbono, sofrem indução das enzimas celulolíticas devido a presença prévia de endoglucanase e β -glucosidase ligadas respectivamente à parede celular e membrana plasmática. A primeira degrada a celulose cristalina liberando cadeias pequenas de celodextrinas que irão formar o "indutor verdadeiro" por sua quebra pela β -glucosidase. A natureza deste "indutor verdadeiro" está para ser determinada (UMILE & KUBICEK, 1986; KUBICEK, 1987).

Em *P. chrysosporium*, celobiose desidrogenase (CDH) é presente abundantemente em meio de cultura contendo celulose como fonte única de carbono (BAO *et al.*, 1994). Experimentos de indução utilizando celulose, celobiose e glicose como únicas fontes de carbono revelaram que celulose, ou algum subproduto de sua degradação, atuam como indutor, pois transcrito de *cdh*, pode ser verificado. Embora a celobiose seja oxidada por CDH, nenhum transcrito deste gene foi observado quando este substrato foi utilizado como única fonte de

carbono. Glicose, assim como para as demais celulases, parece agir como inibidor, pois quando empregada como fonte única de carbono, não são detectados transcritos (LI *et al.*, 1996).

2.4 - Celulases em *Phanerochaete chrysosporium*

P. chrysosporium degrada celulose extensivamente pela produção de endoglucanase, celobiohidrolase e β -glucosidase ERIKSSON & PETTERSSON, 1988). Embora tenha sido descrito o isolamento das enzimas endoglucanases (EG), celobiohidrolases (CBH) e β -glucosidase (ERIKSSON & PETTERSSON, 1975a; 1975b; DESHPANDE *et al.*, 1978), apenas genes relacionados à celobiohidrolases (CBH) foram isolados. É muito provável que *P. chrysosporium* não codifique para EG1 (COVERT *et al.*, 1992a; BRODA *et al.*, 1994). Celobiose desidrogenase (CDH) tem sido relacionada com a degradação de celulose e, portanto, classificada como celulase (RAICES, *et al.*, 1995, LI *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1997).

Segundo ERIKSSON & PETTERSSON (1988), o sistema celulolítico de *P. chrysosporium*, assim como de *T. reesei*, é induzido por celulose e seus derivados tais como, celobiose, soforose e carboxymethyl celulose e, este complexo é reprimido catabolicamente por glicose.

Genes relacionados ao grupo das celobiohidrolases (CBH) de *P. chrysosporium*, que apresentam alta similaridade a *cbh1* e *cbh2* de *T. reesei* foram isolados e caracterizados. Eles são denominados respectivamente *cbh1-1* a *cbh1-*

6 (SIMS *et al*, 1988; COVERT *et al*, 1992a,b) e *cbh2* (TEMPELAARS *et al.*, 1994).

Os genes *cbh1-1*, *cbh1-2* e *cbh1-3* estão organizados dentro de uma região de 20 kb no maior cromossomo dimórfico de *P. chrysosporium* (COVERT, *et al.*, 1992a). Os outros *cbh1-* estão espalhados pelo genoma (COVERT *et al*, 1992b). *cbh1-4* e *cbh1-5* localizam-se fisicamente no mesmo cromossomo e dados de mapeamento genético, apresentado neste trabalho, mostram que a ligação entre esses dois genes é de 32,81 unidades mapa.

UZCATEGUI *et al* (1991a), isolaram três enzimas relacionadas à celobiohidrolases (CBHI, CBH62 e CBH50). A comparação entre as sequências de amino-ácidos destas proteínas e as sequências preditas para o produto gênico das *cbhs* aponta que, provavelmente, CBHI seja codificada por *cbh1-4*, CBH62 por *cbh1-3* e, CBH50 por *cbh2* (UZCATEGUI *et al.*, 1991a; COVERT *et al.*, 1992b, TEMPELAARS *et al.*, 1994). A enzima predominantemente observada no trabalho realizado por UZCATEGUI *et al.* (1991a) foi CBHI, seguida por CBH62 e CBH 50, respectivamente. COVERT *et al.* (1992a), utilizando meio definido suplementado com celulose ou glicose, observou que *cbh1-1* e *cbh1-2* são transcritos constitutivamente em baixos níveis. VANDEN WYMELENBERG *et al.* (1993), empregando as mesmas condições de cultivo empregadas por COVERT *et al.* (1992a) mostraram que 0,5 ng de transcrito de *cbh1-4* está presente, seguido por *cbh1-6* (0,05 ng), *cbh1-5* (0,02 ng) e *cbh1-3* (0,01 ng), respectivamente. Estes dados estão em concordância com os dados obtidos por UZCATEGUI *et al.*

(1991a), cujo produto de *cbh1-4* é predominante. Nenhum estudo quantitativo com *cbh2* e *cdh* foi até o momento reportado.

COVERT *et al* (1992a) e BRODA *et al* (1994) acreditam que *P. chrysosporium* não possui genes que codificam para as endoglucanases, embora ERIKSSON & PETTERSSON (1975a) descreveram o isolamento de cinco enzimas que atuam como endoglucanases. UZCATEGUI *et al* (1991a) isolaram uma celobiohidrolase (CBH62) que apresentou o comportamento semelhante à endoglucanase, observando que CBHI e CBH62 atuam sinergisticamente na degradação de celulose, atacando-a de modo diferente.

A enzima β -glucosidase em *P. chrysosporium* não tem sido amplamente estudada como as ligninases e, em última análise, como as outras celulases. DESHPANDE *et al* (1978), estudando a atividade da β -glucosidase da forma imperfeita *Sporotrichum pulverulentum*, evidenciaram a formação de três bandas em ensaios isoenzimáticos. Foi sugerido que o aparecimento destas bandas se deu em função de atividade proteolítica.

A celobiose desidrogenase (CDH) é uma enzima não hidrolítica como as outras celulases mas sim, oxidativa. Ela é responsável pela oxidação da celobiose por um processo complexo que ainda está sendo estabelecido, mas que no qual acredita-se estejam envolvidos a transferência de elétrons para o citocromo C, quinonas e complexação com Fe^{+3} (WESTERMARK & ERIKSSON, 1974). O sistema de indução para esta enzima ainda não está determinado, mas sabe-se

que ela está presente abundantemente quando *P. chrysosporium* é cultivada em meio definido, suplementado com celulose (WESTERMARK & ERIKKSSON, 1974). Transcritos deste gene também foram observados sob estas condições por LI *et al* (1996). Como para as demais celulasas, celobiose desidrogenase é reprimida por glicose (WESTERMARK & ERIKKSSON, 1974; LI *et al.*, 1996).

A celobiose e celodextrinas foram previamente descritas como substratos para a enzima CDH (WESTERMARK & ERIKKSSON, 1974). Recentemente, verificou-se que CDH, na presença de peróxido de hidrogênio e Fe^{+3} , produz radicais hidroxil (KREMER & WOOD, 1992), os quais são capazes de atacar não somente celulose, mas qualquer parte da madeira, inespecificamente. Entretanto, nenhuma atividade associada à degradação de lignina foi determinada (HERIKSSON *et al.*, 1995). A atividade de outras celulasas de *P. chrysosporium* provoca rachaduras sobre partículas de celulose onde, em suas bordas, CDH foi encontrada. Desta forma, conclui-se que CDH e as outras celulasas atuam em conjunto na degradação da celulose (IGARASHI *et al.*, 1997).

As celulasas de *P. chrysosporium*, como as de *T. reesei*, são constituídas por três unidades as quais compreendem um domínio catalítico e um “cellulose binding domain”, ligados por uma sequência de amino-ácidos denominados “hinge” (dobradiça). A função do “cellulose binding domain” seria de estabilizar a ligação da celulase à celulose, possibilitando assim a ação do domínio catalítico. Para esta ação, o “hinge”, proporcionaria flexibilidade ao domínio catalítico facilitando sua

atuação. Tanto para as *cbh1*- como para *cbh2*, sequências de amino-ácidos relacionadas ao "cellose binding domain" foram identificadas (COVERT *et al.*, 1992a,b; TEMPELAARS *et al.*, 1994). Exceção foi encontrada para *cbh1*-1, na qual não foram observadas as sequências de DNA que codificam para o "cellulose binding domain" e "hinge". A função deste gene truncado no genoma de *P. chrysosporium* não foi ainda determinada (COVERT *et al.*, 1992a).

Com relação ao "cellulose binding domain" de CDH, sabe-se que esta enzima é capaz de se ligar a celulose, entretanto, a sequência de amino-ácidos envolvida neste evento ainda não foi identificada (IGARASHI *et al.*, 1997).

2.5 - Organização Genômica de *Phanerochaete chrysosporium*

O desenvolvimento de mapas genéticos em fungos tem sido baseados no estudo de mutações induzidas, as quais produzem fenótipos facilmente reconhecíveis tais como: alterações morfológicas, deficiências nutricionais e resistência a drogas. Essas mutações são empregadas como marcadores genéticos os quais podem ser atribuídos à loci cromossômicos por cruzamentos tradicionais (FINCHAN *et al.*, 1979).

Fungos utilizados como modelos biológicos, como por exemplo: *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* e *Saccharomyces cerevisiae* possuem estruturas de reprodução uninucleadas, o que facilita a obtenção de mutantes. Este fato associado a compreensão do ciclo sexual nestes fungos, torna possível a construção de mapas genéticos saturados com marcadores (FINCHAN *et al.*,

1979).

Por outro lado, o entendimento da estrutura do genoma de *Phanerochaete chrysosporium* não tem sido uma tarefa fácil. As limitações relacionadas a este fato são em decorrência da própria biologia do fungo.

P. chrysosporium apresenta hifas multinucleadas e a reprodução assexuada dá-se pela formação de conídios nas extremidades de ramificações de hifas aéreas, formando assim o que é considerado um conidióforo rudimentar (BURDSALL JUNIOR & ESLYN, 1974; STALPERS, 1984). Estes conídios podem ser mono, bi ou multinecleados (GOLD *et al.*, 1982). Além dos conídios, podem ocorrer a formação de estruturas multinucleadas a partir da fragmentação da hifa, os artrosporos e, também, clamidosporos multinucleados originários da fragmentação da hifa com parede mais espessa (BURDSALL JUNIOR & ESLYN, 1974; STALPERS, 1984).

Na fase sexual ocorre a formação de um basidióforo que pode apresentar de 2 a 8 basídios, embora a forma mais frequente apresenta de 4 a 5 basídios, sendo que o quinto basídio é pouco desenvolvido e acredita-se que seja estéril (STALPERS, 1984). Os basidiosporos formados são na maioria binucleados. Formas mono ou multinucleados ocorrem com frequências muito baixas (GOLD *et al.*, 1982; ALIC *et al.*, 1987). Estudos genéticos mostraram que os basidiosporos binucleados são homocários. Cada núcleo originário de divisão meiótica migra para o basidiospore e, então, uma divisão mitótica dá origem ao segundo núcleo

(ALIC *et al.*, 1987).

Cruzamentos em *P. chrysosporium* são feitos através de plasmogamia ou fusão de protoplastos e seus produtos são analisados pela indução da formação de corpos de frutificação, os basiocarpós (GOLD *et al.*, 1982; ALIC *et al.*, 1985; JOHNSRUD & ERIKSSON, 1985).

A taxa de obtenção de mutantes em *P. chrysosporium* para estudos genéticos, devido as características das estruturas de reprodução acima mencionadas, é baixa o que dificulta a análise genética neste organismo (GOLD *et al.*, 1982). Metodologias empregando marcadores moleculares têm sido usadas para a elaboração de um mapa genético em *P. chrysosporium*. RAEDER *et al.* (1989), determinaram 6 grupos de ligação utilizando a técnica de RFLP para a análise de 53 colônias isoladas de basidiosporos. Foram identificados dois “clusters” não ligados, contendo 8 genes de ligninases no total, um com 6 genes (LC1) e outro com 2 (LC2).

Recentemente, uma série de publicações (GASKELL *et al.*, 1991; GASKELL *et al.*, 1992; GASKELL *et al.*, 1994) levaram ao estabelecimento e a correlação do mapa genético e o físico de *P. chrysosporium*. Tais dados foram obtidos empregando marcadores moleculares e localização física de genes em cromossomos separados por eletroforese em campo pulsado. GASKELL *et al.* (1991) mostraram que *P. chrysosporium* BKM-F-1767 possuem 7 bandas quando seus cromossomos são separados por esta metodologia (CHEF). Três bandas

(2,8; 3,0 e 3,7 Mb) foram intensamente coradas com brometo de etídeo indicando que estas podem ser duplas. “Southern blot” do gel contendo os cromossomos separados e hibridização com sequências similares do gene de ligninase que codifica para a isoenzima H8, usadas por RAEDER *et al.* (1989), mostraram que sequências homólogas a este gene localizam-se em dois cromossomos (3,5 e 3,7 Mb). Separação de cromossomos de basidiosporos isolados mostrou que estes cromossomos são dimórficos pois ocorre a segregação dos mesmos e, portanto, somente uma das bandas quando hibridizadas com a sonda acima mencionada, é evidenciada. Atualmente, sabe-se que existem 3 pares de cromossomos dimórficos GASKELL *et al.* (1994).

GASKELL *et al.* (1992) desenvolveram uma técnica que possibilitou o estabelecimento das relações alélicas através da análise de culturas de basidiosporos homocarióticos de *P. chrysosporium* BKM-F-1767. Posteriormente, esta metodologia tornou viável a construção de uma mapa genético

Esta metodologia consistiu na amplificação (via PCR) de genes utilizando “primers” específicos e DNA genômico, isolados de colônias provenientes destes basidiosporos. Em seguida os produtos desta amplificação foram transferidos para um suporte sólido (“Southern blot”) e, então, hibridizados com sondas alelo-específicas. Estas sondas constituíram-se de oligonucleotídeos os quais foram originários do multialinhamento de

sequências gênicas previamente isoladas e caracterizadas de *lipA* e *lipOA* de *P. chrysosporium* BKM-F-1767. Este multialinhamento permitiu que fossem identificadas regiões com diferenças em apenas uma base nitrogenada na mesma posição. Assim, 2 oligonucleotídeos, com tamanho de 17 nucleotídeos, foram sintetizados trazendo esta diferença (*lipA*, 5'-TTTCAGGAAATGCAATC-3'; *lipOA*, 5'-TTTCAGGAAATGTAATC-3'). Desta forma, foi possível monitorar a segregação destes alelos dentro da progênie de basidiosporos homocarióticos desta linhagem. Um terceiro oligonucleotídeo foi utilizado como sonda tendo como molde um gene de *P. chrysosporium* também codificando para uma lignina peroxidase, LG1. Os resultados mostraram que as sequências de *lipA* e *lipOA* são variantes alélicas do mesmo gene na linhagem BKM-F-1767. Por outro lado, a sonda específica para LG1 não hibridizou com os produtos de PCR obtidos para *LipA* e *lipOA*, evidenciando assim a sensibilidade desta metodologia.

A técnica descrita anteriormente mostrou-se adequada para a análise genética em *P. chrysosporium*, no qual a falta de mutantes é limitante. Portanto, uma adaptação desta técnica feita por GASKELL *et al.* (1994) tornou possível a elaboração de um mapa de ligação para ligninases e celulasas em *P. chrysosporium* BKM-F-1767. Para isso, uma progênie de basidiosporos homocarióticos obtida a partir da linhagem BKM-F-1767, a qual é dicrótica, foi analisada. "Primers" específicos para os genes de interesse foram desenhados.

Estes “primers” foram utilizados em reações de PCR nas quais DNA isolados de colônias formadas a partir de basidiosporos foram empregados como molde. O produto de PCR de cinco basidiosporos mais a linhagem parental (BKM-F-1767), foram sequenciados. Fez-se o multi-alinhamento das sequências e uma região dentro destas sequências na qual houve diferença de uma única base nitrogenada, na mesma posição, foi empregada como molde para desenhar dois oligonucleotídeos alelo-específicos que foram empregados como sonda. Estas sondas foram hibridizadas com os produtos de PCR de toda a progênie de basidiosporos homocarióticos de BKM-F-1767 para a verificação de segregação dos alelos dos genes estudados. Utilizando-se esta metodologia, GASKELL *et al.* (1994) apresentaram um mapa genético associado a um mapa físico, obtido pela separação de cromossomos de *P. chrysosporium* BKM-F-1767. A Figura 1 apresenta de forma atualizada, este mapa.

Recentemente, foram identificados 4 elementos que se assemelham a transposons (“transposable-like element”), denominados Pce 1 a 4. Estes elementos então localizados dentro do cromossomo maior (3,7 MB) de um dos pares dimórficos, no qual se encontram a maioria dos genes codificando para as ligninases. O primeiro a ser isolado inativa insercionalmente o gene *lipI*. Os demais foram geneticamente mapeados ao longo deste cromossomo. A presença destes elementos em somente um cromossomo do par de homólogos e a ausência deles no outro cromossomo deste par dimórfico (3,5 mb) é uma questão ainda para ser

respondida (GASKELL *et al.*, 1995). Sequenciamento dos outros 3 Pces (2 a 4) identificados tem mostrado variações no conteúdo de DNA localizado entre as sequências invertidas, características de transposons. Portanto, acredita-se que nenhum destes elementos estejam ativos (STEWART, P., comunicação pessoal).

A família dos genes que codificam para celobiohidrolases apresenta-se organizada em um “cluster” contendo três genes, *cbh1-1*, *cbh1-2* e *cbh1-3*. Este “cluster” localiza-se dentro de uma região de 20 kb no maior par de cromossomos dimórficos, 4,4 e 4,8 Mb, (Figura 1). *cbh1-1* e *cbh1-2*, estão separados por 750 pares de bases, enquanto *cbh1-3* localiza-se a 14 Kb destes dois últimos (COVERT *et al.*, 1992a). Os demais genes encontram-se distribuídos pelo genoma, sendo que *cbh1-4* e *cbh1-5* estão ligados fisicamente, assim como *cbh1-6* e *mp3* (GASKELL *et al.*, 1994). O mapa genético e físico de *P. chrysosporium* pode ser visto com detalhes na Figura 1.

Como foi visto anteriormente, basidiosporos homocarióticos de *P. chrysosporium* se prestam ao mapeamento genético empregando-se a técnica descrita por GASKELL *et al.* (1992), transpondo assim, as limitações decorrentes de poucos marcadores genéticos.

Figura 1. Mapa genético e físico atualizado de *Phanerochaete chrysosporium*. Barra na lateral esquerda representa os tamanhos moleculares estimados em Mb; pares de cromossomos dimórficos são representados pelo mesmo padrão de cor. Setas bidirecionais pretas representam distâncias gênicas. Setas bidirecionais verdes representam as distâncias em kilobase determinada pela técnica de "chromosome walking". (Figura reproduzida sob permissão de Dr. Daniel Cullen, USDA, Forest Products Laboratory, Madison, WI).

2.6 - Amplificação de mRNA de genes de *P. chrysosporium* via RT-PCR seguido de quantificação baseada em “competitive template”

Amplificação de mRNA específicos, presente em baixo número de cópias, tem sido feita com sucesso empregando-se a técnica de RT-PCR (“reverse transcriptase - polymerase chain reaction”). Porém, a quantificação do produto obtido nesta reação é discutida devido a variações nos rendimentos do produto da amplificação (GILLILAND *et al.*, 1990; ZACHAR *et al.*, 1993).

Uma nova técnica foi desenvolvida por GILLILAND *et al.* (1990) empregando a co-amplificação da molécula alvo de cDNA e um DNA genômico de tamanho e em concentrações conhecidas (“competitive template”). O cDNA é obtido por uma reação de síntese da primeira fita seguido por um passo de desnaturação do híbrido. Em seguida, este cDNA é utilizado em uma reação de PCR onde os mesmos “primers” são utilizados para amplificar o cDNA e o “competitive template”.

Os produtos da co-amplificação do cDNA e “competitive template” são diferenciados geralmente em géis de agarose, baseando-se em seus tamanhos. Para tal, os oligonucleotídeos usados como “primers”, são planejados de forma que amplifiquem diferencialmente cDNA e “competitive template”. Este último, contendo introns. Para a quantificação dos produtos da co-amplificação o primeiro passo é gerar um índice, o qual é calculado pela razão entre o tamanho em pares de bases (bp) do “competitive template” e do cDNA. Após a análise das bandas

referentes a diferentes diluições do “competitive template” e cDNA por densitometria, faz-se a suas razões. Estes valores são então plotados contra as concentrações de “competitive template”. Após o ajuste da curva por regressão linear e obtenção da expressão da reta, aplica-se o índice gerado previamente, e encontra-se para o dado tratamento, a concentração de transcrito presente na amostra (GILLILAND *et al.*, 1990).

O potencial desta técnica tem sido extremamente explorado devido à sua sensibilidade, pois mRNAs extraídos de até 10 células podem ser quantificados (SOUZÉ *et al.*, 1996).

Como já foi mencionado anteriormente, dez genes que codificam para ligninases, três para ligninases dependentes de manganês e sete para celobiohidrolases foram isolados, caracterizados e suas posições no genoma deste fungo determinadas. Devido a complexidade deste sistema, no qual genes diferentes codificam para enzimas com funções semelhantes, torna-se complicado a determinação da expressão gênica pela análise da atividade enzimática. Portanto, a técnica de co-amplificação de cDNA e “competitive template” em concentrações conhecidas tem a vantagem de ser altamente específica e possibilitar a quantificação de um dado transcrito, mesmo em baixas concentrações, dentro de uma população heterogênea de RNA.

Com a utilização das informações disponíveis relativas as ligninases e utilização desta metodologia, STEWART *et al.* (1992), acessaram a expressão de

seis diferentes genes que codificam ligninases, um para ligninase dependente de manganês e um para glioxal oxidase em meio definido com limitação para carbono ou nitrogênio.

COVERT *et al.* (1992a), quantificaram os transcritos de *cbh1-1*, *cbh1-2* e *cbh1-3*, em meio definido suplementado com celulose, glicose e sacarose como fonte de carbono. Os resultados mostraram que *cbh1-1* e *cbh1-2*, apresentam seus transcritos constitutivamente em baixos níveis, já a transcrição de *cbh1-3* é alterada pelas condições do meio, sendo 1.000 vezes maior que *cbh1-1* e *cbh1-2* em meio definido com celulose. Estudos realizados posteriormente por VANDEN WYMELENBERG *et al.* (1993) empregando as mesmas condições descritas por COVERT *et al.* (1992a), verificaram que a transcrição dos genes *cbh1-4*, *cbh1-5* e *cbh1-6*, como para *cbh1-3*, é alterada pelas condições de cultivo, sendo inibida por glicose e sacarose e induzida por celulose. O transcrito de *cbh1-4* é o mais abundante encontrado, alcançando 0,5 ng, seguido por *cbh1-6* (0,05 ng), *cbh1-5* (0,02 ng) e *cbh1-3* (0,01 ng).

Tem sido relatado que *P. chrysosporium* é capaz de degradar compostos orgânicos presentes no solo, utilizando enzimas ligninolíticas. A purificação e caracterização destas enzimas a partir de solo colonizado pelo fungo é complicado pela falta de protocolos experimentais que possibilitem um bom rendimento (LAMAR *et al.*, 1995).

A transcrição reversa e co-amplificação com o “competitive template” de

genes de interesse, associado a uma metodologia eficiente de isolamento de mRNA a partir de solo contaminado com compostos orgânicos e colonizado por *P. chrysosporium* possibilitou a LAMAR *et al.* (1995), acessarem a atividade fisiológica deste fungo através da identificação e quantificação de transcritos que codificam para as enzimas envolvidas no processo de degradação do poluente. Neste trabalho, verificou-se que o padrão de transcrição dos genes que codificam ligninases, diferenciam substancialmente do padrão encontrado por STEWART *et al.* (1992), em meios com limitação de nutrientes.

Posteriores aos trabalhos de LAMAR *et al.* (1995), empregando-se as mesmas metodologias, dois artigos foram publicados onde as quantificações de transcritos de ligninases dependentes de managanês e ligninases de *P. chrysosporium* foram acessadas em solos contaminados por hidrocarbono policíclico aromático (PAH) e antraceno, respectivamente por BOGAN *et al.* (1996a) e BOGAN *et al.* (1996b). O padrão de transcrição encontrado para estas duas famílias de genes difere do reportado por STEWART *et al.* (1992).

Até o presente momento, o acesso da transcrição de genes que codificam para celobiohidrolases e celobiose desidrogenase, ficou restrito a meio definido complementado com diferentes fontes de carbono. Como para ligninases, a problemática fica sendo a complexidade da família de genes codificando para enzimas com funções semelhantes (celobiohidrolases) e a falta de metodologias que possibilitam o isolamento de material de madeira colonizado por *P.*

chrysosporium. Este problema foi superado através de uma adaptação da metodologia descrita por LAMAR *et al.* (1995) onde a obtenção de mRNA de boa qualidade foi possível a partir de madeira colonizada pelo fungo.

2.7 - Expressão heteróloga de celulasas em *Saccharomyces cerevisiae*: considerações gerais

Em levedura *S. cerevisiae* a falta de um sistema celulolítico desenvolvido, associado ao grande conhecimento de sua “maquinaria” de expressão e exportação de glicoenzimas e, ainda, sua ampla utilização em processos industriais/biotecnológicos, tais como processos fermentativos, a torna uma forte candidata para estudos de expressão de celulasas. A introdução de genes que codificam celulasas, acoplado à capacidade de fermentação da levedura, torna possível acomodar em um único microrganismo os processos de sacarificação de celulose e sua fermentação em etanol (PENTTILÄ *et al.*, 1987; VAN ARSDELL *et al.*, 1987; PENTTILÄ *et al.*, 1988).

Pesquisas visando a expressão heteróloga de genes de celulasas em *S. cerevisiae*, tais como endoglucanases e celobiohidrolases foram realizadas e uma breve discussão do progresso alcançado será discutido abaixo.

VAN ARSDELL *et al.* (1987), clonaram, caracterizaram e expressaram uma endoglucanase (*egl1*) de *T. reesei* em *S. cerevisiae*. A enzima expressa apresentou-se altamente glicosilada pela levedura, o que acredita-se, causou 30% de redução da atividade enzimática com relação a enzima nativa de *T. reesei*.

Resultados similares foram encontrados por PENTTILÄ *et al.* (1987), onde dois genes codificando duas endoglucanases de *T. reesei* (*eglI* e *eglII*) foram expressos em *S. cerevisiae*. Glicosilação e atividade reduzida da enzima produzida pela levedura foram verificadas. Também, as células carregando os plasmídios recombinantes mostram morfologia alterada, sendo 1,5 vez maior que as células não transformadas.

A expressão de genes que codificam celobiohidrolases I e II (*cbhI* e *cbhII*) de *T. reesei* em *S. cerevisiae*, mostrou que o padrão de glicosilação de *cbhI* difere de *cbhII*, pois tratamento com *endoH*, uma enzima que remove os açúcares adicionado pela levedura, apresentou efeito somente sobre *cbhII*. Nos ensaios em placas de Petri utilizando β -glucan isolada de cevada, halos de degradação de celulose foram observados apenas para os clones expressando *cbhII* e nos ensaios enzimáticos com celulose cristalina, as CBHs exportadas pela levedura apresentam apenas 65% da atividade observada para as CBHs nativas de *T. reesei*. PENTTILÄ *et al.* (1988), atribuem estas diferenças na organização tridimensional das duas CBHs e sugerem que cristalização e difração de raio-X sejam empregadas para comprovação desta hipótese.

A expressão de um gene de *Penicillium janthinellum* que codifica celobiohidrolase (*cbh1*) em *S. cerevisiae* (KOLCH *et al.*, 1993), mostrou resultados similares ao de PENTTILÄ *et al.* (1988), com ocorrência de glicosilação da proteína e ausência de halo de degradação em ensaios de placa de Petri.

Caracterização da expressão de uma endoglucanase de *Aspergillus aculeatus* em *S. cerevisiae* mostrou glicosilação da proteína, aumento da termoestabilidade e redução de 28% da atividade com relação a proteína nativa de *A. aculeatus* (MINAMIGUCHI *et al.*, 1995).

Com relação a expressão de genes de *P. chrysosporium* em *S. cerevisiae*, RENSBURG *et al.* (1996) realizaram a clonagem e expressão do cDNA de *cbh1-4*, sendo relatado como atividade do produto expresso o valor de 12,03 unidades. No entanto, esta atividade não pôde ser comparada com a atividade da proteína nativa de *P. chrysosporium* uma vez que neste fungo, seis genes codificam para CBHI, e também no referido trabalho, a glicosilação ou não das proteínas expressas não foi discutida. A fusão de *cbh1-4* com uma endoglucanase de *Butyrivibrio fibrisolvens*, quando expresso na levedura, apresentou sinergismo.

A expressão heteróloga de genes de celulase em *S. cerevisiae* apresenta outras vantagens que não somente a biotecnológica. No caso de *P. chrysosporium*, no qual ocorre multiplicidade de celobiohidrolases, a expressão de cada gene isoladamente em levedura permitirá um estudo mais detalhado do papel que cada isozima desempenha na degradação da celulose.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Linhagens de Fungo e Bactéria

3.1.1 - Fungo

Linhagem	Fenótipo	Fonte
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> BKM-F-1767	selvagem	USDA - Forest Service Forest Products Lab. Madison, WI USA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y294	α ; <i>leu2-3 112</i> ; <i>ura3-52</i> ; <i>his3</i> ; <i>trp1-289</i>	RENSBURG <i>et al.</i> (1996)

3.1.2 - Bactéria

Linhagem	Genótipo/Fenótipo	Fonte
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15; <i>recA1</i> ; <i>endA1</i> ; <i>gyrA96</i> ; <i>thi-1</i> ; <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+); <i>supE44</i> ; <i>relA1</i> ; <i>deoR</i> ; Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169	Stratagene, Inc.

3.1.3 - Plasmídios

Os plasmídios empregados neste trabalho foram pKSII⁺ TA-vector (Stratagene, Inc.), pCBH (Rensburg *et al.*, 1996), e pCBH1-1 contendo *cbh1-1* de *P. chrysosporium*. O plasmídio pCBH1-1 foi sequenciado para verificar a orientação do gene *cbh1-1* (dado não apresentado).

3.2 - Meios

3.2.1 - LB (Luria-Bertani)

Bacto-triptona	1%
Bacto-extrato de Levedura	0,5%
NaCl	1%

Para meio sólido, 1.5% de ágar foi adicionado.

3.2.2 - Extrato de Malte

Extrato de malte	20%
Ágar	1,5%

3.2.3 - YPD

Extrato de Levedura	1%
Peptona	2%
Glicose	2%

Para meio sólido, 1.5% de ágar foi adicionado. Para os ensaios de atividade celulolítica, Carboxy-metil celulose (CMC) ou Hidroxietil celulose (HEC) foi adicionado às placas na concentração final de 0.3%.

3.2.4 - Meio mínimo para Levedura

Meio base de nitrogênio sem amino-ácidos	1%
Glicose	2%
Solução de requerimentos nutricionais	1X

Para meio sólido, 1,5% de agar foi adicionado.

3.3 - Soluções e Tampões

3.3.1 - TE (Tris-HCl-EDTA)

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM

3.3.2 - TBE 10X (Tris, Borato e EDTA)

Tris base	108 g/l
Ácido Bórico	55 g/l
EDTA	7,44 g/l

3.3.3 - SSC 20X

NaCl	175,3 g/l
Citrato de Sódio	88,2 g/l

O pH foi ajustado para 7,0.

3.3.4 - SSPE 20X

NaCl	175,3 g/l
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	27,6 g/l
EDTA	7,4 g/l

O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH 10N.

3.3.5 - TAE 50X (Tris-acetato)

Tris-base	242 g/l
Ácido acético glacial	57,1 ml/l
EDTA	50 mM

3.3.6 - Tampão MOPS 10X para “Northern Blot”

MOPS	20 mM
Acetato de Sódio	50 mM
EDTA	10 mM
Formaldeído	2,2 M

Ajustou-se o pH para 7,0 com ácido acético depois de dissolver o MOPS e acetato de sódio e antes de adicionar EDTA e formaldeído.

3.3.7 - Tampão de amostra para RNA

Glicerol	50%
Azul de bromofenol	0,1 mg/ml

3.3.8 - Tampão LETS

LiCl	100 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl pH 7,4	10 mM
SDS	0,2%

3.3.9 - Tampão de amostra para DNA

Azul de Bromofenol	0,25%
Xileno Cianol FF	0,25%
Ficoll Tipo 400	30%

3.3.10 - Tampão de extração de mRNA poliA de lascas de madeira (“binding buffer”)

Tiocianato de Guanidina	4 M
Tris-HCl pH 8	100 mM
DTT	1%
Lauril Sarcosinato	0.5%

3.3.11- Tampão de lavagem para Dynabeads OLIGO (Dt)₂₅ Kit (DynaL, Inc)

Tris-HCl pH 8	10 mM
LiCl	150 mM
EDTA	1 mM

3.3.12- Tampão de Lise para levedura

Tris-HCl pH 7,2	50 mM
EDTA	50 mM
SDS	3%
2-β-mercaptoetanol	1%

3.3.13 - Solução de fenol estabilizada

O fenol líquido estocado a -20°C foi descongelado à temperatura ambiente e então aquecido a 68°C. Adicionou-se hidroxiquinolina na concentração final de 0,1% (p/v). Volume igual de Tris-HCl 0,1M pH 8.0 foi adicionado. Agitou-se com auxílio de um agitador magnético durante 15 minutos. Para extração de RNA de leveduras o fenol foi estabilizado com descrito anteriormente com tampão LETS.

3.3.14 - Solução estoque de RNase.

Uma solução estoque de 10 mg/ml foi preparada adicionando-se RNase A-DNase-free (Sigma), em uma solução de Tris-HCl pH 7,5 e 15 mM NaCl. Eventual contaminação com DNase foi eliminada por fervura por 15 minutos. Estocou-se a -20°C.

3.3.15 - Solução X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactoside)

Uma solução de 20 mg/ml foi preparada dissolvendo-se a X-Gal em dimethylformamide. Esta solução foi estocada a -20°C.

3.3.16- Solução de Brometo de etídeo

Uma solução aquosa de 10 mg/ml de Brometo de Etídeo foi feita e mantida no escuro à temperatura ambiente.

3.3.17 - Solução para extração de DNA cromossomal de fungos filamentosos

Tris-HCl pH 8,5	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS	0.5 % (p/v)

**3.3.18 - Solução para extração de DNA cromossomal de fungos filamentosos
crescido em placas de Petri**

Tris-HCl pH 7,2	50 mM
EDTA	50 mM
SDS	3% (p/v)
2-β-mercaptoetanol	1% (v/v)

3.3.19 - Soluções para extração de DNA plasmidial**3.3.19.1 - Solução I**

Tris-HCl pH 8,0	25 mM
EDTA	10 mM
Glicose	50 mM

3.3.19.2 - Solução II

Esta solução foi preparada no momento do uso.

NaOH	200 mM
SDS	0,1 % (p/v)

3.3.19.3 - Solução III

NaAc 3 M

O pH foi ajustado para 4.8 com ácido acético concentrado.

3.3.20 - Soluções de hibridização

Estas soluções foram feitas no momento do uso.

3.3.20.1 - Solução de Pré-hibridização para Oligonucleotídeos

Solução de Denhardt	5 X
SSC	6 X
SDS	0.1 % (p/v)

3.3.20.2 - Solução de Hibridização para Oligonucleotídeo

Solução de Denhardt	5 X
SSPE	6 X
SDS	0.1 % (p/v)

3.3.21 - Solução de Denhardt 50X

Ficol	1 % (p/v)
Polivinilpirrolidona	1 % (p/v)
BSA nuclease-free	1 % (p/v)

Dissolveu-se e estocou-se a -20°C.

3.3.22 - Solução de Hibridização para “Northern Blot”

A mesma solução de hibridização descrita abaixo, foi empregada como solução de pré-hibridização.

SSPE	5X
Solução de Denhardt	5X
SDS	0,5% (p/v)
DNA esperma de salmão	200 µg/ml

3.3.23 - Solução de Requerimentos Nutricionais 10 X

Requerimentos Nutricionais	mg/100ml
Adenina	20
Triptofano	20
Histidina	20
Arginina	20
Metionina	20
Tirosina	20
Leucina	100
Isoleucina	30
Lisina	30
Fenilalanina	50
Ácido Glutâmico	100
Ácido Aspártico	100
Valina	150
Treonina	200
Serina	400
Alanina	20
Asparagina	20

Cisteína	20
Glutamina	20
Cistina	20
Prolina	20

Esterilizou-se por filtração e manteve-se a 4°C protegido da luz.

3.3.24 - “Plate mix”

PEG 4000	40 % (p/v)
Acetato de Lítio	100 mM
Tris-HCl pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM

Cada solução foi esterilizada separadamente e adicionada no momento do uso para constituir o “Plate Mix”.

3.4 - Atividade celulolíticas em placas

As colorações de placas de YPD contendo 0,3% de Carboximetil celulose (CMC) ou hidroxietil celulose (HEC) foram realizadas de acordo com o descrito por TEATHER & WOOD (1982).

Colônias de leveduras crescidas a 30°C por 72 horas foram lavadas da placa usando TE. Após completa remoção, uma solução aquosa de vermelho do congo 0,1% (p/v) foi colocada cobrindo toda a placa. Réplicas foram mantidas à temperatura ambiente e 42°C por 20 minutos. A solução de vermelho do congo foi descartada e a placa lavada com TE. A presença ou não de halos de expressão foi

verificada contra a luz.

3.5 - Extração de DNA cromossomal de fungo filamentoso

A extração de DNA cromossomal foi realizada com uma variação do método de RAEDER & BRODA (1985).

O micélio de *P. chrysosporium* foi crescido durante a noite em 50 ml de meio extrato de malte líquido e, então, filtrado a vácuo e transferido para um almofariz. Com a adição de nitrogênio líquido, este micélio foi pulverizado e transferido para tubos falcon de 15 ml. Adicionou-se 4 ml de solução de extração e agitou-se gentilmente por inversão. Acrescentou-se 3 ml de fenol e 1,2 ml de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v). Agitou-se por inversão e incubou-se em gelo por 10 minutos. Centrifugou-se a 8.000 rpm por 50 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada Beckman (rotor JA-20.1). A fase aquosa foi recuperada e nova extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico foi realizada. Centrifugou-se a 8.000 rpm por 10 minutos. Recuperou-se a fase aquosa e, então, acrescentou-se 50 µl de RNase e incubou-se por 15 minutos a 37°C. Adiciou-se igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v). A extração com clorofórmio/álcool isoamílico foi repetida. O DNA cromossomal foi precipitado acrescentando a fase aquosa 0.54 volume de isopropanol gelado (-20°C). Agitou-se por inversão, lentamente. Centrifugou-se imediatamente por 15 minutos a 6.000 rpm. O "pellet" foi lavado com etanol 70% e seco a vácuo (speed vac concentrator, Savant Inc.)

por 5 minutos. O DNA precipitado foi ressuspendido com 1 ml de TE durante a noite. Para reações de PCR, 75 ng de DNA cromossomal foram usados como molde.

3.6 - Extração de DNA cromossomal de fungo filamentosso crescido em placa de Petri (INNIS *et al.*, 1990)

O micélio de *P. chrysosporium* foi removido da placa de Petri e transferido para papel de pesagem e nele embrulhado e congelado em nitrogênio líquido. O micélio foi moído em cadinho com pistilo, ambos resfriados previamente com nitrogênio líquido. O pó obtido foi transferido para tubos de eppendorf. Adicionou-se 400 µl de tampão de lise, misturou-se em vortex e incubou-se por 1 hora a 65°C. Adicionou-se 400 µl de fenol:clorofórmio:álcool isomílico (25:24:1 v/v) e misturou-se em vortex. As fases foram separadas por centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos em microcentrífuga eppendorf refrigerada. À fase aquosa recuperada, adicionou-se igual volume de clorofórmio:álcool isomílico (24:1 v/v), misturou-se em vortex e centrifugou-se como descrito anteriormente. Adicionou-se a fase aquosa recuperada, 10 µl de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 0,54 volumes de isopropanol resfriado a -20°C e misturou-se por inversão. Centrifugou-se a 12.000 rpm por 5 minutos. O “pellet” foi lavado com etanol 70% resfriado a -20°C e seco em “speed vac concentrator” (Savant, Inc.). O “pellet” foi ressuspendido com 100 µl de TE e estocado em refrigerador indefinidamente.

Em reações de PCR para o mapeamento, 3 µl de uma diluição 1:10

do DNA obtido pelo protocolo acima foram adicionados como DNA molde.

3.7 - Extração de mRNA poliA de lascas de madeira (Aspen)

Uma adaptação do método descrito por LAMAR *et al.* (1995) foi empregado para o isolamento de poliA mRNA de lascas de madeira colonizadas por *P. chrysosporium*.

P. chrysosporium foi inoculada em erlenmeyrs de 250 ml contendo 100 ml de extrato de malte e crescido sem agitação a 37°C durante a noite. O micélio foi coletado em “miracloth” (Calbiochem) e seu peso úmido determinado. Foram utilizados 12,5 mg de micélio para cada 2,5 Kg de lascas de madeira.

As lascas de madeira (2,5 Kg) dentro do bioreator foram esterilizadas sob vapor por 10 minutos. O microrganismo foi inoculado, sob condições assépticas, após o sistema atingir temperatura ambiente. O sistema foi conectado a uma mangueira trazendo ar umidificado (85%) e estéril e mantido a 37°C por 10 semanas. Amostras foram coletadas a cada duas semanas a partir da segunda semana e rapidamente congeladas com nitrogênio líquido e estocadas a -80°C.

Para extração do mRNA poliA 10 g de lascas de madeira foram utilizadas. Em um moedor de café doméstico previamente resfriado com gelo seco moeu-se a madeira até que um fino pó fosse obtido. A madeira moída foi transferida para um tubo falcon de 50 ml. Adicionou-se 20 ml de tampão de extração e agitou-se em vortex. Centrifugou-se por 10 minutos a 2.000 rpm em centrífuga clínica de

bancada. O sobrenadante foi filtrado em “miracloth” (Calbiochem). Adicionou-se 2 volumes do tampão de ligação. Acrescentou-se 300 μ l de Dynabeads (Dynabeads Oligo (dT)₂₅ Kit, Dynal, Inc.) e incubou-se em gelo por 30 minutos, misturando-se por inversão a cada 5 minutos. Expôs-se as “Dynabeads” a um ímã por 5 minutos. Com uma pipeta, removeu-se o sobrenadante. Adicionou-se 500 μ l de tampão de lavagem e transferiu-se para um tubo de eppendorf e, então fez-se outra exposição de 5 minutos ao ímã. Esta operação foi repetida mais duas vezes. Adicionou-se 200 μ l de tampão de eluição (2 mM EDTA pH 8,0) e incubou-se a 65°C por 2 minutos e expôs-se as Dynabeads ao magneto. Recuperou-se o sobrenadante e a ele foram adicionados 0,1 volume de Acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 2 volumes de etanol resfriado a -20°C. Este material foi estocado a -20°C. Quando necessário para reação de transcrição reversa, 2 μ l foram removidos e secos em “speed vac concentrator” (Savant, Inc.).

3.8 - Extração de DNA plasmidial

A minipreparação foi realizada empregando uma variação da extração alcalina descrita por BIRBOIN & DOLY (1979).

Células de *E. coli* DH5 α de uma colônia foram inoculadas em meio LB contendo 50 μ g/ml de ampicilina. Incubou-se a 37°C sob 200 rpm de agitação durante a noite. Então, 5 ml da cultura crescida foi transferida para tubos falcon de 15 ml e centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi

descartado.

As células precipitadas foram ressuspensas com 100 μ l da solução I, com auxílio de vortex. Adicionou-se 200 μ l da solução II. Agitou-se vagarosamente por inversão e, então, 150 μ l da solução III foram adicionados. Agitou-se por inversão e manteve-se a -20°C por 30 minutos. Centrifugou-se por 15 minutos a 10.000 rpm a 4°C (Beckman, rotor JA-20.1). O sobrenadante foi transferido para um tubo de eppendorf onde 225 μ l de fenol e 225 μ l de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v) foram adicionados. Misturou-se por inversão várias vezes. Centrifugou-se por 15 minutos a 12.000 rpm em microcentrífuga. Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo, adicionou-se 50 μ l de RNase e incubou-se a 37°C por 15 minutos. Então, igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v) foi adicionado e misturado por inversão. Centrifugou-se por 15 minutos a 12.000 rpm. À fase aquosa recuperada foi adicionado 1 ml etanol absoluto, previamente resfriado a -20°C . Incubou-se por pelo menos 1 hora a -20°C . Centrifugou-se a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C em microcentrífuga. O "pellet" foi lavado com etanol 70% resfriado e seco a vácuo por 5 minutos e ressuspensado com 50 μ l de TE.

3.9 - Transformação de levedura (KAISER *et al.*, 1994)

Uma colônia de levedura (linhagem Y294) foi inoculada em meio YPD, incubou-se durante a noite com 200 rpm de agitação a 30°C . Para cada

transformação, 1 ml da cultura foi centrifugado em microcentrífuga a 12.000 rpm de 5 a 10 segundos. Descartou-se o sobrenadante deixando aproximadamente 100 μ l de meio. Adicionou-se 2 μ l de DNA de esperma de salmão (solução estoque de 10 mg/ml) e, gentilmente, ressuspendeu-se as células. Adicionou-se 1 μ g de plasmídio e misturou-se em vortex. Adicionou-se 500 μ l de “plate mix” e misturou-se em vortex. Adicionou-se 20 μ l de DDT 1 M e, novamente, misturou-se em vortex. Incubou-se à temperatura ambiente por 2 horas e então, procedeu-se o choque térmico a 42°C por 10 minutos. Com uma micropipeta coletou-se diretamente do fundo do tubo 100 μ l e transferiu-se para um novo tubo. Plaqueou-se 50 μ l e 5 μ l em placas com meio mínimo dos suplementos, exceto uracila. Incubou-se a 30°C por 72 horas.

3.10 - Extração de plasmídio de levedura para transformação de *E. coli* (KAISER *et al.*, 1994)

Uma colônia de levedura foi inoculada em 5 ml de meio mínimo para levedura com suplementos e incubada a 30°C com 200 rpm de agitação durante a noite. 1,5 ml da cultura foram centrifugados a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas no meio restante no fundo do tubo de eppendorf. Adicionou-se 200 μ l de solução contendo 2% de Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA. Então, acrescentou-se 200 μ l de phenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 v/v). Agitou-se em vortex por 2 minutos e centrifugou-se por 5 minutos em microcentrífuga. O

sobrenadante foi recuperado e uma diluição de 1:10 foi feita e desta, 5 μ l foram usados para transformar *E. coli* DH5 α competente, de acordo com as instruções do fabricante (Library grade competent cells, Stratage).

3.11 - Extrato de Proteína a partir de células de *Saccharomyces cerevisiae* (KAISER *et al.*, 1994)

Uma colônia de *S. cerevisiae* foi inoculada em 5 ml de meio mínimo para levedura com suplementos e incubada a 30°C com 200 rpm de agitação durante a noite. Este crescimento proporcionou uma leitura a OD₆₀₀ de 0,5 a 2,0. A cultura foi então transferida para um tubo contendo 2 ml de uma solução resfriada a 4°C de 50 mM Tris-HCl pH 7,5 e 10 mM de NaN₃. Centrifugou-se em centrífuga de bancada a 5.000 rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 30 μ l de ESB (2% SDS, 80 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol, 1,5% DTT e 0,1 mg/ml de azul de bromofenol). Resuspendeu-se e transferiu-se para um tubo eppendorf. Procedeu-se o aquecimento por 3 minutos a 100°C. Esfriou-se rapidamente em gelo e, então, adicionou-se pérolas de vidro até o nível do líquido. Agitou-se em vortex por 2 minutos. Adicionou-se 70 μ l de ESB, agitou-se brevemente em vortex e aqueceu-se por 1 minuto a 100°C. Uma aliquota de 1 μ l foi carregada em um mini gel (PhastSystem, Pharmacia Biotech.). Após a corrida, o gel foi corado com azul de comassie ou prata seguindo o protocolo do construtor do sistema de coloração (Development Unit, Pharmacia Biotech.).

3.12 - Isolamento de RNA de *Saccharomyces cerevisiae* (KAISER *et al.*, 1994)

Uma colônia de *S. cerevisiae* foi inoculada para cada transformante em meio mínimo suplementado. Esta cultura foi crescida durante a noite a 30°C com 200 rpm de agitação. Toda a cultura foi empregada para inocular no dia seguinte 200 ml de meio mínimo suplementado. Incubou-se a 30°C sob agitação de 200 rpm até que as células atingissem 2×10^7 a 4×10^7 células/ml ($OD_{600}=1,216$ equivale a $3,56 \times 10^7$ células/ml para linhagem Y294).

As células foram resfriadas em gelo e colocadas até a metade de frascos de 500 ml para rotor Beckman JA-14. Completou-se com gelo moído. Misturou-se e centrifugou-se por 5 minutos a 4°C a 5.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 2,5 ml de tampão de extração LETS pré-resfriado em gelo. Então, as células ressuspensas foram transferidas para todos de centrífuga para rotor Beckman JA-20 contendo 11 g de pérolas de vidro, previamente lavadas com uma solução 1 N de HCl, e 3 ml de fenol equilibrado com LETS. Esta mistura foi agitada por 6 vezes em Vortex por 30 segundos alternando 30 segundos em gelo. Adicionou-se 5 ml de LETS e agitou-se em vortex brevemente. Centrifugou-se por 5 minutos a 8.000 rpm (rotor Beckman JA-20). Recuperou-se a fase aquosa em um novo tubo e adicionou-se 5 ml de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 v/v). As fases foram separadas por centrifugação a 8.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e, a seguir, adicionou-se 1/10 do volume de uma solução de 5 M de LiCl. Esta solução

foi estocada a -20°C e, quando necessário, 1 ml foi aliquoteado e centrifugado por 15 minutos a 12.000 rpm. Descatou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o RNA em água tratada com 0,1 % de dietil pirocarbonato (DEPC). Quantificou-se o RNA em espectrofotômetro (OD₂₆₀).

3.13 - Digestão com enzimas de restrição

As digestões com enzimas de restrição foram feitas de acordo com as instruções do fabricante.

3.14 - Técnica de "Southern Blot" (SAMBROOK *et al.*, 1989)

As amostras foram então carregadas em gel de agarose com concentrações variando de 0,8% a 1,2%. Uma corrente de 4 V/cm foi aplicada até que o marcador de corrida (azul de bromofenol) alcançasse o final do gel. O gel foi corado em uma solução de brometo de etídeo (5 µg/ml) e observado sob luz ultravioleta (UV). A depurinação o DNA foi feita deixando o gel exposto sob luz UV por 5 minutos. A denaturação foi feita com uma solução denaturante (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) por 30 minutos sob fraca agitação à temperatura ambiente. Então, o gel foi transferido para uma solução neutralizadora (1M NH₄Ac; 0.02 M NaCl) e submetido a incubação por 30 minutos à temperatura ambiente, sob fraca agitação. O DNA foi transferido para membrana de Nylon (Hybond-N, Amersham Life Science) durante a noite, unidirecional ou bidirecionalmente e, então, fixado por "crosslinker" (UV Stratalinker 1800, Stratagene). As membranas foram

mantidas em sacos de plástico, protegidas de luz e à temperatura ambiente até o momento do uso.

3.15 - Técnica de “Northern Blot” (SAMBROOK *et al.*, 1989)

O gel de agarose 1% foi preparado pela fusão de 1 g de agarose em 90 ml de água Milli-Q autoclavada. A seguir, o gel foi resfriado até, aproximadamente, 65°C. Adicionou-se 10 ml de Tampão MOPS 10X e o gel foi vertido de maneira usual..

Secou-se 20 µg de RNA o qual foi posteriormente ressuspensão em 12,5 µl de formamida deionizada, 2,5 µl de tampão MOPS 10X e 10 µl de água Milli-Q autoclavada. Aqueceu-se as amostras a 65°C por 10 minutos. Adicionou-se tampão de corrida para RNA. O mesmo tratamento foi dado para o marcador de peso molecular (0,24-9,5 Kb, GIBCO-BRL, número do catálogo 56205A). O gel foi corrido em tampão MOPS 1X a 125 volts por 2 horas.

Transferiu-se o RNA para membrana Hbybond-N (positivamente carregada) de acordo com as especificações do fabricante (Amersham Life Science), durante a noite. O RNA foi fixado à membrana usando UV Stratalinker 1800 (Stratagene).

3.16 - Hibridização

3.16.1 - Hibridização para “Southern Blot”

As membranas contendo o DNA foram submetidas a duas horas de pré-

hibridização, no mínimo, com a solução de pré-hibridização para oligonucleotídeo à temperatura de anelamento [$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$]. Esta solução foi trocada pela solução de hibridização e, então, fez-se a adição do oligonucleotídeo marcado e hibridizou-se durante a noite.

Descartou-se a solução de hibridização, seguindo-se com a lavagem da membrana à temperatura ambiente por 2 vezes por 5 minutos com uma solução contendo SSC 6X e SDS 0,1%. Lavou-se mais uma vez com esta mesma solução por 15 a 20 minutos à temperatura de hibridização. Secou-se a membrana ao ar e expos-se contra filme de raio-X durante a noite. A revelação do filme foi feita de acordo com as instruções do fabricante das soluções de revelação (Kodak).

3.16.2 - Hibridização para “Northern Blot”

As membranas contendo o RNA foram submetidas a pelo menos 2 horas de pré-hibridização com a solução descrita no item 3.3.19, à temperatura de 60°C. À esta solução adicionou-se a sonda de DNA de fita dupla (desnaturada) marcada com 50 μ Ci de α - 32 P dCTP por “random priming”. (Ready to Go: Random Priming Kit, Pharmacia). Após a marcação os nucleotídeos não incorporados foram removidos empregando-se “elutip minicolumns” seguindo as instruções do fabricante (Scheicher & Schuell). Incubou-se à mesma temperatura de pré-hibridização durante a noite. Descartou-se a solução de hibridização contendo a sonda e lavou-se a membrana 2 vezes por 10 minutos com uma solução contendo

SSPE 2X e SDS 0,1%, à temperatura ambiente. Lavou-se uma terceira vez por 15 minutos à temperatura ambiente com uma solução contendo SSPE 1X e SDS 0,1%. Uma última lavagem foi feita por 15 minutos à temperatura de hibridização com uma solução contendo SSPE 0,1X e SDS 0,1%. Secou-se a membrana ao ar e expos-se contra filme de raio-X de 48 a 72 horas. A revelação do filme de raio-X foi feita de acordo com as instruções do fabricante das soluções de revelação (Kodak).

3.17 - Reação de marcação da sonda de oligonucleotídeo

Os oligonucleotídeos empregados como sonda para hibridização das membranas contendo DNA ("Southern Blot") estão descritos na Tabela 6. Em uma reação com volume final de 20 μ l, adicionou-se 10 pmoles de oligonucleotídeo, tampão de polinucleotídeo kinase 1X, 50 μ Ci de γ 32 P dATP. Incubou-se a 37°C por 30 minutos. A reação foi paralizada com a adição de 1 μ l de uma solução de EDTA 0,5 M. A sonda foi então adicionada à reação de hibridização.

A temperatura de hibridização para cada oligonucleotídeo foi calculada em função de seu conteúdo de adeninas, citosinas, guaninas e timidinas, empregando-se a fórmula $T_m=[4(G+C)+2(A+T)]$.

3.18 - Reação de sequenciamento automático

As reações de sequenciamento automático foram realizadas seguindo as instruções da fabricante do “FS-Dye terminator labeling Kit” (Pelkin Elmer-Applied Biosystem).

3.19 - Amplificação de DNA através da técnica de PCR (polymerase chain reaction)

As reações de amplificação foram realizadas utilizando-se dois oligonucleotídeos como "primers" na concentração de 21 pmoles para cada um. O equipamento utilizado foi PCR “DNA Thermal Cycler 480” (Perkin Elmer-Applied Biosystem). Os oligonucleotídeos foram sintetizados em máquina ABI 392 “DNA/RNA Synthesizer” (Applied Biosystem)

3.19.1 - PCR para mapeamento

As reações de amplificação foram feitas nas condições descritas na Tabela 1, empregando-se 3 µl de uma diluição 1:10 de DNA molde obtido no item 3.6, 1,25 unidades de *Taq* DNA polimerase (Promega Biotechn., Inc), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH9, 0,1% Triton X-100, 2 mM MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP e 21 pmoles de cada “primer”. A Tabela 5 mostra os pares de oligonucleotídeos empregados como “primers”.

Os produtos de PCR foram aplicados em um gel de agarose 1,2% e uma voltagem de 4 V/cm por um período necessário até que o azul de

bromofenol atingisse o final do gel. O DNA foi transferido bidirecionalmente para uma membrana de Nylon (Hybond-H, Amersham Life Science) pela técnica de “Southern blot” e posteriormente submetido à hibridização com oligonucleotídeos alelo-específicos (Tabela 6).

3.19.2 - PCR para amplificação de *cbh1-1* com *pfu* polimerase

Para amplificação do cDNA *cbh1-1* utilizou-se 2,5 unidades *pfu* polimerase (cloned *pfu*, Stratagene), 21 pmoles de oligonucleotídeos (Tabela 7), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH9, 0,1% Triton X-100, 2 mM MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP e 25 ng de um cosmídeo contendo a cópia de cDNA de *cbh1-1*. As condições de reação estão apresentadas na Tabela 2. O fragmento foi então purificado em gel de agarose, eletroeluído e limpo empregando-se “Wizard DNA clean up system Kit” (Promega Biotech., Inc.).

A ligação ao vetor KS II⁻ (Stratagene, Inc.) foi realizada utilizando 1 unidade de *T4 DNA ligase* seguindo as condições recomendadas pelo fabricante (Promega Biotech., Inc.). O sistema de ligação foi transformado em células de *E. coli* DH 5 α competentes (Library grade competent cells, Stratagene).

3.19.3 - PCR para preparação dos “competitive templates”

Genes de celobiohidrolases, *cbh1-1* a *cbh1-6*, *cbh2* e celobio desidrogenase (*cdh*) foram amplificados utilizando-se 75 ng de DNA genômico de *P. chrysosporium*, 1,25 unidades de *Taq* polimerase (Promega Biotech, Inc.), 50

mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH9, 0,1% Triton X-100, 2 mM MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP, e 21 pmoles de “primers” específicos para cada gene (Tabela 4). Veja as condições da reação na Tabela 1. Os produtos de PCR foram limpos e clonados como descrito no item 3.19.2.

3.19.4 - PCR para amplificação de cDNA e “competitive template”

Para reação de transcrição reversa utilizou-se 50 unidades de “Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase” (GIBCO BRL), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH9, 0.1% Triton X-100, 1 mM de cada dNTP, 5 mM MgCl₂, 15 pmoles de oligonucleotídeo dT₁₅ e 20 unidades de RNAsin (Promega Biotech. Inc) em um volume total de 20 µl. A amplificação ocorreu de acordo com as condições descritas na Tabela 3.

Uma alíquota de 1 µl da reação acima mencionada foi empregada em reações subsequentes de amplificação nas quais 1 µl de “competitive template”, de origem genômica, foi adicionado em diferentes concentrações (0 a 10 pico gramas), 1,25 unidades de *Taq* polimerase (Promega Biotech, Inc.), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH9, 0,1% Triton X-100, 2 mM MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP, e 21 pmoles de “primers” específicos para cada gene (Tabela 4). Esta mistura foi submetida a reação de amplificação descrita na Tabela 1. Os produtos de PCR obtidos foram separados em gel de agarose preparado com 2% de agarose (BioRad) e 1% de NuSieve agarose. O gel foi submetido à uma

corrente de 4 V/cm até que o marcador xileno cianol FF atingisse o final do gel. A coloração foi feita com brometo de etídeo e a seguir o mesmo foi fotografado. As fotografias foram digitalizadas com auxílio de um “scanner” de mesa e, posteriormente, analisadas empregando o “software” IMAGE 1.58 de domínio público desenvolvido pelo “U.S. National Institutes of Health” (NIH), obtido pela internet por FTP anônimo no endereço zippy.nih.gov. Os dados obtidos com este programa foram plotados empregando o “software” Cricket Graphic 1.53.

Tabela 1. Descrição das condições da reação para amplificação por PCR, empregadas como padrão no presente trabalho.

Temperatura (°C)	Duração (minutos)	Número de Ciclos
94	6	1
54	2	
72	40	
94	1	35
54	2	
72	5	
72	45	1

Tabela 2. Descrição das condições de reação para amplificação por PCR utilizando a enzima *pfu* polimerase, empregada para amplificação do gene *cbh1-1* de *P. chrysosporium*

Temperatura (°C)	Duração (minutos)	Número de Ciclos
94	0.75	1
94	1	25
54	2	
72	5	
72	10	1

Tabela 3. Descrição das condições de reação para transcrição reversa.

Temperatura (°C)	Duração (minutos)	Número de Ciclos
23	10	1
42	45	
95	5	

Tabela 4. Oligonucleotídeos empregados para amplificação de sequências genômicas e cDNA por PCR.

Gene	5' oligonucleotídeo (5'→3')	3' oligonucleotídeo (5'→3')
<i>cbh1-1</i> ¹	AAGATCGTACTAGACGCTAACCG	GGTGACAACGGTGAAGGTCTTCGTC
<i>cbh1-2</i> ¹	AAAGTCGTCCTCGACGTGAACTG	GGTGACGACAGTGAAGAGTTTGGTG
<i>cbh1-3</i> ²	AAGATCGTGCTCGACGCGAA	GTGACAACGGTGAAGGGCTT
<i>cbh1-4</i> ²	AAGGTCGTCCTCGACTCGAA	CGACGGTGAAGGGCTTGGAG
<i>cbh1-5</i> ²	ACCGTCGTGCTCGACTCCAA	CGACGGTGAAGGGCTTGGCTG
<i>cbh1-6</i> ²	AAGATCGTGCTCGACGCCAA	GTGACGACCGTGAACGGCTT
<i>cbh2</i> ³	AGCGCCAAC TACCAGAACTACCT	CTTCGGGGTCAACGGGGATGAAAC
<i>cdh</i> ⁴	CAGTGCGGTGGCATTGGCTG	CTGGTCGACGATGAAGGTCG

¹ COVERT *et al.* (1992a)

² COVERT *et al.* (1992b)

³ TEMPELAARS *et al.* (1994)

⁴ RAICES *et al.* (1995)

Table 5. Oligonucleotídeos empregados para amplificação gênica para o mapeamento genético.

Gene	Oligonucleotídeo (5'→3')	Referência
<i>cbh1-4</i>	CAACAGGCTGGCACCAACAC TCGCAGTAACCAGTTCCGTA	COVERT <i>et al.</i> (1992b)
<i>cbh1-5</i>	CGCTGTCCACGAAGAGTGTC GATCTCGCTGAGCGTGCCCG	COVERT <i>et al.</i> (1992b)
<i>cbh1-6</i>	CTGACGCGTCGCGACAGACA TCGTCTGTGTTGTCGTTTCGTC	COVERT <i>et al.</i> (1992b)
<i>cbh2</i>	CTGCAGGCCAAAACAGGTTTAA CTGCAGCCTATTGAGGTACCC	TEMPELAARS <i>et al.</i> (1994)
<i>cdh</i>	ATGCTAGGTCGATCGTTACTT CGTCTGGAGGTAGGTGGC	RAICES <i>et al.</i> (1995)
<i>mp1</i>	CAGACGGTACCCGCGTCACC AGTGGGAGCGGCGACATCAC	PEASE <i>et al.</i> (1989)
<i>mp2</i>	CCGACGGCACCCGCGTCAGC CGAGCGGGAGCGGCGACGCC	PRIBNOW <i>et al.</i> (1989)
<i>mp3</i>	CCGACGGTACCAAGGTCAAC AGCGGCAGCGGCGACGCGAC	ORTH <i>et al.</i> (1994)
<i>aad</i>	ATGAACATCTGGGCACCCGC CAGCGACCTTCTCGAGTGGCC	REISER <i>et al.</i> (1994)
<i>gapdh</i>	ATGCCGGTCAAAGCAGGAAT TTAGAGGGCACCGTCGACCT	HARMSSEN <i>et al.</i> (1992)
<i>β-tubulina</i>	AGGTCGTCTCAGACGAACACG GATCAGGAGAGTACCCATGCC	REY (1992)
<i>h4.2</i>	ATCATGTCTGGACGCGGCAA TTACGCGCCGAAGCCGTAGA	GESSNER & RAEDER (1992)

Tabela 6. Oligonucleotídeos empregados para diferenciação alélica dos genes no mapeamento genético. Negritos representam diferenças alélicas.

Gene	Oligonucleotídeo (5'→3')
<i>cbh1-4</i>	CGG C GAGAA C CA C CC CGG C AGAGAA C CA T CC
<i>cbh1-5</i>	GGTCG C CGAGGGTTACA GGTCG T CGAGGGTTACA
<i>cbh1-6</i>	CGG C G C CCGCGTTGGCG CGGTGCCTGCGTTGGCG
<i>cbh2</i>	AAGACCAGTGAT C CTCT AAGACCAGTGAT T CTCT
<i>cdh</i>	AATGCTTAGACAGGGCA AATGCTTAGAC G GGGCA
<i>mp1</i>	CTCTCGCTGCCATA A CT CTCTCG C CGCCATA A CT
<i>mp2</i>	GCGAT C CTGTAATTGAA GCGAT G GTGCAACTGGA
<i>mp3</i>	TTGAGGAGTACCTCGAG TTGAGGAG C ACCTCGAG
<i>aad</i>	ATGTGGTCT C CATGTAT ATGTGGTCT T CATGTAT
<i>gapdh</i>	AGCATCCATAAAGGTCG AGCATCCACA A AGGTCG
<i>β-tubulina</i>	GAACGGAAGGGACCGCT GAACGGAAG A GACCGCT
<i>h4.2</i>	TTGCCTACG C AGCTGTG TTGCCTACGTAG C CGTG

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Mapeamento de genes em *Phanerochaete chrysosporium*

A genética de *P. chrysosporium* é pouco desenvolvida em função de suas características biológicas. O fato deste fungo possuir basidiosporos binucleados e esporos assexuados multinucleados dificulta a obtenção de mutantes.

Apesar desta característica, o mapa genético de *P. chrysosporium* está sendo construído. A primeira tentativa de organizar os múltiplos genes de ligninases foi feita por RAEDER *et al.* (1989), na qual a técnica de RFLP foi empregada como ferramenta. Recentemente, uma outra metodologia foi adaptada por GASKELL *et al.* (1994), na qual genes caracterizados foram amplificados, via PCR, usando como molde DNA isolado de colônias originárias de basidiosporos e, então, os produtos da amplificação foram sequenciados. Este sequenciamento serve para mostrar mudanças de pelo menos uma base nitrogenada em uma mesma posição. Então, dentro desta região, são desenhados dois oligonucleotídeos que foram utilizados como sonda alelo-específica para verificar a segregação destes alelos dentro da

progênie de basidiosporos. Esta técnica apresenta a vantagem de poder fazer análise de vários genes sem que se tenha a necessidade de fazer diferentes cruzamentos.

Empregando-se esta metodologia e o mesmo material utilizado por GASKELL *et al.* (1994), outros genes caracterizados de *P. chrysosporium* foram pesquisados para a ampliação do mapa genético deste fungo (Tabela 5).

A Figura 2 ilustra a metodologia empregada, apresentando os resultados prévios para *cbh1-4*. "Primers" específicos para *cbh1-4* (Tabela 4) foram utilizados para ampliar o DNA genômico de 5 basidiosporos e a linhagem parental (BKM-F-1767). Os produtos de PCR foram sequenciados. Multi-alinhamento das sequências possibilitou identificar uma região a qual foi empregada como molde para sintetizar dois oligonucleotídeos alelo-específicos. Este oligonucleotídeos foram empregados como sonda para confirmar a veracidade dos mesmos e, então, analisar a segregação de *cbh1-4* dentro da progênie de basidiosporos. Este mesmo procedimento foi realizado para todos os genes analisados neste trabalho.

Os valores de recombinação apresentados na Tabela 7 mostram que não foram encontradas ligações significativas, o que era de se esperar uma vez que o mapa genético deste fungo não é saturado com marcadores. Entretanto, 3 "clusters" putativos e um outro comprovado, foram identificados.

A distância, embora grande entre *h4.2-mp3* (33,92 unidades), *h4.2-cbh1-6* (28,33) e *mp3-cbh1-6* (28,33 unidades), permitiu associar estes três

genes em um "cluster" putativo. Teste de três pontos realizado entre estes genes não foi informativo uma vez que as classes parentais, simples recombinantes (região I e II) e duplos recombinantes não puderam ser identificadas. Não descarta-se portanto, que *h4.2* possa estar ligado a estes dois outros genes. Os genes *mp3* e *cbh1-6* foram mapeados fisicamente (GASKELL *et al.*, 1994). Espera-se que o mapeamento físico de *h4.2* possa responder a esta pergunta.

O segundo "cluster" putativo identificado é composto pelos genes *cbh1-2*, *lipD* e *cbh2*. Previamente foi determinado que *cbh1-2* e *lipD* localizam-se no mesmo cromossomo (GASKELL *et al.*, 1994), o qual constitui o maior par dimórfico de *P. chrysosporium*, 4,4 Mb e 4,8 Mb. A distância entre *cbh1-2* e *lipD* é de 25 unidades. Teste de 3 pontos realizado para estes genes mostrou que o valor da interferência é negativo (-1,07), fato que em fungos, segundo FINCHAN *et al.* (1979), parece não ser um evento raro. O padrão de segregação dos alelos de *cbh1-2* e *lipD* é de 1:2 enquanto os alelos de *cbh2* segregam na proporção de 1:1. Foi observado que os alelos de alguns genes de *P. chrysosporium* localizando-se em cromossomos dimórficos apresentam segregação anômala de 1:2 (Tabela 9). A implicação desta segregação anômala no mapeamento e a razão de sua ocorrência não foi investigada em mais detalhe.

Os cromossomos dimórficos, 4,4 Mb e 4,8 Mb foram isolados e uma alíquota deste material foi utilizado como molde para a amplificação de *cbh2*.

Os produtos desta amplificação foram observados para os dois cromossomos (dato não apresentado). Entretanto, o mapeamento físico deverá confirmar este "cluster".

O terceiro "cluster" putativo é formado por *mp2*, *Pce3* (elemento transponível - STEWART, em preparação), os quais foram física e geneticamente mapeados no mesmo cromossomo dimórfico (3,7 Mb) como pode ser observado na Figura 1. Quatro elementos transponíveis de *P. chrysosporium* foram identificados e caracterizados, sendo que todos localizam-se no cromossomo maior do par dimórfico, 3,7 Mb (STEWART, em preparação). O gene que codifica para β -tubulina compõe este "cluster" putativo. Teste de três pontos mostrou que a interferência entre estes genes é igual a zero. Como para os demais "clusters" putativos acima, a confirmação da localização de β -tubulina virá com seu mapeamento físico. As distâncias de β -tubulina para *mp2*, *Pce3* e outros genes codificando para ligninases podem ser observadas na Tabela 8.

Previamente, *cbh1-4* e *cbh1-5* foram fisicamente mapeados no mesmo cromossomo, Figura 1 (GASKELL *et al.*, 1994). A distância entre estes dois genes foi determinada neste trabalho (Tabela 7). Adicionou a este cromossomo, pelo mapeamento genético, o gene que codifica para AAD (aril-álcool desidrogenase), o qual está envolvido na degradação da lignina por este fungo (REISER *et al.*, 1994). A distância entre *aad* e *cbh1-5* é de 3,38

unidades. Teste de três pontos mostrou que sua interferência para este "cluster" é igual a 1. Nenhum duplo recombinante foi observado.

A separação de cromossomos de *P. chrysosporium* e hibridização com estes genes irá contribuir para que se possa ampliar o mapa físico e genético deste fungo.

Figura 2. "Southern Blot" mostrando diferenciação alélica para *cbh1-4*. Basidiosporos 14 a 15 e 19 e, a linhagem parental *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 foram amplificados (via PCR) com "primers" específicos para *cbh1-4* (Tabela 5). Com o sequenciamento dos produtos de PCR foi possível desenhar dois oligonucleotídeos alelo-específicos (porção inferior da figura) que foram utilizados como sondas. Letras em negrito representam diferenças alélicas.

Tabela 7. Frequência de recombinação (%) entre genes de *Phanerochaete chrysosporium*. Valores em parênteses representam o número de indivíduos analisados.

gapdh	Gapdh	cdh	β -tub.	h4.2	aad	glox*	mp1	mp2	mp3	cbh1-4	cbh1-5	cbh1-6
cdh	37,71 (56)											
β -tub.	46,66 (60)	43,31 (64)										
h4.2	42,59 (54)	44,64 (56)	47,54 (61)									
aad	45,28 (53)	41,81 (55)	36,06 (61)	41,37 (58)								
glox*	43,86 (57)	38,33 (60)	46,96 (66)	40,98 (61)	49,18 (61)							
mp1	38,59 (57)	41,66 (60)	41,79 (67)	39,34 (61)	46,77 (62)	45,45 (66)						
mp2	40,00 (45)	43,75 (48)	20,75 (53)	46,15 (52)	38,77 (49)	43,36 (53)	43,39 (53)					
mp3	33,34 (54)	44,82 (58)	47,61 (63)	33,92 (56)	46,42 (56)	45,90 (61)	40,00 (60)	40,81 (49)				
cbh1-4	35,00 (60)	44,44 (63)	46,47 (71)	41,93 (62)	35,48 (62)	42,42 (66)	38,80 (67)	37,73 (53)	38,71 (62)			
cbh1-5	45,61 (57)	43,10 (58)	31,25 (64)	41,37 (58)	3,38 (59)	40,62 (64)	46,03 (63)	36,00 (50)	46,66 (60)	32,81 (64)		
cbh1-6	34,48 (58)	39,34 (61)	41,79 (67)	28,33 (60)	38,33 (60)	41,53 (65)	46,15 (65)	40,38 (52)	28,33 (60)	43,28 (67)	41,93 (62)	
cbh2	39,62 (53)	42,59 (54)	41,66 (60)	40,00 (55)	46,15 (52)	40,35 (57)	40,35 (57)	44,68 (47)	24,07 (54)	36,66 (60)	44,64 (56)	36,84 (57)

*GASKELL, J. 1995 - dados não publicados

Tabela 8. Dados mostrando as frequências de recombinação (%) entre o gene de *β -tubulina* e os genes de *liginases (lip)* e, *β -tubulina* e elementos transponíveis (Pce). Valores entre parênteses representam o número de indivíduos analisados

	<i>lipA&B</i>	<i>lipC</i>	<i>lipD</i>	<i>lipE</i>	<i>lipF</i>	<i>lipG</i>	<i>lipH</i>	<i>lipJ</i>	Pce1 ^{**}	Pce2 ^{**}	Pce3 ^{***}	Pce4 ^{***}
<i>β-tub</i>	33,82 (68)	35,93 (64)	43,93 (66)	33,33 (66)	36,73 (49)	34,28 (70)	34,28 (70)	32,85 (70)	27,86 (61)	37,93 (58)	22,64 (53)	46,15 (52)

*GASKELL *et al.* (1994)

**GASKELL *et al.* (1995)

***STEWART em preparação.

Tabela 9. Segregação de alguns genes de *Phanerochaete chrysosporium*. Valores de χ^2 para segregação dos alelos ao nível de 5% (*) para 1 grau de liberdade. Valores não significativos são representados por ns. Genes cuja segregação de seus alelos foi de 1:1 não estão incluídos nesta tabela.

Segregação	<i>cbh1-2</i>	<i>cbh1-3</i>	<i>lipD</i>	<i>lipF</i>	<i>mp1</i>	<i>glox</i>
1:1	3,26*	4,76*	9,32*	10,56*	3,76*	4,18*
1:2	1,04 ^{ns}	0,29 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,73 ^{ns}	0,58 ^{ns}

4.2 - Quantificação da transcrição de genes codificando para celobiohidrolases e celobiose desidrogenase em lascas de madeira.

O padrão de transcrição deste seis genes que codificam para CBH I, foi determinado em meio definido complementado com celulose COVERT *et al.* (1992a) e VANDEN WYMELENBERG *et al.* (1993). No entanto, o padrão de transcrição destes genes e de CBH II e CDH , em condições de cultivo próximos às condições naturais, não foi determinado até o presente momento.

Assim, no presente trabalho foi determinado o padrão de transcrição dos seis genes codificando para CBH I, um para CBH II e de um para CDH foi determinado para *P. chrysosporium* crescendo em lascas de madeira (Tabela 10). O fungo foi inoculado sobre lascas de Aspen (*Populus tremuloides*), cultivado por 10 semanas, sendo que as amostras foram coletadas a cada duas semanas começando na segunda semana. Os transcritos dos genes envolvidos no experimento, foram amplificados por PCR após transcrição reversa do mRNA em cDNA, na presença de um "competitive template".

A Figura 6 mostra o padrão eletroforético para todos os genes na semana 4. Não foram encontrados transcritos para *cbh1-2* e *cbh1-6* durante todo o período de cultivo.

Como pode ser observado na Tabela 10 e Figura 3, o padrão de transcrição dos genes codificando para CBH I quando *P. crhysosporium* é cultivado em circunstâncias próximas às condições naturais, isto é, em madeira sem nenhum suplemento, difere drasticamente quando este mesmo fungo é crescido em meio de cultura definido, suplementado com celulose (COVERT *et al.* 1992a; VANDEN WYMELENBERG *et al.*, 1993).

No trabalho de VANDEN WYMELENBERG *et al.* (1993) o transcrito mais abundante é o de *cbh1-4*, em lascas de madeira, os transcritos de *cbh1-4* foram encontrados apenas nas semanas 4, 8 e 10, em baixa quantidade. Transcritos de *cbh1-5* foram os mais abundantes a partir da semana 4 e manteve-se assim até a última semana do experimento, seguido por *cbh1-3*, *cbh1-1* e *cbh1-4*. É interessante mencionar aqui a discussão corrente na literatura, cujo produto da tradução do transcrito *cbh1-3*, CBH62 apresentaria também atividade de endoglucanase, pois ela foi capaz de degradar carboximetil celulose (UZCATEGUI *et al.*, 1991a). Sinergismo entre CBH62 e CBHI, codificada por *cbh1-4*, foi observado, o que levou UZCATEGUI *et al.* (1991a) a afirmar que elas atacam celulose de forma diferente. Um paralelo com as observações de UZCATEGUI *et al.* (1991a) e os resultados aqui obtidos, no qual o transcrito de *cbh1-3*, é o segundo mais abundante, leva a sugerir que o

produto da tradução de *cbh1-3* tem ação sinérgica com o produto da tradução de *cbh1-5*. Entretanto, esta proposição dificilmente poderá ser confirmada em decorrência da falta de metodologias capazes de isolar enzimas de substratos complexos como lascas de madeira e ainda, a falta de anticorpos específicos para as várias CBHI codificadas por *P. chrysosporium*.

Os transcritos de *cbh1-1* apresentam-se em baixas concentrações para todas as semanas avaliadas. Este perfil de transcrição observado quando *P. chrysosporium* cresce em substrato complexo, como lascas de madeira, comparado com o observado por COVERT *et al* (1992a) em meio definido suplementado com celulose, no qual *cbh1-1* é transcrito constitutivamente em baixo nível, sugere que em lascas de madeira a transcrição deste gene pode estar ocorrendo também constitutivamente. A implicação biológica deste fato ainda não é clara.

A diminuição observada durante a sexta semana na transcrição dos genes codificando para CBH I, CBHII e CDH não se trata de um artefato gerado pela baixa qualidade do mRNA obtido neste ponto, pois a amplificação do gene codificando para uma ligninase, *lipC*, foi realizado de acordo com o descrito por JANSE *et al.* (em preparação) e o padrão de transcrição encontrado foi semelhante ao descrito por estes autores (dado não apresentado). Portanto, conclui-se que há uma diminuição na transcrição dos genes relacionados a degradação da celulose. Este fato pode ter sido gerado em decorrência de produtos da degradação no meio que, de alguma forma, inibiram estes genes

ao nível transcricional. Foi determinado que o acúmulo de celobiose no meio de cultura inibe a ação de CBHs (WESTERMARK & ERIKSSON, 1974; RAICES *et al.*, 1995; LI *et al.*, 1997). Como pode ser observado na Figura 3, Figura 4 e Figura 5, na quarta semana ocorre o pico de transcrição para a maioria dos genes envolvidos neste estudo o que, em semanas subsequentes, levaria a um acúmulo de celobiose, interferindo assim com a transcrição dos mesmos na sexta semana. Entretanto, outras pesquisas sobre esta questão necessitam ser realizadas para fundamentar uma explicação para este fenômeno.

O papel que cada isozima codificada por estes genes desempenha na degradação da celulose ainda não está definido, mas acredita-se que esta multiplicidade enzimática na forma de discretas variações nas sequências dos genes que codificam para os amino-ácidos das isozimas celobiohidrolases I seja uma estratégia utilizada por *P. chrysosporium* para atacar diferentes substratos que podem ser gerados durante a degradação da celulose (COVERT *et al.*, 1992b).

A transcrição do gene que codifica celobiohidrolase II (CBH II), foi previamente detectado em diferentes meios de cultivo por TEMPELAARS *et al.* (1994), mas a quantificação deste transcrito não foi realizada. Previamente, UZCATEGUI *et al.* (1991a) caracterizaram enzimas as quais são codificadas por *cbh1-3* (CBH62), *cbh1-4* (CBH I) e *cbh2* (CBH50). A quantificação destas isozimas exportadas para o meio de cultura foi determinada apenas para CBH I

e CBH 62, sendo 12% e 3%, respectivamente (UZCATEGUI *et al.* (1991b). Não foi mencionado o valor referente a CBH50.

Assim sendo, a determinação do padrão de transcrição para *cbh2* apresentado neste trabalho, é a primeira tentativa de acessar, de forma quantitativa, o comportamento deste gene. Como pode ser observado na Tabela 11 e Figura 4, a quantidade de transcritos deste gene é bastante elevada. Embora tentadora, a comparação com o padrão de transcrição dos genes que codificam para as CBH I, não é apropriado, pois acredita-se que a forma que CBH I e CBH II atuam contra a celulose e seus derivados, seja diferente, porém sinérgica (UZCATEGUI *et al.*, 1991a; PENTTILLÄ *et al.*, 1988). A resposta de *cbh2* a estas condições de cultivo necessita ainda ser pesquisada de maneira mais direcionada. No entanto, no presente trabalho, registra-se o padrão de transcrição deste gene em meio complexo.

O padrão de transcrição de *cdh* de *P. chrysosporium* foi previamente determinado, embora não quantitativamente, em meio definido contendo celulose, celobiose e glucose como fontes únicas de carbono (LI *et al.*, 1996). Transcritos de *cdh* foram observados apenas no meio contendo celulose, tendo sido proposto que celulose ou um produto de sua degradação, estaria regulando transcricionalmente *cdh*. BAO *et al.* (1994) verificaram que a enzima CDH ocorre abundantemente no sobrenadante quando *P. chrysosporium* é crecido em meio definido contendo celulose.

Pela determinação quantitativa do padrão de transcrição de *cdh* de *P. chrysosporium* crescido em lascas de madeira, observa-se que a presença de transcritos ocorre em baixa quantidade em todas as semanas, tendo o seu pico de transcrição ocorrendo na quarta semana (Tabela 11 e Figura 5). A razão para baixos níveis de transcrição pode ser, especulativamente, inferidos como sendo pobre difusão do indutor ou substâncias presentes na madeira que inibiram *cdh* transcripcionalmente.

A degradação de um substrato como ligninocelulose leva a formação de peróxido de hidrogênio, entre outros compostos. Foi verificado por KREMER & WOOD (1992), CDH na presença de peróxido de hidrogênio e Fe^{3+} , leva a formação de radicais hidroxil, os quais são danosos ao fungo, além de atacar a celulose e madeira inespecificamente. Foi demonstrado por IGARASHI *et al.* (1997) que a celulose fica agregada ao micélio, a qual é atacada por CDH e radicais hidroxil. Então, uma forma de minimizar os danos para o fungo, devido a proximidade do micélio e estes radicais, seria diminuir a transcrição de CDH reduzindo assim a formação destes radicais hidroxil minimizando portanto, os danos que poderiam ser causados ao fungo. Entretanto, mais pesquisas precisam ser realizadas para elucidar a baixa transcrição de *cdh* e suas possíveis implicações na questão acima mencionada, em condições complexas, como crescimento em lascas de madeira.

Os dados aqui apresentados, associados aos dados reportados por COVERT *et al.*, (1992a), VANDEN WYMELENBERG *et al.*, (1993) e SIMS *et al.*

(1994) para celobiohidrolases e, por STEWART *et al.* (1992) e JANSE *et al.* (no prelo) para as ligninases, indicam que diferentes condições de cultivo levam a transcrição de diferentes genes em diferentes níveis. Acredita-se que o isolamento e cristalização de celulases e estudos com difração de raio-X possam vir a contribuir para o esclarecimento da especificidade destas isozimas aos substratos (KOCH *et al.*, 1993). Esta diferença em especificidade foi observada por PENTTILÄ *et al.* (1988) quando ensaiaram CBH I e CBH II de *T. reesei* expressas em *S. cerevisiae* em β -glucana isolada de cervada. A enzima CBH I não apresentou atividade neste substrato.

Tabela 10. Concentração em picogramas (pg) dos transcritos de genes codificando para CBH I de *Phanerochaete chrysosporium* após cultivo por diferentes intervalos de tempo em lascas de madeira. Não foi observado transcrição para *cbh1-2* e *cbh1-6*.

Gene	Concentração dos transcritos (pg)				
	Semana				
	2	4	6	8	10
<i>cbh1-1</i>	0.36	0.47	0.14	0.32	0.12
<i>cbh1-3</i>	1.87	2.43	0.26	1.81	0.25
<i>cbh1-4</i>	n/d**	0.10	n/d**	0.08	0.03
<i>cbh1-5</i>	0.44	3.30	0.33	2.35	1.61

** não detectado

Tabela 11. Concentração em picogramas (pg) dos transcritos de genes que codificam para CBH II e CDH de *Phanerochaete chrysosporium* após cultivo por diferentes intervalos de tempo em lascas de madeira.

Gene	Concentração de transcritos (pg)				
	Semana				
	2	4	6	8	10
<i>cbh2</i>	2.68	5.96	0.67	3.51	5.62
<i>cdh</i>	0.20	1.55	0.10	0.45	0.29

Figura 3. Variação da transcrição dos genes codificando para CBH I de *Phanerochaete chrysosporium* de acordo com o período de cultivo em lascas de madeira. No eixo Y, a concentração é dada em picogramas. Nota-se a prevalência dos transcritos de *cbh1-5* a partir da 4ª semana sobre os demais transcritos, seguido por *cbh1-3*, *cbh1-1* e *cbh1-4* respectivamente.

Figura 4. Gráfico mostrando a variação da transcrição do gene que codifica para CBH II de *Phanerochaete chrysosporium* no período de 10 semanas de cultivo em lascas de madeira. No eixo Y, a concentração é dada em picogramas.

Figura 5. Variação da transcrição do gene que codifica para CDH de *Phanerochaete chrysosporium* no período de 10 semanas de cultivo em lascas de madeira. No eixo Y, a concentração é dada em picogramas. Nota-se o pico da transcrição ocorrendo na quarta semana.

Figura 6. Painel mostrando o padrão de transcrição de *cbh1-1*, *cbh1-3*, *cbh1-4*, *cbh1-5*, *cbh2* e *cdh* após a quarta semana. Números à esquerda indicam tamanho molecular, em pares de bases, do produto de PCR para o "competitive template" (superior) e do transcrito (inferior). Números na parte de baixo indicam quantidade em picogramas de "competitive template" adicionada em cada reação de amplificação.

4.3 - Clonagem e expressão do gene *cbh1-1* de *Phanerochaete chrysosporium* em *Saccharomyces cerevisiae*

A clonagem e expressão de genes de celulasas em *S. cerevisiae* tem sido feita com a expectativa de se obter um microrganismo capaz de sacarificar celulose e, em seguida, por fermentação, converter a glicose produzida em etanol (PENTTILÄ *et al.*, 1987, 1988).

Para os genes das celobiohidrolases de *P. chrysosporium* (CBHs), a clonagem e expressão efetiva dos mesmos em *S. cerevisiae* representa, além da contribuição acima citada, também uma alternativa importante para elucidar o papel dos múltiplos genes envolvidos na produção destas enzimas, supostamente desempenhando a mesma função. São seis genes distintos que codificam para celobiohidrolase I. O papel que cada produto gênico tem na degradação da celulose ainda não está definido mas, acredita-se que esta seria a estratégia pelo qual este microrganismo atacaria diferentes substratos. (COVERT *et al.*, 1992a). Em *T. reesei*, acredita-se que a clivagem de celulasas ocasiona a separação do “hinge” e “cellulose binding domain” do domínio catalítico por proteases, quando a cultura está envelhecida, e esta seria a estratégia para atacar diferentes substratos celulósicos formados durante a degradação da celulose (KNOWLES *et al.*, 1987). Em *P. chrysosporium*, não se tem observado ataque de proteases contra as CBHs. Entretanto, COVERT *et al.* (1992a), propoem que o produto de *cbh1-1* pode

executar este papel uma vez que este gene não codifica para as sequências de aminoácidos do “hinge” e “cellulose binding domain”.

Devido a suas características, *cbh1-1* foi escolhido para iniciar o estudo de expressão heteróloga destes genes codificando para CBHs em *S. cerevisiae*.

O cosmídio AV12 contendo a sequência de cDNA de *cbh1-1* foi empregado como molde para a amplificação deste gene, via PCR. Os oligonucleotídeos utilizados como “primers” estão descritos na Tabela 12. Empregou-se *pfu* polimerase (“cloned” *pfu*, Stratagene), nas condições descritas na Tabela 2. Optou-se por utilizar *pfu* uma vez que esta enzima tem capacidade de edição, fazendo assim a correção de possíveis “mismatches”. O produto de PCR obtido foi de aproximadamente 1495 bp. Este fragmento foi clonado no plasmídio pCBH (cedido por RENSBURG *et al.*, 1996). O plasmídio resultante, pCBH1-1, foi amplificado por transformação em *E. coli* DH5 α , sendo que os plasmídios recuperados foram sequenciados para verificação da orientação do inserto. Foram considerados na orientação correta, aqueles clones que apresentaram o codon iniciador, ATG, “downstream” do promotor de PGK (3-fosfoglicerato kinase, HITZEMAN *et al.*, 1982).

A levedura *S. cerevisiae* Y294 (cedida por RENSBURG *et al.*, 1996) foi transformada com o plasmídio resultante, pCBH1-1, usando como marcador de seleção o gene URA3. Aproximadamente, 200 clones foram isolados e, aleatoriamente, recuperou-se o plasmídeo pCBH1-1 o qual foi usado para

transformar *E. coli*. Os plasmídios recuperados em bactéria foram submetidos à amplificação utilizando os “primes” da Tabela 12 e digestão com *EcoRI* (dados não apresentados). Os dois métodos confirmaram que os plasmídios recuperados eram o pCBH1-1. O mesmo procedimento foi realizado para clones contendo o plasmídio pCBH, controle positivo, carregando o gene *cbh1-4* (RENSBURG *et al.*, 1996).

As leveduras recombinantes foram avaliadas em placas de Petri contendo 0,1% de carboximetil celulose (CMC), hidroxietil celulose (HEC) e β -glucana isolada de cevada (barley β -glucan) seguido por coloração com Vermelho Congo nas mesmas condições descritas por RENSBURG *et al.* (1996). Não foi possível diferenciar as colônias contendo os plasmídios pCBH e pCBH1-1 das colônias não transformadas. Este resultado discorda dos observados por RENSBURG *et al.* (1996), que evidenciaram halos de degradação para os clones contendo pCBH e a fusão *cbh1-4* de *P. chrysosporium* e *end1* de *B. fibrisolvens*. Entretanto, estes resultados estão de acordo com o observado por PENTTILÄ *et al.* (1988) nos quais clones de levedura carregando genes que codificam para CBHI e CBHII de *T. reesei* não produziram halos de degradação em meio contendo HEC e CMC. Foi verificado que houve diferença de afinidade destas enzimas com relação ao substrato β -glucana isolada de cevada, pois halos de degradação foram verificados somente para os clones expressando a enzima CBHII.

Foi realizado “Northern Blot” de clones escolhidos ao acaso, utilizando RNA total. O cDNA de *cbh1-1*, foi utilizado como sonda para verificar a presença de transcritos deste gene na população de RNA de levedura. Como controle interno, empregou-se um produto de PCR de *gapdh* (glicaraldeído-3-fosfato desidrogenase, HOLLAND AND HOLLAND, 1979). O resultado apresentado na Figura 7 mostra que transcritos (~1,4 Kb) são observados para os clones contendo o genes *cbh1-1* e transcritos para *gapdh* (~980 bp) são observados em todos os poços. Não houve hibridização cruzada entre a sonda de *cbh1-1* e os transcritos de *cbh1-4*. As bandas relacionadas a *gapdh* mostram que as condições que o experimento foi realizado foram satisfatórias. Ainda um experimento no qual a primeira fita de cDNA sintetizada foi submetida à amplificação empregando os “primers” descritos na Tabela 4, mostrou que havia uma grande quantidade de transcritos de *cbh1-1* e *cbh1-4* (dados não mostrados).

A presença de transcritos trouxe a possibilidade de que o mRNA de *cbh1-1* pudesse estar sendo traduzido porém, a proteína produzida estaria ficando retida no interior das células. Portanto, extratos celulares de culturas crescidas durante a noite foram feitos e submetidos a eletroforese em um mini gel (PhastSystem, Pharmacia Biotech.). As bandas observadas para as linhagens contendo *cbh1-1* e *cbh1-4* foram exatamente as mesmas observadas para a linhagem não transformada (dados não apresentados). Portanto, não houve o aparecimento de bandas extras para as linhagens transformadas.

Conforme descrito por PENTTILÄ *et al.* (1988), o resultado esperado para celobiohidrolase seriam bandas maiores em função da glicosilação da proteína feita por *S. cerevisiae*. Glicosilação também foi observada para duas endoglucanases de *T. reesei* (PENTTILÄ *et al.*, 1987) e para uma celobiohidrolase (*cbh1*) de *Penicillium janthinellum* (KOLCH *et al.*, 1993) expressas em *S. cerevisiae*. Um ensaio mais longo foi realizado para verificar a presença da enzima no meio de cultura. Para tal, as leveduras recombinantes e não recombinantes foram crescidas em meio YPD com 0.8% de glucose de acordo com o descrito por RENSBURG *et al.* (1996). Este ensaio foi realizado por 96 horas com amostras sendo retiradas a cada 24 horas, com duas repetições. O sobrenadante livre de células foi concentrado 10 vezes (Amicon, Beverly, MA, E.U.A.) e submetido a ensaios enzimáticos de acordo com o descrito por RENSBURG *et al.* (1996). Os substratos celulósicos empregados nestes ensaios foram CMC, HEC, β -glucana isolada de cevada e celulose cristalina (Avicel). Os resultados obtidos mostraram que não houve a exportação das enzimas para o meio de cultura pois, não foi possível detectar atividade enzimática para nenhum dos transformantes e, como esperado, nem para as células não transformadas. Este resultado discorda dos encontrados por RENSBURG *et al.* (1996), nos quais 12,03 unidades da enzima codificada por *cbh1-4* foram detectadas quando o sobrenadante da cultura contendo o plasmídio pCBH foi ensaiado contra β -glucana isolada de cevada. O conflitante nesta situação foi que mesmo o clone cedido por RENSBURG *et al.* (1996) não

apresentou atividade contra nenhum dos substratos empregados, inclusive β -glucana isolada de cevada.

As dificuldades observadas para identificar e quantificar a expressão de genes isolados de *P. chrysosporium* codificando para celobiohidrolases em *S. cerevisiae* mostram que novas estratégias de construção de sistemas de expressão devem ser traçadas para que este objetivo possa ser alcançado.

Tabela 12. Oligonucleotídeos empregados como “primers” para amplificação de *cbh1-1* (linhas 1 e 2) e, oligonucleotídeo empregado para sequenciamento da junção *cbh1-1* e PGKt (linha 3). Sequências sublinhadas representam o sítio de *EcoRI*. Codon em negrito representam codon de iniciação (linha 1) e codon de terminalização (linha 2)

Codon de iniciação	5' GATCGAATTCATGGTCGATATACAGTTGCA 3'
Codon de terminalização	5' GATCGAATTCTCACGCAGGCCTGAACGTCG 3'
Oligo para o sequenciamento	5' CGCGCGGGATGTGTTCCATC 3'

Figura 7. “Northern Blot” mostrando resultado da hibridização com a sequência de cDNA de *cbh1-1* (1,4 Kb) e o gene de GAPDH (980 bp) contra RNA total. Poços 1 a 6, clones que foram transformados com pCBH1-1; poço 7, clone transformado com pCBH; poço 8, linhagem Y294 de levedura. Nota-se que a banda referente a GAPDH está presente em todos os poços. A banda relativa ao transcrito de *cbh1-1* é observada apenas nos poços de 1 a 6

5. CONCLUSÕES

Na análise de ligação entre 13 marcadores genéticos de *P. chrysosporium* foi possível identificar ligação de 3,38 unidades entre *aad* e *cbh1*-5. Entretanto, para os outros marcadores analisados, nenhuma ligação significativa pode ser determinada. A atribuição destes marcadores aos seus respectivos cromossomos pelo mapeamento físico poderá, no futuro, auxiliar no mapeamento de outros genes.

O padrão de transcrição de genes que codificam para celulasas (*cbhs* e *cdh*) em *P. chrysosporium* difere em meio definido suplementado com celulose e meio complexo, evidenciando que a expressão de diferentes celulasas neste fungo, pode ser modulada de acordo com as aplicações desejadas.

O sistema de expressão descrito por RENSBURG *et al.* (1996) em *S. cerevisiae* não foi adequado para a expressão de *cbh1*-1 de *P. chrysosporium*. Com o plasmídio pCBH, utilizado como controle positivo, não foi possível reproduzir os resultados apresentados por estes autores. Esta constatação

leva a sugerir que um novo vetor de expressão de celobiohidrolase de *P. chrysosporium* em levedura deva ser planejado.

A informação sobre as diferentes celobiohidrolases, pela caracterização individualizada e pela expressão heteróloga, associada a um maior número de marcadores e conhecimento do comportamento do fungo em diferentes substratos, auxiliará na construção de linhagens de *P. chrysosporium* de acordo com as necessidades de aplicação deste sistema biológico em processos biotecnológicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEBAL, C.; CASTILLON, M.P.; ESTRADA, P. Endoglucanase and β -glucosidase location in *Trichoderma reesei* QM9414 growing on different carbon sources. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.10, p.1-5, 1988a.
- ACEBAL, C.; ARCHE, R.; CASTILLON, M.P.; ESTRADA, P.; ROMERO, D. β -glucosidase production by *Trichoderma reesei* QM9414 on wheat straw. Location and some kinetic features. **Acta Biotechnologica**, v.8, p.341-348, 1988b.
- ALIC, M.; GOLD, M.H. Genetic recombination in the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, p.27-30, 1985.
- ALIC, M.; LETZRING, C.; GOLD, M.H. Mating system and basidiomycete formation in the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.1464-1469, 1987.
- BAO, W.; RENGANATHAN, V. Cellobiose dehydrogenase of *Phanerochaete chrysosporium* enhances crystalline cellulose degradation by cellulases. **FEBS Letters**, v.302, p.77-80, 1992.
- BAO, W.; LYMAR, E.; RENGANATHAN, V. Production of cellobiose dehydrogenase and β -glucosidase by the cellulose-degrading cultures of *Phanerochaete chrysosporium* in shake flasks. **Applied and Environmental Microbiology**, v.42, p.642-646, 1994.

- BÉGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Review in Microbiology**, v.44, p.219-248, 1990.
- BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v.7, p.1513, 1979
- BOGAN, B.W.; SCHOENIKE, B.; LAMAR, R.T.; CULLEN, D. Manganese peroxidase mRNA and enzyme activity levels during bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil with *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.2381-2386, 1996a.
- BOGAN, B.W.; SCHOENIKE, B.; LAMAR, R.T.; CULLEN, D. Expression of *lip* genes during growth in soil and oxidation of anthracene by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.3697-3703, 1996b.
- BRODA, P.; BIRCH, P.; BROOKS, P.; COPA-PATÍÑO, J.L.; SINNOTT, M.L.; TEMPELAARS, C.; WANG, Q.; WYATT, A.; SIMS, P.F.G. *Phanerochaete chrysosporium* and its natural substrate. **FEMS Microbiology Reviews**, v.13, p.189-196, 1994.
- BROWN JUNIOR, R.M. (Ed.) **Cellulase and natural polymer systems biogenesis, structure and degradation**. New York: Plenum Press, 1982. v.1
- BURDSALL JUNIOR, H.H.; ESLYN, W.E. A new *Phanerochaete* with a *Chrysosporium* imperfect state. **Mycotaxon**, v.1, p.123-133, 1974.
- BURDSALL JUNIOR, H.H. The taxonomy of *Sporotrichum pruinosum* and *Sporotrichum pulverulentum*/ *Phanerochaete chrysosporium*. **Mycologia**, v.73, p.675-80, 1981.
- CHIRICO, W.J.; BROWN JUNIOR, R.D. Purification and characterisation of a β -glucosidase from *Trichoderma reesei*. **European Journal of Biochemistry**, v.165, p.333-341, 1987.

- CORVET, S.F.; VANDEN WYMELENBERG, A.; CULLEN, D. Structure, organization and transcription of a cellobiohydrolase gene cluster from *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.2168-2175, 1992a.
- CORVET, S.F.; BOLDUC, J.; CULLEN, D. Genomic organization of a cellulase gene family in *Phanerochaete chrysosporium*. **Current Genetics**, 22, p.407-413, 1992b.
- COUGHALN, M. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. In: RUSSEL, G.E. (Ed.) **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**. Newcastle upon Tyne: Intercept, 1985. p.39-109.
- DESHPANDE, V.; ERIKSSON, K.E.; PETTERSSON, B. Production, purification and partial characterisation of 1,4- β -glucosidase enzymes from *Sporotrichum pulverulentum*. **European Journal of Biochemistry**, v.90, p.191-198, 1978.
- ELLISTON, K.O.; YABLONSKY, M.D.; EVELEIGH, D.E. Insights through recombinant DNA approaches. **A.C.S. Symposium Series**, v.460, p.290-300, 1991.
- ENARI, T.M.; NIKU-PAAVOLA, M.C.; WOOD, T.M. Enzymatic hydrolysis of cellulose: is the current theory of the mechanisms of hydrolysis valid? **C.R.C. Critical Reviews in Biotechnology**, v.5, p.67-87, 1987.
- ERIKSSON, K.E.; PETTERSSON, B. Extracellular enzyme system utilised by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. 1. Separation, purification and physico-chemical characterisation of five endo-1,4- β -glucosidases. **European Journal of Biochemistry**, v.51, p.193-206, 1975a.
- ERIKSSON, K.E.; PETTERSSON, B. Extracellular enzyme system utilised by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. 3. Purification and physico-chemical characterisation of an exo-1,4- β -glucosidase. **European Journal of Biochemistry**, v.51. p.213-218, 1975b.

- ERIKSSON, K.E.; WOOD, T.M. In: HIGUCHI, T. (Ed.) **Biosynthesis and degradation of wood components**. Orlando: Academic Press, 1985. 679p.
- ERIKSSON, K.E.; PETTERSSON, B. Endo-1,4- β -glucosidases of *Sporotrichum pulverulentum*. **Methods in Enzymology**, v.160, p.368-382, 1988.
- FINCHAN, J.R.S.; DAY, P.R.; RADFORD, A. **Fungal Genetics**. 4ed. Berkeley. University of California Press, 1979. 636 p.
- FOWLER, T. Recombinant β -glucosidase of *Trichoderma reesei*. **A.C.S. Symposium Series**, v.516, p.233-242, 1993
- GASKELL, J.; DIEPERINK, E.; CULLEN, D. Genomic organization of lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.599-603, 1991.
- GASKELL, J.; VANDEN WYMELENBERG, A.; STEWART, P.; CULLEN, D. Method to identify specific alleles of a *Phanerochaete chrysosporium* gene encoding lignin peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58:1379-1381, 1992.
- GASKELL, J.; STEWART, P.; KERSTEN, P. J.; COVERT, S.F.; REISER, J.; CULLEN, D. Establishment of genetic linkage by allele-specific PCR: application to the lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*. **Bio/Technology**, v.12, p.1372-1375, 1994.
- GASKELL, J.; VANDEN WYMELENBERG, A.; CULLEN, D. Structure, inheritance, and transcriptional effects of Pce1, an insertional element within *Phanerochaete chrysosporium* lignin peroxidase gene *lipl*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.7465-7469, 1995.
- GESSNER, M.; RAEDER, U. Histone H4 genes and putative regulatory sequences in *Phanerochaete chrysosporium*. Número de acesso da sequência (EMBL) Z15135. Não publicado. 1992.

- GILLILAND, G.; PERRIN, S.; BUNN, H. Competitive PCR for quantitation of mRNA. In: INNIS, D; GELFAND, D.; SNINSKY, J.; WHITE, T. (Ed.). **PCR Protocols**. New York: Academic Press, Inc., 1990. p.60-69.
- GOLD, M.H.; CHENG, T.M.; MAYFIELD, M.B. Isolation and complementation studies of auxotrophic mutants of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.44, p.996-1000, 1982.
- GOMES, I.; GOMES, J.; STEINER, W.; ESTERBAUER, H. Production of cellulase and xylanase by wild strain of *Trichoderma viride*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.36, p.701-707, 1992.
- GRITZALI, M.; BROWN JUNIOR, R.D. The cellulase system of *Trichoderma*: relation between purified extracellular enzymes from induced and cellulose grown cells. **Advances in Chemistry Series**, v.181, p.237-60, 1979.
- HARMSSEN, M.C.; SCHUREN, F.H.; MOUKHA, S.M.; VAN ZUILEN, C.M. PUNT, P. J.; WESSELS, J.G. Sequence analysis of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes from the basidiomycete *Schizophyllum commune*, *Phanerochaete chrysosporium*, and *Agaricus bisporus*. **Current Genetics**, v.22, p.447-454, 1992.
- HERIKSSON, G.; ANDER, P.; PETTERSSON, B.; PETTERSSON, G. Cellobiose dehydrogenase (cellobiose oxidase) from *Phanerochaete chrysosporium* as a wood-degrading enzyme: studies on cellulose, xylan and synthetic lignin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.42; p.790-796, 1995.
- HENRISSAT, B; DRIIGUEZ, H.; VIET, C.; SCHÜLEIN, M. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. **Bio/Technology**, v.3, p.722-6, 1985.

- HITZEMAN, R.A.; HAGIE, F.E.; HAYFLICK, J.S.; CHEN, C.Y.; SEEBURG, P.H.; DERYNCK, R. The primary structure of the *Sacharomyces serevisiae* gene for 3-phosphoglycerate kinase. **Nucleic Acids Research**, v.10, p.7791-7808, 1982.
- HOFER, F.; WEISSINGER, E.; MISCHACK, M.; MESSNER, R.; MEIXNER-MONORI, B.; BLAAS, D.; VISSER, J.; KUBICEK, C.P. A monoclonal antibody against the alkaline extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei*: reactivity with others *Trichoderma* β -glucosidases. **Biochemistry et Biophysica Acta**, v.992, p.298-306, 1989.
- HOLLAND, J. P.; HOLLAND, M. J. the primary structure of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biology and Chemistry**, v.254, p.9839-9845, 1979.
- IGARASHI, K.; SAMEJIMA, M.; SABURI, Y.; HABU, N.; ERIKSSON, K.E. Localisation of cellobiose dehydrogenase in cellulose-grown cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Fungal Genetics and Biology**, v.21, p.214-222, 1997.
- INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNNINSKY, J.J.; WHITEE, T.J. 1990. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press. 482 p.
- JOHNSON, E.A.; REESE, E.T.; DEMAINE, A.L. Inhibition of *Clostridium thermocellum* cellulase by end products of cellulolysis. **Journal of Applied Biochemistry**, v.4, p.64-71, 1982.
- JOHNSRUD, S. C.; ERIKSSON, K.E. Cross-breeding of selectes and mutated homokaryotic strains of *Phanerochaete chrysosporium* K-3: new cellulase deficient strains with increased ability to degrade lignin. **Applied Environmental Microbiology**, v.21, p.320-7, 1985.
- KAISER, C.; MICHAELIS, S.; MITCHELL, A. **Methods in yeast genetics: a cold spring harbor laboratory manual, 1994 edition**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. 234 p.

- KREMER, S. M.; WOOD, P. M. production of Fenton's reagent by cellobiose oxidase from cellulytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **European Journal of Biochemistry**, v.208, p.807-814, 1992.
- KNOWLES, J.; LEHTOVAARA, P.; TEERI, T. Cellulase families and their genes. **Trend in Biotechnology**, v.5, p.255-261, 1987.
- KOLAR, H.; MISCHAK, H.; KAMMEL, W.P.; KUBICEK, C.P. Carboxymethylcellulase and β -glucosidase secretion by protoplast of *Trichoderma reesei*. **Journal of General Microbiology**, v.131, p.1339-47, 1985.
- KOLCH, A.; WEIGEL, C. T. O; SCHULZ, G. Cloning, sequencing, and heterologous expression of a cellulase-encoding cDNA (*cbh1*) from *Penicillium janthinellum*. **Gene**, v.124, p.57-65, 1993.
- KUBICEK, C.P. Involvement of a conidial endoglucanase and plasma-membrane-bound β -glucosidase in the induction of endoglucanase synthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*. **Journal of General Microbiology**, v.133, p.1481-87, 1987.
- KUBICEK, C.P. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. **Advances in Biochemistry and Engineering/Biotechnology**, v.45, p.1-27, 1992.
- LAMAR, R.T.; SCHOENIKE, B.; VANDEN WYMELENBERG, A.; STEWART, P.; DIETRICH, D. M.; CULLEN, D. Quantification of fungal mRNAs in complex substrates by Reverse Transcription PCR and its application to *Phanerochaete chrysosporium*-colonized soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.2122-2126, 1995.
- LI, B.; NAGALLA, S.R.; RENGANATHAN, V. Cloning of a cDNA encoding cellobiose dehydrogenase, a hemoflavoenzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.1329-1335, 1996.

- LI, B.; NAGALLA, S. R.; RENGANATHAN, V. Cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* is encoded by two allelic variants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.796-9, 1997.
- MINAMIGUCHI, K.; OOI, T.; KAWAGUCHI, T.; OKADA, H.; MURAO, S.; ARAI, M. Secretive expression of the *Aspergillus aculeatus* cellulase (FI-CMCase) by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.79, p.363-366, 1995.
- MISHRA, S.; RAO, S.; DEB, J.K. Isolation of a mutant of *Trichoderma reesei* showing reduced levels of extracellular β -glucosidase. **Journal of General Microbiology**, v.135, p.3459-3469, 1989.
- MORAG, E.; HALEVY, I.; BAYER, E.A.; LAMED, R. Isolation and properties of a major cellobiohydrolase from the cellulosome of *Clostridium thermocellum*. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.4155-4162, 1991.
- OOI, T.; SHINMYO, A.; OKADA, H.; HARA, S.; IKENAKA, T.; MURAO, S.; ARAI, M. Cloning and sequence analysis of a cDNA for cellulase (FI-CMCase) from *Aspergillus aculeatus*. **Current Genetics**, v.18, p.:217-222, 1990.
- ORTH, A. B.; RZHETSKAYA, M.; CULLEN, D.; TIEN, M. Characterization of a cDNA encoding a manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: genomic organization of lignin and manganese peroxidase-encoding genes. **Gene**, v.148, p.161-165, 1994.
- PEASE, E. A.; ANDRAWIS, A.; TIEN, M. Manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biology and Chemistry**, v.264, p.13531-13535, 1989.
- PENTTILÄ, M.E.; ANDRÉ, L.; SALOHEIMO, M.; LEHTOVAARA, P.; KNOWLES, J.C. Expression of two *Trichoderma reesei* endoglucanases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.3, p.175-185, 1987.

- PENTTILÄ, M.E.; ANDRÉ, L.; LEHTOVAARA, P.; BAILEY, M.; TEERI, T.T.; KNOWLES, J.C. Efficient secretion of two cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v.63, p.103-112, 1988.
- PRIBNOW, D.; MAYFIELD, M.B.; NIPPER, V.J.; BROWN, J.A.; GOLD, M.H. Characterization of a cDNA encoding a manganese peroxidase, from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biology and Chemistry**, v.264, p.5036-5040, 1989.
- RAEDER, U.; BRODA, P., Comparison of the lignin-degrading white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Sporotrichum pulverulentum* at the DNA level. **Current Genetics**, v.8, p.499-506, 1984.
- RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v.1, p.17-20, 1985.
- RAEDER, U.; THOMPSON, W.; BRODA, P. RFLP-based genetic map of *Phanerochaete chrysosporium* ME446: lignin peroxidase genes occur in clusters. **Molecular Microbiology**, v.3, p.911-918, 1989.
- RAICES, M.; PAIFER, E.; CREMATA, J.; MONTESINO, R.; STÄHLBERG, J.; DIVINE, C.; SZABÓ, I. J.; HENRIKSSON, G.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G. Cloning and characterization of a cDNA encoding a cellobiose dehydrogenase from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v.369, p.233-238, 1995.
- REISER, J.; MUHEIM, A.; HARDEGGER, M.; FRANK, G.; FIECHTER, A. Aryl-alcohol dehydrogenase from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biology and Chemistry**, v.269, p.28152-28159, 1994.
- RENSBURG, P.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Co-expression of a *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase gene and a *Butyrivibrio fibrisolvens* endo- β -1,4-glucanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, v.30, p.246-250, 1996.

REY, M. W. Comunicação pessoal, 1992.

ROSENBERG, S.L. Cellulose and lignocellulose degradation by thermophilic and thermotolerant fungi. **Mycologia**, v.70, p.1-13, 1978.

RUTTERSMITH, L.D.; DANIEL, R.M. Thermostable cellobiohydrolase from the thermophilic eubacterium *Thermotoga* sp strain FjSS3-B.1. **Biochemistry Journal**, v.277, p.887-890, 1991.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v.3

SANDHU, D.K.; SIDHI, M.S. Production, localisation and glucose repression of β -glucosidase from *Trichoderma longibrachiatum*. **Journal of Basic Microbiology**, v.5, p.591-598, 1985.

SANDHU, D.K.; SIDHU, M.S. Hyper-production of β -glucosidase by mutants of *Trichoderma harzianum*. **Acta Microbiologica Polonica**, v.35, p.97-100, 1986.

SIDHU, M.S.; SANDHU, D.K. Production and localisation of β -glucosidase in *Trichoderma harzianum* and some aspects of catabolite repression. **Canadian Journal of Microbiology**, v.30, p.1377-1382, 1984.

SIMS, P.F.L.; JAMES, C.C.; BRODA, P. The identification, molecular cloning and characterisation of a gene from *Phanerochaete chrysosporium* that shows strong homology to the exocellobiohydrolase I gene from *Trichoderma reesei*. **Gene**, v.74, p.411-422, 1988.

SIMS, P. F. G.; SOARES-FELIPE, M. S.; WANG, Q.; GENT, M. E.; TEMPELAARS, C.; BRODA, P. Differential expression of multiple exo-cellobiohydrolase I-like genes in the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Molecular Microbiology**, v.12, p.209-216, 1994.

SOUZÉ, E.; NTODOU-THOMÉ, A.; TRAN, C.Y.; ROSTÈNE, W.; FORGEZ, P. Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. **BioTechniques**, v.21, p.280-285, 1996.

- STASPERS, J.A. Identification of wood-inhabiting *Aphylllophorales* in pure culture. **Studies in Mycology**, v.16, p.1-248, 1978.
- STALPERS, J.A. A revision of the genus *Sporotrichum*. **Studies in Mycology**, v.24, p.1-105, 1984.
- STERNBERG, D.; MANDELS, G. Introduction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. **Journal of Bacteriology**, v.139, p.761-769, 1979.
- STEWART, P.; KERSTEN, P.; VANDEN WYMELEMBERG, A.; GASKELL, J.; CULLEN, D. Lignin Peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*: complex regulation by carbon and nitrogen limitation a identification of a second dimorphic chromosome. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.5036-5042, 1992.
- STEWART, P.; WHITWAN, R. E.; KERSTEN, P.; CULLEN, D.; TIEN, M. Efficient expression of a *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase gene in *Aspergillus oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.860-864, 1996.
- SZAKMARY, K.; WOTAWA, A.; KUBICEK, C.P. Origin of oxidised cellulose degradation products and mechanism of their promotion of cellobiohydrolase I biosynthesis in *Trichoderma reesei*. **Journal of General Microbiology**, v.137, p.2873-2878, 1991.
- TEATHER, R.M.; WOOD, P.J. Use of Congo Red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen, **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.41-46, 1982.
- TEMPELAARS, C.A.M.; BIRCH, P.R.J.; SIMS, P.F.G.; BRODA, P. Isolation, characterization, and analysis of the expression of the *cbhII* gene of *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.4387-4393, 1994.
- TIEN, M.; TU, C.P.D. Cloning and sequencing of a cDNA for ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Nature**, v.326, p.520-3, 1997.

- UMILE, C.; KUBICEK, C.P. A constitutive, plasma-membrane-bound β -glucosidase in *Trichoderma reesei*. **FEMS Microbiology Letters**, v.34, p.291-295, 1986.
- UZCATEGUI, E.; RUIZ, A.; MONTESINO, R.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G. The 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*. I. A system of synergistically acting enzymes homologous to *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**, v.19, p.271-286, 1991a.
- UZCATEGUI, E.; RAICES, M.; MONTESINO, R.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G.; ERIKSSON, K.E. Pilot-scale production and purification of the cellulolytic enzyme system from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.13, p.323-334, 1991b.
- VAHERI, M.P. Oxidation as a part of degradation of crystalline cellulose by *Trichoderma reesei*. **Journal of Applied Biochemistry**, v.4, p. 356-363, 1982.
- VAN ARSDELL, J.N.; KWOK, S.; SCHWEICKART, V.L.; LADNER, M.B.; GELFAND, D.H.; INNIS, M.A. Cloning, characterisation, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of endoglucanase I from *Trichoderma reesei*. **Bio/Technology**, v.5, p.60-64, 1987.
- VANDEN WYMELENBERG, A.; COVERT, S.F.; CULLEN, D. Identification of the gene encoding the major cellobiohydrolase of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.3492-3494, 1993.
- WESTERMARK, U.; ERIKSSON, K.E. Cellobiose: quinone oxidoreductase, a new wood degrading enzyme from white-rot fungi. **Acta Chemica Scandinavica**, v.B28, p.209-214, 1974.
- ZACHAR, V.; THOMAS, R. A.; GOUSTIN, S. Absolute quantification of target DNA: a simple competitive PCR for efficient analysis of multiple samples. **Nucleic Acid Research**, v.21, p.2017-2018, 1993.