



FUNGOS

João Lúcio de Azevedo
Universidade Federal de Goiás

Genética e melhoramento de fungos na biotecnologia

A biotecnologia consiste no uso de sistemas celulares para o desenvolvimento de processos e produtos de interesse econômico ou social. Entre os sistemas celulares, os fungos são de grande interesse biotecnológico. Talvez sejam eles, dentre os seres vivos, os que mais têm contribuído com produtos e processos de importância fundamental para o bem-estar da população. Mas, que são os fungos e o que eles fazem? É o que será visto a seguir.

O que são os fungos?

Os fungos, também chamados de bolores, mofos ou cogumelos, estão interferindo constantemente nas nossas atividades diárias. Eles são tão importantes que hoje constituem um reino à parte, lado a lado com os reinos vegetal e animal. Fica difícil definir os fungos tal é a sua diversidade. No entanto, eles possuem algumas características em comum que os distinguem dos outros seres vivos. Em geral, eles apresentam filamentos, as chamadas hifas, com paredes rijas, ricas em quitina, o mesmo material que reveste insetos como besouros; têm características heterotróficas, isto é, não possuem clorofila e, portanto, necessitam de material orgânico para viver, sendo sua nutrição feita por absorção de nutrientes graças à presença de enzimas que são por eles produzidas e que degradam produtos como, por exemplo, celulose e amido. Por outro lado, os fungos são eucarióticos, isto é, possuem um núcleo típico no interior de suas células, comparável ao das plantas e animais. Reproduzem-se por via sexual ou assexual e assim possuem divisões celulares do tipo mitose e meiose, tendo sempre como produto final os esporos que são órgãos de reprodução, resistência e disseminação (figura 1). Na verdade, o reino dos

fungos é um dos mais numerosos. Estima-se que existam pelo menos um milhão e quinhentas mil espécies de fungos espalhadas pelo mundo. Isso é muito mais do que todas as espécies vegetais e animais somadas, excluindo-



Foto: Arquivo do autor

Figura 1 - Estruturas de um fungo vistas através de microscópio ótico.

Notam-se filamentos (hifas) e corpos esféricos que são os esporos vegetativos ou conídios.

se os insetos. E por incrível que pareça, apenas cerca de 70.000 espécies de fungos foram até hoje descritas, ou seja, menos de 5% das possivelmente existentes. Se entre esses cinco por cento de espécies, já existem muitas de grande importância, como as que entram na fabricação de alimentos, incluindo bebidas, de ácidos orgânicos, de fármacos e inúmeros outros produtos, pode-se imaginar o que se espera com a descoberta de novas espécies com distintas propriedades potencialmente de valor biotecnológico. Em particular no Brasil, que é o país que possui a maior biodiversidade do mundo, a busca de

novas espécies de fungos deverá produzir resultados extremamente interessantes do ponto de vista biotecnológico. Mas para o leigo, o que fazem os fungos? Na maioria dos casos, eles são vistos pela população como prejudiciais, uma imagem que é dada pelas poucas espécies dentro do reino que causam as micoses do homem e animais ou as que são responsáveis por doenças em plantas cultivadas.

Outras pessoas associam os fungos com os bolores ou mofos que invadem paredes úmidas das residências, artigos de couro ou ainda cobrem os alimentos, como frutas e grãos armazenados. De uma forma mais favorável, eles podem ser associados à culinária, como é o caso dos cogumelos de chapéu usados em sopas, pizzas e nos stroganoffs. Essa é a imagem que o grande público tem sobre os fungos. O que é esquecido é que eles são também os responsáveis pela produção de antibióticos como a penicilina, a griseofulvina ou a cefalosporina, de vitaminas como a riboflavina, de esteróides, de ácido cítrico, usado na fabricação de refrigerantes, medicamentos, balas e doces, de enzimas tipo celulases, quitinases, proteases, amilases e muitas outras de valor industrial, de etanol, usado como combustível nos automóveis, como solvente e desinfetante, ou ainda nas fermentações alcoólicas, produzindo bebidas como o vinho, a cerveja, o saquê e os destilados. Eles também entram na panificação, na fabricação e maturação de queijos como o gorgonzola, o camembert e o roquefort, em alimentos exóticos orientais, entre muitos outros produtos. Também de grande importância agrícola e ecológica, são eles que mantêm um equilíbrio, decompondo restos vegetais, degradando substâncias tóxicas, auxiliando as plantas a crescerem e se protegerem contra inimigos, como outros microrganismos patogênicos, insetos-pragas da agricultura ou herbívoros. Enfim, os fungos constituem um

reino que, se extinto, ocasionaria também o desaparecimento da maioria das espécies atualmente existentes, inclusive a humana, uma vez que sem os fungos os ciclos biológicos não seriam completos. Não é por acaso que eles são considerados como de grande importância para a genética e a biotecnologia, como será visto a seguir.

A genética de fungos e as novas tecnologias

Os fungos têm contribuído com enorme soma de conhecimentos para um melhor entendimento dos processos genéticos. Como se sabe, a genética é a ciência da hereditariedade ou transmissão de características de pais para filhos ou de ascendentes para descendentes. Como já mencionado, sendo eucarióticos, além de reproduzirem-se rapidamente, eles puderam ser usados, com eficiência, na resolução de problemas genéticos. Foi utilizando fungos filamentosos e leveduras que se descobriu em 1941 que genes produzem enzimas e outras proteínas. Veio a seguir uma avalanche de conhecimentos derivados do uso de fungos, como sistemas genéticos que não só confirmaram as regras da ciência da hereditariedade (figura 2), mas também contribuíram para a consolidação da biotecnologia como um todo. Foi por meio de técnicas genéticas clássicas, como busca da variabilidade natural, selecionando-se linhagens mais apropriadas, e pelo uso de mutantes e de cruzamentos entre linhagens, que se conseguiu realizar o melhoramento genético de muitos fungos de valor industrial. O exemplo mais típico e de maior sucesso foi o do melhoramento genético do fungo produtor de penicilina, como será visto mais adiante. Apesar dessa enorme contribuição, a moderna biotecnologia, com as novas tecnologias, como a fusão de protoplastos (figura 3) e a tecnologia do DNA recombinante ou engenharia genética, só foi usada de forma mais rotineira, em fungos, a partir de meados dos anos 70 e início dos anos 80. Com os processos de fusão de protoplastos e de transformação genética, foi possível a manipulação genética dos fungos, permitindo com que novas características de valor biotecnológico fossem adicionadas a espécies já utilizadas comercialmente, aumentando assim o seu potencial biotecnológico. Alguns fungos, principalmente leveduras, que são aqueles que se reproduzem por brotamento, como *Saccharomyces cerevisiae*, já vêm sendo usados desde a Antiguidade na fabricação de produtos alimentícios, como o pão;

outros fungos vêm sendo também empregados na fabricação de produtos de uso diário, como é o caso do ácido cítrico produzido por *Aspergillus niger*.

Sabe-se assim que esses fungos não causam qualquer problema, sendo eles próprios, ou seus produtos, ingeridos pela espécie humana e outros mamíferos. Desta forma, esses fungos constituem-se em hospedeiros ideais para albergar genes provenientes de outros organismos. A produção de hormônios, como a insulina ou o hormônio de crescimento humano, ou, ainda, a produção de outros tipos de fármacos, como o interferon, usado contra alguns vírus, pode ser levada a cabo tendo fungos como hospedeiros de genes responsáveis pela produção dessas substâncias. Em bactérias, hospedeiros tradicionais de genes clonados, as proteínas não são modificadas de maneira apropriada, como ocorre em seres eucarióticos, como os fungos. Além do mais, há um maior conhecimento no uso de fungos em fermentações industriais devido a sua grande utilização na produção de antibióticos e etanol. Finalmente, o rendimento em peso por litro do produto desejado é, em geral, maior, quando fungos são utilizados como hospedeiros de genes clonados. De tudo isso, pode-se concluir que cada vez mais eles tendem a ocupar um papel de destaque na biotecnologia. Fica difícil descrever aqui todas as aplicações biotecnológicas que os fungos apresentam. No entanto, alguns exemplos serão dados para que o leitor tenha ciência da importância dos fungos em biotecnologia. No presente artigo, alguns exemplos foram escolhidos pelo seu valor econômico ou histórico ou por serem derivados de trabalhos realizados no Brasil.

Exemplos do uso biotecnológico de fungos manipulados geneticamente

A produção de antibióticos

Um dos exemplos mais impressionantes de melhoramento genético, utilizando técnicas de genética clássica, incluindo seleção e mutação, ocorreu no fungo filamentoso *Penicillium chrysogenum*. Quando Fleming relatou, pela primeira vez, em 1929, o grande valor potencial desse fungo produtor da penicilina no combate a doenças infecciosas causadas por bactérias, estava longe de imaginar que sua linhagem, que produzia menos de 2mg do antibiótico por litro de meio de cultivo, teria sua produção melhorada em milhares de vezes. Por seleção natural, foram obtidas linhagens

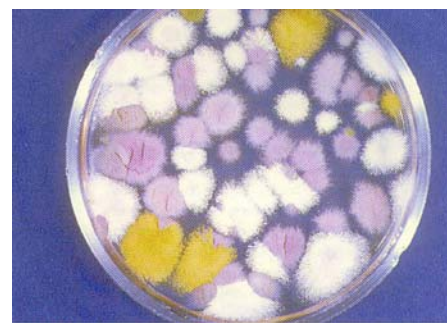
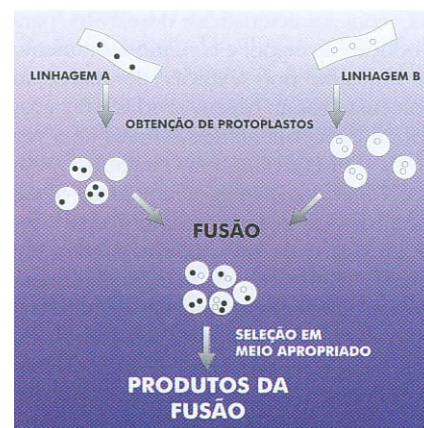


Figura 2- Colônias de fungo, resultantes de um cruzamento sexual entre fungos da mesma espécie, porém, com mutações para diferentes cores. Notam-se colônias rosadas (característica dada por um gene) em contra-posição a colônias brancas, verdes e amarelas. A proporção de colônias rosadas em relação às outras é de 1:1 evidenciando uma segregação que comprova as leis mendelianas da genética.

com produção de 60mg/litro. Graças a técnicas de indução de mutações e seleção de mutantes, além da melhoria das condições de cultivo, os aumentos foram constantes até atingir o valor de 7g/litro. Atualmente, estima-se que existam linhagens industriais de *Penicillium* capazes de produzir mais de 50g/litro, ou seja, um aumento de 25.000 vezes em relação à linhagem original de Fleming (figura 4). Esse exemplo demonstra a importância das técnicas clássicas no melhoramento genético de microrganismos de valor industrial. Aliás, foi com a produção de antibióticos que a biotecnologia teve seu início efetivo na década de 40, adquirindo em seguida a importância que tem atualmente, quando acrescida das modernas tecnologias, especialmente a do DNA recombinante. É na indústria de antibióticos que existem outros exemplos comparáveis ao descrito para a penicilina, tanto utilizando fungos como bactérias.

Figura 3-Fusão de protoplastos em fungos



A produção de ácidos orgânicos

Diferentes ácidos orgânicos são produzidos industrialmente por fungos. Dentre estes fungos, destaca-se o *Aspergillus niger*, responsável pela produção de vários compostos úteis, incluindo o ácido cítrico. Exemplos de melhoramento genético empregando-se técnicas de genética clássica e molecular nesse fungo têm sido descritos. No Estado de São Paulo, uma linhagem industrial utilizada para produção de ácido cítrico em cultura de superfície, isto é, em bandejas contendo meio de cultura líquido com sacarose como fonte de carbono, foi melhorada no laboratório do Setor de Genética de Microrganismos do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), em Piracicaba, resultando em um aumento na produção de até 30% de ácido, em relação à cultura original. Foram utilizadas técnicas de mutação, seleção e fusão de protoplastos (figura 5). Quando as linhagens melhoradas foram levadas à indústria, ocorreram aumentos consideráveis na produção de ácido cítrico. Esse é um dos exemplos brasileiros que demonstram que os princípios genéticos na biotecnologia, quando racionalmente aplicados, podem levar, com poucos custos, a ganhos substanciais na indústria.

A produção de etanol

O Brasil tem larga experiência na produção de álcool combustível. O Programa Nacional do Álcool desencadeado no final dos anos 70, decorrente da crise do petróleo, gerou uma série de tecnologias próprias, tornando o nosso país líder mundial nesse sentido. Não poderia deixar de ocorrer, portanto, o desenvolvimento de processos visando à produção de linhagens melhoradas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, responsável pela produção de etanol. Linhagens mais produtivas, com características desejáveis para produção de etanol e com monitoramento na indústria por técnicas de marcação molecular, foram desenvolvidas em vários laboratórios, salientando-se mais uma vez os da ESALQ/USP, em Piracicaba. Por tecnologia do DNA recombinante, os laboratórios de pesquisa das universidades de Brasília e da USP desenvolveram em conjunto linhagens de leveduras contendo genes de amilases capazes de utilizar o amido, por exemplo de mandioca ou batata-doce, na produção de etanol. Essas leve-

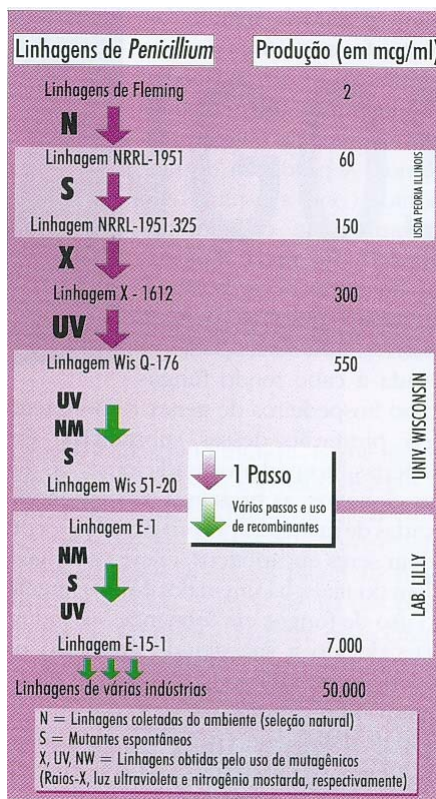


Figura 4 - Melhoramento genético para produção de penicilina pelo fungo filamentosso *Penicillium chrysogenum* (modificado de Elander R. P. (1967)). *Enhanced penicillin Biosynthesis in mutant and recombinant strains of Penicillium chrysogenum*. In *Induced mutations and their utilization* (H. Stubbe, Ed.) pp 403-423. Akademic-Verlag, Berlím.

duras manipuladas geneticamente estão sendo aperfeiçoadas e poderão desempenhar um importante papel na produção de etanol. A tecnologia do DNA recombinante tem sido também usada por esses e outros laboratórios brasileiros e do exterior na clonagem e seqüenciamento de genes de interesse industrial em fungos.

A biotecnologia na enologia

Um outro exemplo, também brasileiro, é o do melhoramento via fusão de protoplastos com produção de híbridos, empregando-se espécies diferentes de leveduras utilizadas na fabricação do vinho. Por fusão de protoplastos, foi obtido um híbrido entre as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* reunindo características favoráveis dos dois gêneros de fungos em uma só célula (figura 6). Esta, multiplicada e retrocruzada com a linhagem original de *Saccharomyces cerevisiae*, resultou em linhagem capaz de utilizar uvas ácidas, como as que ocorrem em certas safras na região Sul do país, na produção de vinhos finos, sem necessidade de utilização de fermenta-

ções mistas (duas espécies de leveduras) ou, o que seria pior, adição de açúcar. Esse trabalho resultou em patente que está em vigor, e a levedura melhorada desenvolvida na Universidade de Caxias do Sul (UCS), no Rio Grande do Sul, já está sendo utilizada com sucesso na produção de vinhos de alta qualidade.

O controle biológico de insetos por fungos

Assim como os fungos podem eventualmente causar doenças em plantas e mamíferos, também os insetos podem ser atacados por certos fungos (figura 7). Se usados convenientemente, eles podem ser empregados no controle de insetos-pragas de plantas cultivadas ou mesmo de insetos vetores de doenças. O Brasil, possuindo um clima tropical em grande parte de seu território e com vastas áreas cultivadas, tem dificuldades na utilização do controle químico de insetos, que se torna até inviável e antieconômico em certas condições, além de causar desequilíbrios biológicos e problemas de intoxicação. A solução é então o uso e aplicação de técnicas na produção de "inseticidas microbianos" que possam, se não substituir, pelo menos diminuir o uso de agroquímicos com vantagens econômicas e de preservação do ambiente. O Brasil talvez seja o país onde as pesquisas e a utilização em larga escala de fungos entomopatogênicos, isto é, os que atacam insetos, têm tido maior sucesso. Melhoramento genético clássico, desenvolvimento de marcadores moleculares, clonagem de genes e outros estudos têm sido realizados em um esforço conjunto abrangendo diversas instituições. Assim, vários centros da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), a ESALQ/USP, a UNICAMP, o Centro de Biotecnologia da UFRGS, a Universidade Estadual de Londrina, a UCS a UFPermbuco, além de empresas privadas, têm trabalhado com fungos como o *Metarhizium*

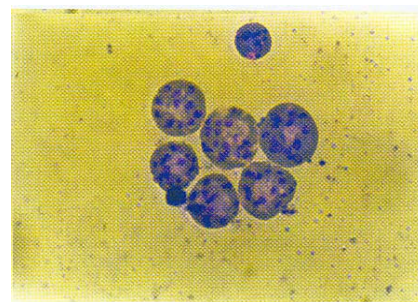


Figura 5 - Protoplastos de um fungo. Os protoplastos foram corados, mostrando que eles possuem vários núcleos (corpos azuis) no seu interior.

anisopliae, *Beauveria bassiana* e *Nomuraea rileyi* aplicando tecnologias clássicas e modernas para um melhor conhecimento da biologia e genética desses fungos e no desenvolvimento de linhagens mais eficientes no controle biológico de insetos.

Controle biológico de doenças de plantas e fungos endofíticos Como no caso do controle biológico de insetos por fungos, existem também exemplos de fungos que atuam como controladores de doenças de plantas. Novamente o emprego racional dos mesmos pode prevenir doenças causadas por microrganismos fitopatogênicos. A utilização desses controladores naturais restringe também a aplicação abusiva de fungicidas. As técnicas de produção massal desses controladores biológicos, a otimização dos processos de aplicação e o melhoramento genético dos fungos empregados, tornando-os mais eficientes, vêm sendo desenvolvidos em laboratórios do Brasil e exterior. Exemplos de interesse têm sido obtidos em alguns centros de pesquisa da EMBRAPA no Sul e Sudeste do país. Recentemente tem sido verificado que fungos e bactérias encontrados internamente em vegetais, particularmente em suas partes aéreas como folhas e ramos, têm enorme importância no controle de doenças de plantas e também de insetos. Uma boa quantidade da população de microrganismos que existe no interior de



Figura 7 - Fungo entomopatogênico atacando inseto em seu estado larval. Nota-se que uma das lagartas está completamente recoberta pelo fungo, ao lado de outra sadia, não atacada. Os fungos que causam doenças em insetos são usados para controlar pragas da agricultura em um processo de controle biológico.

plantas é constituída por fungos que são denominados de fungos endofíticos. Eles, além de controlarem doenças e pragas, podem possuir outras propriedades, como alterar o metabolismo das plantas, impedindo formação de sementes ou produzindo hormônios que causam modificações no desenvolvimento dos vegetais. Existem, também, casos de incremento de produção em plantas, graças à presen-



Figura 6 - Células híbridas resultantes de um cruzamento por fusão de protoplastos entre duas espécies de leveduras. O produto vem sendo empregado com finalidades enológicas na fabricação de vinhos finos.

ça desses endofíticos. O estudo de fungos endofíticos é feito em países de clima temperado; entretanto, são escassos os trabalhos com plantas tropicais. Devido a isso, vários laboratórios do Brasil (ESALQ/USP, UNESP, em Botucatu-SP, Universidade Federal de Goiás, Fiocruz, no Rio de Janeiro, Universidade Federal do Amazonas e outras) têm isolado e encontrado novas características de valor biotecnológico em fungos endofíticos. A sua manipulação genética tem sido feita no intuito de serem clonados genes de interesse, de tal modo que sua reinoculação em plantas cultivadas poderá levar à introdução nos vegetais de características novas e de interesse biotecnológico.

CONCLUSÕES

Os exemplos citados não esgotam nem de longe o potencial que os fungos apresentam em biotecnologia. A visão que se pretendeu dar por meio dos exemplos selecionados foi de que a genética, o melhoramento genético e a biotecnologia em fungos, embora já tenham produzido resultados realmente assombrosos, como no caso do melhoramento para produção de antibióticos, ainda têm muito mais a oferecer. É evidente que, no Brasil, um número maior de micologistas, geneticistas de fungos e biólogos moleculares tem que existir para conseguir estudar não só as espécies já conhecidas como também toda a biodiversidade ainda inexplorada no grande reino dos fungos.

Referências bibliográficas

Seguem algumas referências gerais, onde o leitor poderá encontrar mais dados sobre a biotecnologia em fungos. São citados também alguns trabalhos de autores nacionais referentes às pesqui-

sas acima mencionadas.

Alves, S.B. (1997) Controle Microbiano de Insetos. Editora FEALQ, Piracicaba (esta é a segunda edição que deverá estar disponível no segundo semestre deste ano e que apresenta vários capítulos sobre uso de fungos no controle biológico de insetos).

Astolfi Filho, S; Galembeck, E.V.; Faria, J.B. & Frascino A.C.S. (1986) Stable yeasts transformants that secrete functional alfa-amilase encoded by cloned mouse pancreatic cDNA. *Biotechnology* 1:47-54 (trabalho realizado no Brasil envolvendo a UNB e a USP, sobre manipulação de levedura de interesse para produção de etanol).

Azevedo, J. L. (1986) Genética de Microrganismos em Biotecnologia e Engenharia Genética (apresenta uma série de capítulos com revisões de diversos autores sobre aspectos biotecnológicos em fungos, incluindo controle biológico, produção de ácido cítrico, enzimas hidrolíticas e leveduras de uso enológico. Possui também capítulos descrevendo as técnicas de fusão de protoplastos e a tecnologia do DNA recombinante).

Azevedo, J. L. (1997) Endophytic fungi and their roles mainly on tropical plants. Seventh International Symposium on Microbial Ecology (capítulo de livro que deverá estar publicado ainda em 1997. O capítulo possui dados sobre fungos endofíticos com ênfase nos isolados de plantas no Brasil).

Ball, C. (1984) Genetics and breeding of industrial microorganisms. CRC Press, Boca Raton, Florida (contém capítulos sobre métodos de melhoramento de fungos e suas aplicações biotecnológicas, com ênfase na produção de antibióticos).

Bettiol, W (1991) Controle Biológico de Doenças de Plantas. EMBRAPA/CNPDA, Jaguariúna (possui capítulos sobre o uso de fungos no controle biológico de doenças de plantas e seu valor biotecnológico).

Carrau, J.L.; Azevedo, J. L.; Sudbery, P. & Campbell, D. (1982) Methods for recovery fusion products among oenological strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Revista Brasileira de Genética* 5:221-226 (publicação original, em grande parte feita no Brasil, sobre obtenção de levedura híbrida de valor enológico).

Saunders, V.A. & Saunders, J.R. (1987) Microbial genetics applied to *Biotechnology*. Croom-Helm, London (apresenta as diversas aplicações da genética de fungos no melhoramento genético de espécies de valor industrial).