

FUSÃO DE PROTOPLASTOS ENTRE *Penicillium echinulatum* E *Trichoderma harzianum* PARA OBTENÇÃO DE VARIABILIDADE NA PRODUÇÃO DE CELULASES

Tatiane Cristina Rech (iniciação profissional), Aldo José Pinheiro Dillon (orientador), Bárbara Lizandra Perini de Souza - Laboratório de Processos Biotecnológicos I/Instituto de Biotecnologia/UCS - tatirech@hotmail.com

Neste trabalho utilizou-se a fusão de protoplastos para combinar genótipos de mutantes celulolíticos de *Penicillium echinulatum* (S1B9) e *Trichoderma harzianum* (AS5), utilizando a técnica do doador morto (inativação por calor). Foram testados diferentes tratamentos enzimáticos para obtenção de protoplastos: complexo enzimático Glucanex® (10mg/mL) e diferentes quantidades de solução hidrolítica (0,1-5 mL) diluídas em KCl 0,6M. Os protoplastos de S1B9 (resistente ao benomil) foram inativados a 70°C antes da fusão, induzida por PEG4000+Ca⁺⁺, com protoplastos de AS5 (sensível ao benomil). A seleção dos heterocários realizou-se em meio benomil (12µg/mL) e celulose intumescida. Foram selecionadas colônias para produção de celulases por suspensões de esporos, analisando-se a precocidade na formação de halo e relação halo/colônia. O tratamento em que obteve-se maior número de protoplastos foi com 2,5 mL de solução hidrolítica foram adicionados a 2,5 mL de KCl 0,6M (1,3x10⁷ protoplastos/mL S1B9 e 5,2x10⁷ protoplastos/mL AS5). Dos 4 experimentos realizados, obteve-se 2 colônias como prováveis produtos de fusão, selecionadas em meio com benomil, sugerindo a ocorrência de heterocários. Foram selecionados 26 subclones com precocidade e eficiência na formação de halo de hidrólise de celulose. Destes foram avaliados 6 subclones, com morfologia de *T. harzianum*, quanto a resistência ao benomil testando-se diferentes concentrações do inibidor em meio de placa (0, 25, 50, 75, 100 ppm), sendo que não observou-se diferença significativa de morfologia e esporulação. Os 26 subclones apresentaram morfologia de *T. harzianum* (AS5), de *P. echinulatum* (S1B9) ou formas intermediárias que estão sendo estabilizados por sucessivas suspensões de esporos plaqueadas em meio sem benomil e também comparados por repiques de micélio em meio sem benomil, para posterior avaliação enzimática em cultivos submerso e semi-sólido. Pode-se concluir que: obteve-se heterocários por fusão de protoplastos entre *P. echinulatum* e *T. harzianum* utilizando a técnica do doador morto; visto que obteve-se colônias com morfologia alterada e com variação na secreção de celulases (observada no halo de hidrólise) e ainda colônias com morfologia de *T. harzianum*, crescendo na presença de benomil.

Palavras-chave: celulase, fusão de protoplasto, *Penicillium echinulatum*, *Trichoderma harzianum*

Apoio: UCS