PRODUÇÃO DE CELULASES E FUSÃO DE
PROTOPLASTOS EM Humicola sp

EDISON NEIROTTI ROUMAS
Licenciado em Ciências Biológicas

ORIENTADOR: Prof.Dr. João Lúcio de Azevedo

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz" ,
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de Concentração: Ge
nética e Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Setembro de 1988

NEIROTTI, Edison

Produção de celulases e fusão
de protoplastos em Humicola sp.
Piracicaba, 1988.

Tese - ESALQ
Bibliografia

1. Protoplastos- Fusão 2. Humicola
sp. 3. Celulases. I - Escola Su-
perior de Agricultura "Luiz de
Queiroz" , Piracicaba.

PRODUÇÃO DE CELULASES E FUSÃO DE
PROTOPLASTOS EM *Humicola* sp

EDISON NEIROTTI ROUMAS

Aprovada em: 24.10.1988

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo	ESALQ/USP
Profª Drª Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner	ESALQ/USP
Prof. Dr. Roland Vencovsky	ESALQ/USP
Dr. Rolf Alexandre Prade	FTI
Dr. Juan Luis Carrau	IB/UCS

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo
Orientador

A meus pais

Edison e Cleria

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação, dedicação e apoio brindados nestes anos de trabalho.
- A Prof.Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner pela sua dedicação e constante incentivo demonstrado.
- Ao Prof. Dr. Roland Vencovsky do Departamento de Genética e Bel. Gabriel A. Sarriés do CIAGRI, pelo valioso assessoramento nas análises estatísticas e processamento de dados.
- Aos Professores do Curso de Doutorado em "Genética e Melhoramento de Plantas" pelos ensinamentos e contribuição á minha formação profissional.
- Ao Prof. Dr. Darcy Martins Da Silva, da ESALQ, por ter-me introduzido aos principios da técnica de eletrofusão.
- Aos meus colegas do Setor de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pelo constante incentivo de amigos; em especial á Bel. Vânia Aparecida Vicente pela sua valiosa colaboração nos trabalhos de dosagem enzimática.
- Aos Funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP, em especial aos do Setor Genética de Microrganismos Antonio Rocha Campos, Carlos Nolasco e Sandra Rocha, pelos incalculáveis serviços prestados.
- Aos colegas Walter Norbis e Luis Anastasia, da Facultad de Humanidades y Ciencias de Montevideo, Uruguay pela sua colaboração em alguns estudos estatísticos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo valioso auxílio financeiro concedido ao autor; á FINEP pelo financiamento do projeto "Melhoramento genético em fungos produtores de celulases através de técnicas genéticas clássicas e de fusão de protoplastos " (FINEP 4.4.84.0787.00) do qual o autor integrou a equipe de pesquisas; ao Departamento de Genética da ESALQ/USP pelos recursos oferecidos e á Facultad de Humanidades y Ciencias de Montevideo, Uruguay, pela oportunidade brindada para realizar este curso.

A todos os que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMARIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
RESUMO	xviii
SUMMARY	xx
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. O Complexo Celulase, Biosíntese e Regulação..	4
2.2. O Gênero <u>Humicola</u>	13
2.3. Protoplastos	16
2.3.1. Esferoplastização	16
2.3.2. Fusão de Protoplastos	19
2.3.2.1. Fusão de Protoplastos por tratamento com Polietilenoglicol	19
2.3.2.2. Fusão de Protoplastos por Eletrofusão..	21
3. MATERIAL E METODOS	25
3.1. Linhagem utilizada	25
3.2. Meios de Cultura utilizados	25
3.2.1. Meio Mínimo Sólido (MM)	25
3.2.2. Meio Completo Sólido (MC)	26
3.2.3. Meio Mínimo 2x Concentrado	26
3.2.4. Meio Completo 2x Concentrado	26
3.2.5. Meio Mínimo Líquido	27
3.2.6. Meio para Crescimento de Micélio	27
3.2.7. Meio Mínimo para <u>Humicola</u> sp (MMH)	27
3.2.8. Meio para Regeneração de Protoplastos	27

3.2.9. Meio para visualização de halo de degradação de celulose	28
3.2.10. Meio de Petterson para Produção de Celulases	28
3.2.11. Meio E para Produção de Celulases	29
3.2.12. Meio para Mutantes Desreprimidos	29
3.2.13. Meios com 2-Deoxiglicose	30
3.3. Soluções utilizadas	30
3.3.1. Solução de Tween	30
3.3.2. Solução Salina (0,85%)	30
3.3.3. Solução de Vitaminas	30
3.3.4. Solução de Ácidos Nucleicos de Levedura ..	31
3.3.5. Solução de Caseína Hidrolisada	32
3.3.6. Solução de Extrato de Levedura	32
3.3.7. Soluções de Aminoácidos para Caracterização de Mutantes Auxotróficos	32
3.3.8. Solução de NaOH 1N	33
3.3.9. Solução de HCl 1 N	33
3.3.10. Tampão Fosfato 0,02 M pH 5,6	33
3.3.11. Tampão Fosfato pH 7,0	34
3.3.12. Tampão Citrato 0,05 M pH 4,8	34
3.3.13. Solução de Albúmina 5%	35
3.3.14. Solução Estoque de Giemsa	35
3.3.15. Solução Corante de HCl Giemsa	35
3.3.16. Soluções de Álcool Etfílico	36
3.3.17. Solução de Fixação	36
3.3.18. Reagente Ácido Dinitro Salicílico (DNS) ..	36

3.3.19. Solução de PBS	37
3.3.20. Solução Estoque de Tiamina	37
3.3.21. Solução Estoque de Biotina	37
3.3.22. Soluções de Tiamina e Biotina	37
3.3.23. Solução de MgSO_4 0,5 M pH 5,6	38
3.3.24. Solução de Sacarose 0,8 M pH 5,6 e pH 7,0 .	38
3.3.25. Solução de Sorbitol 0,8 M pH 7,0	38
3.3.26. Solução de Sorbitol 1,2 M pH 7,0	39
3.3.27. Solução de Sorbitol 0,8 M pH 7,0 com PEG 20% e 40%	39
3.3.28. Solução de Benlate	39
3.3.29. Solução de Acriflavina	39
3.3.30. Solução de Cristal Violeta	40
3.3.31. Tampão Tris HCl 0,1 M pH 8	40
3.3.32. Vermelho Congo 0,025% pH 8	40
3.3.33. NaCl 0,5 M pH 8	40
3.3.34. Esterilização e Conservação	40
3.3.35. Incubação	41
3.4. Técnica semiquantitativa de avaliação da produ- ção de celulasas em <u>Humicola</u> sp	41
3.4.1. Meios de Cultivo ensaiados	41
3.4.2. Condições de Cultivo: Inoculação, Incubação e Choque térmico.	42
3.4.3. Técnica de coloração	42
3.5. Protoplastos de <u>Humicola</u> sp	43
3.5.1. Obtenção de protoplastos	43
3.5.2. Regeneração de protoplastos	44

	Página
3.5.3. Curva de Sobrevivência de protoplastos á luz (UV)	45
3.5.4. Técnica do Doador Morto	45
3.5.5. Liberação de protoplastos a partir do micélio	46
3.5.5.1. Coloração de Conídios e Protoplastos	46
3.5.5.2. Frequência do número de núcleos	47
3.5.5.3. Diâmetro dos protoplastos	47
3.6. Marcas Genéticas	48
3.6.1. Obtenção de Mutantes	48
3.6.1.1. Mutantes Morfológicos	48
3.6.1.2. Mutantes Desreprimidos	49
3.6.1.3. Mutantes Resistentes	49
3.6.1.3.1. Resistência a Benlate	49
3.6.1.3.2. Resistência a 2-Deoxiglicose	50
3.6.1.3.3. Resistência a Corantes	51
3.6.1.4. Mutantes Auxotróficos	51
3.7. Seleção de variantes para maior produção de enzimas celulolíticas	54
3.7.1. Seleção em placa	54
3.7.2. Dosagem enzimática	55
3.7.2.1. Determinação de celulases	55
3.7.2.2. Determinação da Celulase Total (FPA) ...	56
3.7.2.3. Determinação do Açúcar Redutor	57
3.7.3. Análises Estatísticas	57
3.7.3.1. Análises Estatísticas aplicadas na seleção de variantes para maior produção ..	57

	Página
3.7.3.2. Análises Estatísticas aplicadas á dosagem enzimática	58
3.8. Fusão de protoplastos	62
3.8.1. Fusão de Protoplastos por tratamento com polietilenoglicol	62
3.8.2. Fusão de protoplastos por eletrofusão	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1. Técnica semiquantitativa de avaliação da pro- dução de celulasas em <u>Humicola</u> sp	66
4.1.1. Visualização do halo e coloração	66
4.1.2. Tamanho de colônia	68
4.1.3. Presença de halo de degradação e índice de atividade enzimática	68
4.1.4. Choque térmico	69
4.2. Protoplastos de <u>Humicola</u> sp	73
4.2.1. Regeneração de protoplastos	73
4.2.2. Curva de sobrevivência de protoplastos á luz (UV)	75
4.2.3. Técnica do Doador Morto	77
4.2.4. Liberação de protoplastos a partir do micé- lio	80
4.2.4.1. Tempo de tratamento enzimático	80
4.2.4.2. Emergência dos protoplastos	82
4.2.4.3. Divisão celular nos protoplastos	82
4.3. Marcas Genéticas	88
4.3.1. Mutantes Morfológicos	88
4.3.2. Mutantes Desreprimidos	88

Página

4.3.3. Mutantes Resistentes	89
4.3.3.1. Resistência a Benlate	89
4.3.3.2. Resistência a 2-Deoxiglicose	91
4.3.3.3. Resistência a Corantes	93
4.3.4. Mutantes Auxotróficos	94
4.4. Seleção de variantes para maior produção de enzimas celulolíticos	106
4.4.1. Sistema de seleção em placa	106
4.4.2. Dosagem enzimática	107
4.4.3. Incremento da produção de enzimas celulo- líticas	108
4.5. Fusão de protoplastos	130
4.5.1. Fusão de protoplastos por tratamento com polietilenoglicol	130
4.5.2. Fusão de protoplastos por eletrofusão	132
5. CONCLUSÕES	136
6. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	138

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.	Esquema do Método de Caracterização de mutantes auxotróficos por semeadura	53
Fig. 2.	Esquema de Seleção em placa de variantes para maior produção de enzimas celulolíticas	59
Fig. 3.	Esquema do Método para determinação da celulase total, açúcar redutor, peso seco do micélio ...	60
Fig. 4.	Esquema da Análise da Atividade de Papel de Filtro para Determinação de Celulose Total.....	61
Fig. 5.	Placa de Petri inoculada com <u>Humicola</u> sp, incubada durante cinco dias, após choque térmico e corada pelo método desenvolvido no presente trabalho	72
Fig. 6.	Curva de sobrevivência á luz ultravioleta de protoplastos de <u>Humicola</u> sp.	76
Fig. 7.	Sequência da obtenção de protoplastos de <u>Humicola</u> sp com diferentes tempos de tratamento enzimático do micélio	84
Fig. 8.	Liberação de protoplastos com 30 minutos de tratamento enzimático do micélio	85

Fig. 9.	Protoplastos em divisão nuclear, podendo-se observar cromossomos	86
Fig. 10.	Efeito do tempo de tratamento enzimático na obtenção de protoplastos	87
Fig. 11.	Efeito do tempo de tratamento enzimático na regeneração de protoplastos	87
Fig. 12.	Mutantes morfológicos obtidos após irradiação de protoplastos de <u>Humicola</u> sp com luz UV	104
Fig. 13.	Curva de sobrevivência do <u>Humicola</u> sp selvagem ao fungicida Benlate	105
Fig. 14.	Atividade total de Celulase Extracelular na escolha do meio para produção de celulases	123
Fig. 15.	Atividade total de Celulase Extracelular em <u>Humicola</u> sp selvagem e nas variantes selecionadas	124
Fig. 16.	Regressões polinomiais da atividade total de Celulase Extracelular de cada uma das 4 variantes estudadas	125

- Fig. 17. Distribuições de frequência para os valores do Índice de Atividade enzimática para os três ciclos de seleção 126
- Fig. 18. Distribuições de frequência para os valores do Índice de Atividade Enzimática, para os três ciclos de seleção 128
- Fig. 19. Protoplastos de Humicola sp fundidos por eletrofusão 135

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1.	Diâmetros das colônias (medido em cm) de <u>Humicola</u> sp após inoculação em 4 meios de cultura por diferentes tempos e temperaturas. (média de 5 repetições)	70
Tabela 2.	Índices de Atividade Enzimática de <u>Humicola</u> sp em 4 meios de cultura em diferentes tempos e temperaturas de incubação (média de 5 repetições).	71
Tabela 3.	Efeito da temperatura e concentração do estabilizador osmótico na regeneração de protoplastos de <u>Humicola</u> sp.	74
Tabela 4.	Porcentagem de sobrevivência á luz ultravioleta de protoplastos de <u>Humicola</u> sp	75
Tabela 5.	Número de protoplastos regenerados para cada tratamento (média de 3 placas)	79
Tabela 6.	Número de núcleos em protoplastos de <u>Humicola</u> sp, obtidos após diferentes tempos de tratamento enzimático ...	83

Tabela 7.	Número de protoplastos/ml obtidos em diferentes tempos de tratamento enzimático; % regeneração e seu diâmetro....	83
Tabela 8.	Sobrevivência do <u>Humicola</u> sp selvagem ao fungicida Benlate (0,0 a 1,0 ug/ml)...	96
Tabela 9.	Sobrevivência do <u>Humicola</u> sp selvagem ao fungicida Benlate (0,3 a 0,4 ug/ml)...	97
Tabela 10.	Aumento de resistência ao Benlate a partir de duas colônias (A e B) resistentes a 0,4 µg de Benlate/ml de MC	97
Tabela 11.	Resistência do <u>Humicola</u> sp selvagem à 2-Deoxiglicose	98
Tabela 12.	Resistência do <u>Humicola</u> sp selvagem e de colônias, previamente crescidas em meio com 2-Deoxiglicose, à 2-Deoxiglicose	98
Tabela 13.	Curva de resistência do selvagem à Acriflavina	99
Tabela 14.	Curva de resistência do selvagem ao Cristal Violeta	100

Página

Tabela 15. Caracterização preliminar de mutantes auxotróficos	101
Tabela 16. Resistência dos mutantes auxotróficos ao Benlate, Acriflavina e Cristal Violeta em Meio Completo	102
Tabela 17. Resistência dos mutantes auxotróficos ao Benlate, Acriflavina e Cristal Violeta em Meio Completo	102
Tabela 18. Resistência ao Benlate e Cristal Violeta dos mutantes auxotróficos 1 e 3 e dos seus isolados 1_1 , 1_2 , 1_3 , 1_4 , 3_1 , 3_2 , 3_3 , e 3_4 em MMH	103
Tabela 19. Análise de Variância em blocos ao acaso para a variável Índice de Atividade Enzimática do primeiro ciclo de seleção	113
Tabela 20. Análise de Variância em blocos ao acaso para a variável Índice de Atividade Enzimática do segundo ciclo de seleção	114

Tabela 21. Análise de Variância em blocos ao acaso para a variável Índice de Atividade Enzimática do terceiro ciclo de seleção	115
Tabela 22. Análise de Variância em blocos ao acaso para a variável Índice de Atividade Enzimática entre os segundo e terceiro ciclos de seleção	116
Tabela 23. Peso seco do micélio (mg) e atividade total de celulase extracelular (FPA) ($\times 10^{-5}$ IU /mg) em meio E e meio de Petterson et alii (1963)	117
Tabela 24. Dosagem das variantes selecionadas Peso seco do micélio (mg) e atividade total de celulase extracelular (FPA) ($\times 10^{-6}$ IU /mg)	119
Tabela 25. Análise de Variância em factorial para Dosagem da atividade enzimática extracelular (FPA)	120

Tabela 26. Estimadores estatísticos das distribuições de frequência para os valores do Índice de Atividade Enzimática para os três ciclos de seleção	122
Tabela 27. Incremento em porcentagem da atividade enzimática (FPA) das variantes selecionadas em cada ciclo em relação ao selvagem	122
Tabela 28. Fusão de protoplastos de mutantes auxotróficos de <u>Humicola</u> sp por tratamento com polietilenoglicol.....	131
Tabela 29. Sobrevivência e Regeneração de protoplastos de <u>Humicola</u> sp após tratamento com Sacarose 0,8 M pH 5,6 e 7,0 , após 9 dias de incubação	133
Tabela 30. Regeneração de protoplastos de <u>Humicola</u> sp após tratamento com meio para eletrofusão de Sorbitol 0,8 M e 1,2 M pH 7,0, após 9 dias de incubação	134

PRODUÇÃO DE CELULASES E FUSÃO DE
PROTOPLASTOS EM Humicola sp.

Autor: EDISON NEIROTTI ROUMAS

Orientador: Prof.Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO.

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver a tecnologia de fusão de protoplastos em Humicola sp com a finalidade do seu estudo genético, visando incrementar a sua produção de celulases e estabelecer um programa de melhoramento genético para este fungo. Nesse plano foram estudadas entre outras, a otimização da regeneração de protoplastos, a sobrevivência à luz ultravioleta, a obtenção de mutantes e a seleção de variantes de maior produção de enzimas celulolíticas.

Dado que o Humicola sp apresenta conídios multinucleados, a obtenção de mutantes foi realizada por irradiação de protoplastos com luz ultravioleta. Do estudo de obtenção de protoplastos, tempo de tratamento enzimático do micélio e número de núcleos presentes por protoplasto, foi observado que com tratamentos por períodos curtos de tempo (30 minutos) obtinha-se a maior porcentagem de protoplastos uninucleados, condição favorável para a obtenção de mutantes.

Para a seleção de variantes de maior produção de enzimas foi necessário o desenvolvimento de uma técnica simples, específica para a linhagem de Humicola estudada, que permitisse de forma fácil e rápida quantificar a produção de celulasas. A produção de celulasas, das variantes selecionadas, foi quantificada pela determinação da celulase total (FPA).

Finalmente foram estudadas as condições de fusão de protoplastos, na linhagem utilizada, por tratamento com polietilenoglicol e pela técnica de eletrofusão.

CELLULASES PRODUCTION AND PROTOPLASTS
FUSION IN Humicola sp.

Author: EDISON NEIROTTI ROUMAS

Adviser: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

SUMMARY

The present work attempts to develop the protoplast fusion technique in Humicola sp to study it genetically, in order to increment cellulases production and to establish a genetic improvement programm for this fungus. Among others the optimization of protoplasts regeneration, their survival to UV irradiation, mutant induction and hyper-cellulolytic variants selection were studied within this programm.

By the fact that Humicola sp presents multinucleated conidia, mutant induction was done by protoplasts UV irradiation. From the protoplast formation study, enzymatic mycelium treatment time and protoplast nuclei number, was observed that with mycelium treatments by short periods of time (30 minutes) the highest percentage of uninucleated protoplasts were obtained, a wished condition for mutants induction.

For Hyper-cellulolytic variants selection was necessary to develop a simple technique, specific for the Humicola sp studied strain, that allows in an easy and rapid manner to quantify the cellulase production. The selected variants cellulase production, was quantified by the measurement of the total cellulase (FPA).

Finally the protoplast fusion conditions, in the strain used, were studied by polyethyleneglycol treatment and by electrofusion.

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da população mundial inúmeros problemas surgiram, destacando-se entre os mais graves, os da produção de energia e alimentos, intimamente associados, pois o aumento da produção de alimentos implica um aumento no consumo de energia.

O inevitável esgotamento, num futuro não muito distante, das fontes de energia tradicionais, petróleo e carvão mineral, estimulou o estudo de novas fontes para substituí-las. Entre as mais promissoras encontra-se a energia solar, que tem como vantagens as características de ser uma fonte inesgotável, renovável, econômica e não poluente. A natureza há muito tempo a vem utilizando e, através da fotossíntese, armazenando produtos que podem ser empregados como fontes de alimento e energia.

A disponibilidade da celulose em quantidade tão imensa e o fato de ser renovável tornam-na matéria prima mais interessante para a produção de alimentos e energia. O advento da crise energética do petróleo na década dos anos 70 fez vol-

tar a atenção das pesquisas para o desenvolvimento de fontes energéticas alternativas e renováveis, sendo que a biomassa é uma fonte potencial. Assim a solução para uma série de problemas energéticos, químicos e de alimentos, poderia ser a hidrólise de celulose, a glicose, e a partir desta a obtenção de combustíveis líquidos, produtos químicos e materiais alimentares.

A celulose é a única fonte de carbono renovável que é encontrada em grandes quantidades . A quantidade de carbono fixada por fotossíntese tem sido estimada entre 70 e 100 bilhões de toneladas por ano sendo que a metade dela é celulose. A fração dela que pode ser coletada a um custo razoável é baixa, mas pode ser incrementada significativamente melhorando o seu manejo.

A celulose pode ser hidrolisada a produtos solúveis por ácidos ou enzimas. A desvantagem da hidrólise ácida é que pode resultar em decomposição da glicose inicialmente formada; nesse caso, os produtos resultantes da decomposição, aldeídos e cetonas, são tóxicos para microrganismos e animais superiores. Além disso os ácidos minerais utilizados para a hidrólise provocam a corrosão dos equipamentos utilizados e interagem com materiais não celulósicos na celulose natural. Tudo isto resulta em baixo rendimento, impurezas no melaço, e um custo alto. A hidrólise enzimática da celulose tem a vantagem de ter uma conversão eficiente sem a produção de compostos secundários indesejáveis. E preferível então a utilização de um processo enzimático igual ao caso da hidrólise

do amido. Infelizmente o custo de produção da celulase microbiana é alto. A utilização com êxito do material celulósico como fonte de carbono renovável depende do desenvolvimento de processos e tecnologias econômicas para a produção de celulases, a hidrólise microbiana e enzimática do material celulósico a produtos de baixo peso molecular tais como hexoses e pentoses, e a conversão química ou biológica destas em outros produtos úteis para serem utilizados como combustível líquido produtos químicos e produtos alimentícios.

No que diz respeito à microbiologia e à genética microbiana, hoje estão se desenvolvendo numerosos trabalhos cujos objetivos são reduzir este custo desenvolvendo mutantes regulatórios celulolíticos. Estes mutantes seriam usados na produção comercial de celulase de baixo custo e para o estudo dos mecanismos que controlam a síntese enzimática.

O presente trabalho tem como objetivos: 1. estabelecer uma metodologia de melhoramento genético para o fungo celulolítico das características do Humicola sp (reprodução sexuada desconhecida, com conídios multinucleados e hifas septadas multinucleadas), avaliando a sua potencial adequação em futuros projetos de melhoramento em microrganismos de características similares. 2. desenvolver a tecnologia de fusão de protoplastos neste fungo com a finalidade do seu melhoramento genético, visando assim, incrementar a sua produção de celulases.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Complexo Celulase. Biossíntese e Regulação.

Diversos microrganismos produzem celulasas entre os que estão incluídas muitas espécies de fungos, actinomicetos e outras bactérias. COUGHLAN (1985) cita diversas espécies pertencentes a alguns gêneros bacterianos, entre os quais podem ser destacados: Cellulomonas, Cellvibrio, Clostridium, Pseudomonas; entre os actinomicetos destacam-se : Streptomyces, e Thermomonospora e entre os fungos: Aspergillus, Fusarium, Penicillium, Polyporus, Sporotrichum, Trichoderma, Hemicola. Porém, deve-se destacar que somente os fungos excretam grandes quantidades de celulasas na sua forma ativa no meio de cultura, enquanto que as celulasas bacterianas estão principalmente ligadas à parede celular (WOOD, 1985).

Alguns organismos podem consumir rapidamente todas as formas de celulose, outros podem consumir apenas formas degradadas da mesma (REESE, 1976). RYU & MANDELS (1980) atra-

vés dessas observações e baseados na hipótese $C_1 - C_x$ (REESE et alii, 1950) confirmaram como estabelecido por estes autores que a celulose natural é hidrolisada em 2 ou 3 passos, chegando ao seguinte conceito do complexo celulase:

Algumas bactérias e fungos produzem só um tipo de celulase (endocelulase), a qual por si mesma, não é capaz de hidrolisar suficientemente a celulose. Os organismos celulóliticos verdadeiros são saprófitas que obtêm a sua energia degradando materiais celulósicos. Eles são capazes de produzir um complexo celulólitico, isto é, uma mistura de enzimas celulóliticas com diferentes modos de ação. Esse complexo celulólitico é capaz de hidrolisar eficientemente a celulose cristalina a açúcares solúveis.

Um ponto no qual todos os autores concordam é que a celulase é um complexo de enzimas que atuam sinergisticamente na hidrólise da celulose cristalina.

Diversos autores (GONG & TSAO, 1979; MONTENECOURT et alii, 1979; LEE & FAN, 1980; RYU & MANDELS, 1980) afirmam que o complexo celulase é formado por, pelo menos, 3 enzimas comumente chamadas exocelulase, endocelulase e celobiase. Em geral os microrganismos não produzem todas as enzi

mas do complexo celulolítico em proporções iguais. Assim o gênero Trichoderma, em especial o T. reesei considerado o melhor produtor de celulases extracelulares, é um bom produtor de exo e endocelulases, porém produz pouca β -glicosidase; em compensação esta última é produzida em abundante quantidade por algumas espécies de Penicillium (FUNAGUMA et alii, 1986; BROWN et alii, 1987a) e Humicola (ARAUJO et alii, 1983).

A exocelulase segundo GONG & TSAO (1979), encontrada exclusivamente em fungos filamentosos, é capaz de degradar a celulose cristalina. A celulase bacteriana e a endocelulase fúngica não tem atividade hidrolítica sobre a celulose cristalina. São celulases que retiram as unidades de glicose e celobiose terminais das cadeias. A produção de exocelulase tem como indutores a celulose e lactose (GONG & TSAO, 1979) e é inibida competitivamente pelo produto final, a celobiose (HALLIWELL & GRIFFIN, 1973), e também pela glicose, mas com menor intensidade.

A endocelulase hidrolisa as cadeias de celulose ao acaso, atacando os polímeros de celulose internamente (RYU & MANDELS, 1980). Tem atividade limitada sobre a celulose cristalina, mas a presença desta enzima aumenta a atividade da exoglucanase na hidrólise da celulose cristalina. Isto é devido aos ataques ao acaso da endocelulase sobre a celulose o qual cria novos sítios terminais reativos para a exocelulase (GONG & TSAO, 1979; ARAUJO & D'SOUZA, 1986). Esse efeito complementar da endocelulase com a exocelulase é chamado de efeito sinérgico da celulase. Segundo FUJII & SHIMIZU --

(1986) o sinergismo entre endo e exocelulases se dá nas primeiras etapas da reação de hidrólise da celulose. Nelas a endocelulase quebra a molécula do substrato formando novos sítios terminais para a exocelulase até que o peso molecular do substrato atinge valores baixos (4.000); abaixo deste valor a endocelulase deixa de agir e a cinética da reação obedece só a equação de reação da exoenzima.

A celobiase hidrolisa a celobiose a glicose. Esta enzima é importante na regulação da indução da celulase assim como na regulação da celulólise. In vivo a celobiase hidrolysa a celobiose exógena a glicose, regulando assim o nível de glicose e celobiose intracelular, o que influencia na biossíntese de celulase através do mecanismo de indução-repressão.

Resumindo, pode-se dizer que a celulose é um polímero linear não ramificado contendo unidades de glicose ligadas por enlaces β (1-4) glicosídeos os quais são hidrolisados pelas enzimas celulolíticas. Porém, em uma microfibrila de celulose onde as cadeias estão ordenadas, ocorrem poderosas pontes de hidrogênio, resultando em uma estrutura cristalina. Isto dá à celulose sua insolubilidade, sua força tensoativa, e sua resistência a enzimas e reagentes químicos. Onde as cadeias são menos ordenadas a celulose é amorfa, e portanto mais rapidamente hidratada e mais acessível às enzimas. Tais áreas amorfas podem ser hidrolisadas até certo grau por endo ou exoglucanases agindo separadamente, ou por celulases incompletas. Para a hidrólise da celulose cristalina onde as pontes de hidrogênio assim como os enlaces glicosídicos devem ser quebrados é necessário a presença de uma celulase completa contendo um nível adequado de todos os componentes.

Embora ainda não tenham sido completamente esclarecidos os mecanismos da reação e as interações sinérgicas envolvidas na hidrólise enzimática da celulose, o modelo atual é mostrado no seguinte esquema (RYU & MANDELS, 1980):

A utilização da celulose pelos microrganismos celulolíticos é um processo muito lento. Os microrganismos hidrolisam celulose em açúcares metabolizáveis pela produção

de um complexo sistema enzimático. A celulase extracelular pode ser produzida pelos organismos em resposta à presença de certos substratos no meio de crescimento. Entre os indutores da síntese de celulase incluem-se celulose, derivados da celulose, celobiose, soforose e lactose.

A resposta do fungo aos diferentes indutores varia dependendo da concentração e tipo de indutor (MANDELS et alii, 1975; ROMANELLI et alii, 1975).

A síntese da celulase indutiva também pode sofrer inibição pela presença de glicose ou outros açúcares no meio. Assim a síntese de celulase por microrganismos está regulada por um mecanismo de indução-repressão.

Na maioria dos sistemas de enzimas induzíveis, o indutor entra na célula por transporte ativo ou por difusão. Uma vez dentro da célula, o indutor interage com o repressor tornando-o inativo, o resultado é a síntese da enzima (JACOB & MONOD, 1961). As celulasas são enzimas induzíveis, incluindo-se entre os indutores a celulose, celobiose, soforose, lactose e alguns outros açúcares. A celulose é o indutor universal da síntese da celulase, porém, não é conhecido como a celulose, um substrato insolúvel, entra na célula. Tem sido proposto que o contato íntimo entre a celulose e o microrganismo celulolítico provoca a indução e síntese da celulase (BERG & HOFSTEN, 1976; RAUTELA & COWLING, 1966), mas, isto está em contraste com o conceito geralmente aceito de indução. MANDELS & REESE (1960) propuseram que pequenas quantidades de enzima podem ser produzidas pelas células e liberadas ao meio. A enzima então hidrolisa a celulose, provindo assim uma quantia limita-

da de celobiose a qual pode agir como indutor. Este fenômeno é conhecido como "síntese basal" em outros sistemas enzimáticos indutíveis. GONG & TSAO (1979) evidenciaram que o T.reesei também apresentava o fenômeno de síntese basal, produzindo traços de celulase em forma independente da fonte de carbono e ainda sob condições de carência (starvation), o que indica que esta síntese basal da celulase é constitutiva. HULME & STRANK(1970,1971) afirmam que a síntese da celulase é constitutiva e está regulada, somente, por repressão catabólica.

A capacidade da celulose para induzir a síntese de celulase depende da capacidade dos organismos em produzir "celulase basal". Sporotrichum tem uma quantidade de celulase basal maior que Trichoderma, assim, a lag fase da indução pela celulose é mais curta em Sporotrichum (ERIKSSON & HAMP, 1978). A "síntese basal" de celulase fornece uma quantidade limitada de glicose e celobiose no meio de crescimento contendo celulose. A celobiose é um indutor da celulase na maioria dos organismos celulolíticos e a concentração da celobiose é importante na regulação da síntese da celulase em muitos microrganismos. A resposta dos organismos à concentração de celobiose depende da linhagem. Em baixa concentração a celobiose é um bom indutor, enquanto que em alta concentração a celobiose inibe a síntese da celulase (MANDELS & REESE, 1960). Quando a concentração de celobiose no meio é alta, a celobiose pode ser hidrolisada pela celobiase intracelular depois de ter entrado na célula. Isto causa o acúmulo de glicose e assim a repressão.

A síntese da celulase é reprimida pela presen-

ça no meio de glicose e outros açúcares rapidamente metabolizáveis e este fenômeno é conhecido como repressão catabólica. A repressão catabólica dada pela glicose é chamada de "efeito glicose". A repressão da síntese da celulase em Trichoderma é mais intensa quando a glicose está presente. MANDELS (1975) relatou que a síntese da celulase pode ser inibida pela presença de glicose no meio ainda em presença de um indutor. A síntese de celulase recomeça depois da glicose ter sido consumida ou depois de transferir as células do meio com glicose para um meio com indutor.

Dado que um dos processos propostos para a utilização da celulose é a sua hidrólise enzimática seguida da fermentação dos açúcares produzidos. TAKAGI et alii (1978) demonstraram que a sacarificação e fermentação simultâneas é um método efetivo na produção de etanol a partir da celulose. TAKAGI (1984) afirma que a degradação mais acelerada da celulose por este método deve-se a uma menor inibição da celulase pelo etanol que pela glicose e/ou celobiose.

CHAPMAN & LOWENBERG (1976) tem demonstrado que a tradução da enzima ocorre no citoplasma ou no retículo endoplasmático o qual está incorporado dentro do complexo de Golgi e assim a celulase ou seus precursores sintetizados encontram-se dentro da célula. Do complexo de Golgi desprendem-se vesículas contendo celulase, estas vesículas que estão inicialmente no citoplasma, mais tarde fundem-se com a membrana plasmática e liberam seu conteúdo no meio por exocitose. Quando a formação da celulase é induzida, o aparecimento de vesículas contendo celulase no citoplasma, precede em cinco horas

ao aparecimento da celulase no meio.

O contato íntimo entre a celulose e as células do organismo é essencial para que ocorra a celulólise. A celulose pode ser hidrolisada pela celulase ligada ao sistema de membrana, mas na maioria dos fungos filamentosos, a celulólise ocorre fora da célula. Assim para a célula utilizar a celulose, nova enzima celulolítica deve ser sintetizada e liberada no meio. O mecanismo excretor da celulase em alguns casos é inespecífico e ocorre principalmente durante a lise da célula. Em outros casos acredita-se que a excreção da celulase é um processo específico influenciado pela fonte de carbono, pH, e alguns outros fatores do ambiente (MANDELS, 1975; COUTTS & SMITH, 1976). ERIKSSON & HAMP (1978), estudaram a regulação da endocelulase em Sporotrichum e Trichoderma reesei, e verificaram que depois da indução o aparecimento de celulase intracelular é quase imediatamente seguido pelo aparecimento de celulase extracelular. Isto indica que a excreção da endocelulase em alguns fungos filamentosos é um processo específico e não um processo inespecífico que ocorre quando há lise celular.

Há muitas evidências que sugerem que ambas as enzimas, endocelulases e exocelulases são co-induzidas, pelos indutores da celulase. Os mutantes bons produtores de celulases produzem quantidades elevadas de ambas celulases (MANDELS et alii, 1971; MONTENECOURT & EVELEIGH, 1977b). A indução e repressão simultânea de ambas celulases sugere um mecanismo de regulação coordenado análogo ao descrito para a enzima β -galactosidase em Escherichia coli. A celobiose estaria regulada por um mecanismo regulatório diferente.

2.2 O gênero Humicola.

O gênero Humicola é constituído por fungos des providos de reprodução sexuada, pertencente à classe Deuteromycetes e à família Dematiaceae. Diversas espécies deste gênero tem sido isoladas do solo, compostagem e madeira em decomposição (HARRINGTON et alii, 1979; MAZEN et alii, 1980; DEORAY & BHIDE, 1981; KLEYN & WETZLER, 1981; LYSEK et alii, 1982; ABDEL-KADER et alii, 1983; MOWE et alii, 1983).

Algumas espécies deste gênero tem sido estudadas devido ao interesse comercial que elas possuem; assim Humicola lutea 120-8:1 e H. lutea 72 apresentam atividade de protease ácida (ALEXIEVA et alii, 1980; NIKOLOVA et alii, 1980; GRIGOROV et alii, 1983). Por sua vez, Humicola sp ATCC 20620 apresenta atividade de rifamicina oxidase (LEE et alii, 1984; SEONG et alii, 1985). Humicola lanuginosa produtor de proteínase (SHENOLIKAR & STEVENSON, 1982), produtor de glucoamilase (TAYLOR et alii, 1978) e H. lanuginosa var. catenulata produtor de lipase (MORINAGA et alii, 1986).

Os fungos termófilicos estão entre os numerosos microrganismos que tem capacidade de produzir hidrolases extracelulares. Este tipo de microrganismo é interessante para a produção de enzimas em grande escala em fermentações submersas e em substrato sólido. Um dos problemas técnicos das fermentações é manter a temperatura no nível adequado durante todo o período do processo. O uso de linhagens termófilicas pode ser uma solução para este problema, já que enzimas destes microrganismos são estáveis a temperaturas mais altas que as

enzimas de linhagens mesofílicas. Além disso o uso de enzimas termoestáveis resulta num incremento da hidrólise e inibição do crescimento de outros microrganismos. Na literatura existe suficiente informação a respeito da produção de enzimas celulolíticas por parte de fungos termofílicos em fermentações submersas (COUTTS & SMITH, 1976; CANEVASCINI et alii, 1979; TRIVEDI & RAO, 1979; STEWART & PARRY, 1981; ARAUJO et alii, 1983; GOTTSCHALK et alii, 1984; SHAKER et alii, 1984; WASSERMAN, 1984; WASE et alii, 1985; COSSAR & CANEVASCINI, 1986; HAYASHIDA & MO, 1986; TAMADA et alii, 1986; MORRISON et alii, 1987) e pouca informação em fermentação de substratos sólidos (GRAJEK, 1987). A maior parte dos trabalhos sobre o gênero Humicola tratam de espécies termofílicas, sendo que uma boa parte das mesmas são produtoras de celulasas. Por exemplo, Humicola insolens isolado de tabaco é termofílico e capaz de produzir amilase e celulasas extracelulares (OGUNDERO, 1979); Humicola lanuginosa também termofílico e produtor de celulasas (OGUNDERO, 1981). Ambas espécies apresentaram atividade de FPA (JAIN, 1979). HAYASHIDA & YOSHIOKA (1980) isolaram de esterco um fungo termofílico, Humicola insolens YH-8, capaz de sintetizar quantidades significativas de celulase termoestável, em meio de cultura com farelo de trigo, após quatro dias de crescimento a 50°C. YOSHIOKA et alii (1982) encontraram que Humicola grisea var. thermoidea YH-78 era bom produtor de endocelulase quando crescido durante quatro dias a 50°C em farelo de trigo.

O fungo Humicola sp estudado no presente trabalho foi isolado de compostagem e mostrou-se capaz de produzir o complexo celulase parcialmente associado à massa celular

quando crescido em celulose microcristalina. Apresenta conidióforos curtos, com conídios globosos unicelulares, escuros formados no ápice do conidióforo (CHAVES, 1982). É um fungo termofílico carente de reprodução sexuada, com conídios multinucleados e hifas septadas multinucleadas. Apresentou um melhor crescimento a 42°C e pH 6,0 e altos níveis de produção de atividade de β -glicosidase. ARAÚJO et alii (1983) observaram que a atividade extracelular de β -glicosidase de Humicola sp é quatro vezes maior que a de Trichoderma reesei QM 9414. As características deste fungo despertaram o interesse de diversos pesquisadores que fizeram alguns estudos em diferentes aspectos. Por exemplo, MONTI et alii (1984) estudaram a regulação da síntese do complexo celulase; MORAES et alii (1985) caracterizaram a sua β -glicosidase. HARGER et alii (1986) em meio com glicose como única fonte de carbono, encontraram que o Humicola sp apresentou atividade intracelular constitutiva; MONTI & JORGE (1986) tentaram otimizar as condições para a produção de celulases; POLIZELI & TERENCEZI (1986) estudaram o efeito da glicose sobre a atividade da β -glicosidase; VIEIRA & PRADE (1986) avaliaram o efeito da repressão catabólica na biossíntese das suas enzimas celulolíticas; XIMENES & FELIX (1986) isolaram e caracterizaram a β -glicosidase intra e extracelular. Mais recentemente, MONTI & JORGE (1987) purificaram uma xilanase extracelular; PERALTA & JORGE (1987) estudaram a produção de β -glicosidase e β -galactosidase em diferentes condições de cultivo enquanto ZIMMERMANN & JORGE (1987) estudaram a sua atividade de trehalase. Foram feitos também estudos citogenéticos de mutantes morfológicos e a dosagem bioquímica dos mesmos (RODRIGUEZ, 1987).

2.3 Protoplastos

2.3.1 Esferoplastização.

A liberação de conteúdo citoplasmático na forma de protoplastos discretos a partir de células de fungos é mais facilmente conduzida usando uma mistura de enzimas líticas degradadoras de parede na presença de um estabilizador osmótico. Nos 20 anos que seguiram às primeiras observações sobre o isolamento de protoplastos em leveduras (EDDY & WILLIAMSON, 1957) e em fungos filamentosos (EMERSON & EMERSON, 1958; BACHMAN & BONNER, 1959) foi conseguido um progresso considerável nos métodos de obtenção de protoplastos. Isso foi devido, principalmente, à descoberta de novas enzimas (PEBERDY, 1985a). As enzimas utilizadas no presente trabalho, Novozym 234 e Celulase CP tem atividade de quitinase e α e β -1,3-glucanase. A Novozym 234 é produzida pela Novo Industri A/S, Denmark a partir do Trichoderma sp e a Celulase CP produzida pela John e E. Sturge Ltd., England a partir do Penicillium funiculosum. Segundo HAMLYN et alii (1981) esta última enzima aumentava a atividade da Novozym 234 melhorando sua eficiência o que se traduz numa maior obtenção de protoplastos. O tempo de tratamento enzimático na obtenção de protoplastos é importante pois uma incubação prolongada pode inviabilizar os primeiros protoplastos liberados, ou mesmo regenerando formar hifas aberrantes (GABRIEL, 1968). Além das enzimas líticas e do tempo de tratamento do micélio com as mesmas, os estabilizadores osmóticos, a idade fisiológica do fungo e as condições e composição do meio de cultivo do mesmo, também são importantes deter-

minantes da produção de protoplastos (DAVIS, 1985).

Devido à retirada da parede celular os protoplastos são células osmoticamente sensíveis, sendo assim de grande importância a utilização de estabilizadores osmóticos adequados. Diversos tipos de estabilizadores osmóticos, incluindo sais inorgânicos, açúcares e açúcares-álcoois, têm sido utilizados para estabilizar protoplastos. O tipo de estabilizador e a sua concentração são os fatores que influenciam sobre a obtenção e a estabilidade dos protoplastos; estes fatores variam de uma espécie para outra, e portanto não existe um estabilizador osmótico "universal" adequado para todos os fungos. Em geral os sais inorgânicos são mais adequados para fungos filamentosos enquanto que os açúcares e açúcares-álcoois o são para as leveduras (DAVIS, 1985).

Em geral são obtidos mais protoplastos de micélios que se encontram em fase exponencial de crescimento que em micélios em fase estacionária (BENITEZ et alii, 1975; DEUTCH & PARRY, 1974; PEBERDY et alii, 1976; SCHWENCKE et alii, 1977). SAGARA (1969) demonstrou que a parede de células jovens de Geotrichum candidum é mais susceptível à ação enzimática e a medida que a cultura tem mais idade há um incremento na resistência à lise da mesma. Porém, em alguns casos tem sido obtido um bom número de protoplastos a partir de micélio em fase estacionária. Por exemplo, em P. chrysogenum em fase estacionária conseguiu-se abundantes protoplastos, sendo sugerido que enzimas líticas endógenas podem estar presentes nas suas células (EYSEN 1977).

A utilidade e aplicabilidade da técnica de fusão de protoplastos na genética e melhoramento de fungos é

consequência de muitos estudos básicos na obtenção e cultivo de protoplastos, mas o sucesso na aplicação desta técnica deve-se a uma alta porcentagem de regeneração e a uma boa frequência de fusão dos protoplastos. Porém, a maior parte dos estudos com protoplastos tem sido microscópicos e fisiológicos, tendo estes contribuído significativamente para o conhecimento atual em muitas áreas de fisiologia e bioquímica de microrganismos (EDDY & WILLIAMSON, 1957; STREIBLOVA, 1968; HAVELKOVA & MENSÍK, 1969; HOUSSET et alii, 1975; BASTIDE et alii 1979). Outra das áreas na qual a esferoplastização tem desenvolvido um papel fundamental, foram os estudos de composição e síntese da parede celular de microrganismos (NECAS, 1971).

Até a descoberta da técnica de fusão de protoplastos, a recombinação genética em fungos só podia ser obtida por processos sexuais ou parassexuais. Ambos são consequências de fusão, no primeiro caso de células reprodutivas especializadas no segundo de células somáticas com núcleos geneticamente diferentes. Mediante a técnica de fusão de protoplastos de fungos foi possível a obtenção de heterocáries e de híbridos entre linhagens e entre espécies que não poderiam ter sido cruzadas por processos convencionais (PEBERDY, 1985b). Porém, a simples produção de protoplastos e sua posterior regeneração, não se constitui num sistema de recombinação. No entanto, com esta técnica, surgiu a possibilidade de juntar genomas diferentes em uma mesma célula. Graças a ela foi possível a fusão de protoplastos entre linhagens ou mesmo espécies diferentes, desta forma abriu-se um novo campo que permitiu a obtenção de recombinantes. Inclusive, isso facilitou

uma das etapas do ciclo parassexual, ou seja, a obtenção de diplóides em fungos (AZEVEDO, 1983).

Essa nova técnica de fusão de protoplastos e posterior fusão de núcleos já nos protoplastos, abreviando e facilitando o ciclo parassexual, abriu a possibilidade de realizar estudos genéticos em fungos, cuja anastomose entre hifas é difícil ou mesmo impossível devido a problemas de incompatibilidade; permitiu também que cruzamentos interespecíficos pudessem ser feitos visando combinar qualidades favoráveis de diferentes fungos num mesmo indivíduo com vistas ao melhoramento genético (PEBERDY, 1979), superando então a barreira da especificidade. Assim a obtenção de novos híbridos interespecíficos acabou-se convertendo em uma das mais importantes aplicações da tecnologia de fusão de protoplastos.

Outro aspecto interessante do uso de protoplastos é a transferência de organelas celulares pela fusão dos mesmos, ou seja, o estudo de casos de herança citoplasmática pela fusão de um protoplasto sem núcleo com outro nucleado e verificando-se as características do produto formado nestes chamados "cíbridos". Também os protoplastos de fungos anucleados podem ser utilizados como vetores de material genético de outros microrganismos.

Dentre todos os estudos com protoplastos aquele que teve maior repercussão foi a fusão de protoplastos assim esta técnica surgiu como uma opção importante no melhoramento de microrganismos.

2.3.2. Fusão de Protoplastos

2.3.2.1. Fusão de Protoplastos por tratamento com Polietilenoglicol.

Segundo FERENCZY (1981) a fusão de protoplastos foi observada pela primeira vez por MELLON em 1925 em S. aureus protoplastos bacterianos; porém o fenômeno foi questionado por algum tempo até que SMITH em 1944 e trabalhos posteriores confirmaram este fato. A descoberta da fusão espontânea de protoplastos em bactérias foi seguida pela mesma descoberta em leveduras, Saccharomyces e Candida (MULLER, 1970).

A ocorrência de fusão espontânea tinha frequências muito baixas e foi somente após a descoberta, de KAO & MI CHAYLUKE (1974) em protoplastos de plantas, que o polietilenoglicol (PEG) atua como agente fusogênico de protoplastos que foi possível o desenvolvimento de técnicas de fusão controladas capazes de aumentar a frequência da mesma.

ANNE & PEBERDY (1975 e 1976) determinaram as melhores condições para a fusão de protoplastos utilizando polietilenoglicol (PEG) como agente fusogênico. Comprovaram que a adição de ions cálcio, na mistura, em concentração de 0.01M é fundamental para a obtenção de uma alta frequência de fusão. Também estabeleceram que a concentração de PEG deve ser superior a 20%, sendo de 30 a 40% as concentrações que oferecem melhores resultados.

ANNE & PEBERDY (1976) realizaram fusões intra-específicas em diversos fungos filamentosos: Penicillium chrysogenum, P. patulum, P. roquefortii, Aspergillus

nidulans, A. niger e Cephalosporium acremonium, obtendo heterócarios em alta frequência. Mais recentemente, diferentes autores realizaram trabalhos de fusão de protoplastos intraespecíficos em diversos fungos filamentosos. Assim TOYAMA et alii (1984) realizaram a fusão de protoplastos de duas linhagens de T. reesei produtoras de celulasas; KIRIMURA et alii (1986, 1987) fundiram duas linhagens diferentes de Aspergillus niger produtoras de ácido cítrico; SILVEIRA & AZEVEDO (1987) fundiram duas linhagens de Metarhizium anisopliae fungo entomopatogênico utilizado para controle biológico de insetos; também OGAWA et alii (1987) fundiram mutantes morfológicos do Trichoderma reesei QM 9414 obtendo setores de tipo selvagem e com um conteúdo de DNA 1,9 vezes maior que os parentais fazendo pensar que tratava-se de diploides.

Também foram realizadas com esta técnica diversas fusões interespecíficas em fungos filamentosos. KEVEI & PEBERDY (1977) fundiram protoplastos de Aspergillus nidulans e A. rugulosus obtendo híbridos diplóides que logo segregaram dando os parentais de morfologia alterada; ANNE et alii (1976) fundiram protoplastos de Penicillium chrysogenum e Penicillium roquefortii obtendo híbridos de morfologia e estabilidade variáveis; KEVEI & PEBERDY (1984) obtiveram fusão de protoplastos entre diferentes espécies de Aspergillus nidulans, A. rugulosus e A. quadrilineatus. Na fusão interespecífica, a frequência de complementação de marcas é menor que na intraespecífica sendo que a diferença pode ser de mais de 5 ordens de magnitude (FERENCZY, 1981). A hibridação interespecífica por

esta técnica em Aspergillus até o presente momento não teve muito sucesso, os produtos de fusão tem crescido em forma pobre tendo sido bastante instáveis e segregaram apenas um dos fenótipos parentais utilizados. A fusão interespecífica em Penicillium parece ter dado melhores resultados sendo mais estável quando a pressão seletiva não está presente e após a segregação todas as marcas genéticas podem ser recuperadas (FERENCZY, 1981; PEBERDY, 1985).

2.3.2.2. Fusão de Protoplastos por Eletrofusão.

É uma técnica de fusão baseada na exposição das células ou protoplastos a um campo elétrico alternado não uniforme e de baixa intensidade, seguido pela aplicação de um pulso elétrico curto de alta intensidade.

Esta técnica tem como principais vantagens uma frequência de fusão muito maior que a obtida pela fusão química; não utiliza compostos tóxicos para a célula como é o caso do PEG que pode afetar a viabilidade dos protoplastos; além disso o processo de fusão de protoplastos pode ser acompanhado no microscópio.

Um dos pré-requisitos para a fusão é que exista um contato íntimo entre as membranas das células. O contato de membrana entre pelo menos duas células é conseguido pela dieletroforese, interação mútua entre as células que tem sido convertidas em dipolos pelo campo elétrico alternado não uniforme (POHL, 1978). Com o propósito de fusionar as células

deve-se estabelecer um contato de membrana mais íntimo e para isso deve-se aumentar a intensidade do campo elétrico por um curto período de tempo (ZIMMERMANN & PILWAT, 1978; ZIMMERMANN & SCHEURICH, 1981).

A iniciação da fusão esta dada por uma corrente elétrica de quebra da membrana na zona de contato. Porém se a membrana celular é polarizada muito rapidamente e numa voltagem muito elevada essa quebra elétrica da membrana esta associada a um incremento reversível na condutividade e permeabilidade. Desta forma os efeitos induzidos na membrana pela quebra elétrica são completamente reversíveis e após um certo intervalo a resistência de membrana e impermeabilidade original são re-estabelecidas; mas se a intensidade ou o tempo de exposição a essa corrente elétrica são intensos demais o fenômeno de quebra elétrica torna-se uma quebra mecânica e irreversível. Pensa-se que a compressão eletromecânica da membrana leva a sua quebra pela formação de poros; a densidade dos mesmos tem sido estimada em $10^7 / \text{cm}^2$. A formação de poros persiste por alguns microsegundos incrementando a permeabilidade da membrana. Isto permite um intercâmbio de componentes extra e intracelulares por difusão. O tamanho de molécula capaz de passar através da membrana depende da intensidade do campo elétrico e do tempo de tratamento (ZIMMERMANN, 1982). Quanto maior intensidade e tempo de exposição, maior será o tamanho de molécula que poderá passar; porém se eles excederem em muito os parâmetros requeridos para produzir a quebra da membrana a destruição da mesma e portanto da célula será irreversível (ZIMMERMANN et alii, 1981).

A fusão se produz porque, devido ao campo elétrico, as moléculas lipídicas da membrana orientam-se nos poros abertos de maneira de formar uma ponte abrindo túneis. Esta configuração é instável devido à grande curvatura da superfície dos túneis e à grande tensão superficial das células. Dessa maneira forma-se uma célula esférica grande produzindo-se assim a fusão celular.

A técnica de eletrofusão tem sido aplicada na fusão de protoplastos de plantas (SENDA et alii, 1979; ZIMMERMANN et alii, 1980; ZIMMERMANN & SCHEURICH, 1981; ZIMMERMANN, 1982), células de mamíferos (ZIMMERMANN & VIENKEN, 1982) e lipossomos (BUSCHL et alii, 1982). Em microrganismos foi utilizada para a fusão de protoplastos de bactérias, Bacillus thuringensis (BERG et alii, 1984); de leveduras, S.cerevisiae (WEBER et alii, 1981; HALFMANN et alii, 1982; HALFMANN et alii, 1983; BERG et alii, 1984; SCHNETTLER & ZIMMERMANN, 1985), Saccharomycopsis lipolytica (WEBER et alii, 1981; BERG et alii, 1984) e Lodderomyces elongisporus (JACOB et alii, 1979) assim como na transferência de mitocôndrias em leveduras (HALFMANN et alii, 1982) e transformação de B. thuringensis (BERG et alii, 1984). Porém, não foram encontradas referências sobre o uso da técnica de eletrofusão em fungos filamentosos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagem Utilizada.

A linhagem utilizada de Humicola sp foi isolada de compostagem por CHAVES (1982) no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa.

3.2 Meios de Cultura Utilizados.

3.2.1 Meio Mínimo Sólido (MM)(PONTECORVO et alii, 1953)

NaNO_3		6,00 g
KH_2PO_4		1,50 g
KCl		0,50 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0,50 g
FeSO_4		0,01 g
ZnSO_4		0,01 g

Glicose	10,00 g
Agar (DIFCO).....	15,00 g
Agua Destilada	1.000,00 ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1N.

3.2.2 Meio Completo Sólido (MC)(PONTECORVO et alii, 1953) modificado por AZEVEDO & COSTA (1973).

Ao meio mínimo sólido (item 3.2.1) foram adicionados:

Peptona	2,00 g
Caseína Hidrolisada...	1,50 g
Extrato de Levedura ..	0,50 g
Solução de Vitaminas...	1,00 ml
Solução de Ácidos Nucleicos de Levedura	1,00 ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1 N.

3.2.3 Meio Mínimo 2x Concentrado.

Preparado segundo a composição do MM (item 3.2.1), onde cada componente foi adicionado em quantidade dobrada, com exceção da água.

3.2.4 Meio Completo 2x Concentrado.

Preparado segundo a composição do MC (item 3.2.2), onde cada componente foi adicionado em quantidade do-

brada, com exceção da água.

3.2.5 Meio Mínimo Líquido.

Preparado segundo a composição do MMH (item 3.2.7) sem adicionar o ágar e sem glicose. Uma solução de glicose 20% foi preparada por separado, autoclavada a média atmosfera por 30 minutos e logo adicionada ao MM líquido na proporção de 1:20.

3.2.6 Meio para crescimento de Micélio.

Ao meio mínimo líquido (item 3.2.5) foram adicionados 5,0 g/l de extrato de levedura e 2,0 g/l de caseína hidrolisada.

3.2.7 Meio Mínimo para Humicola sp (MMH) (MACEDO, 1986)

No momento de uso, 5,0 ml das soluções de tiamina e biotina foram adicionados a 1.000,00 ml de MM (item 3.2.1) fundido.

3.2.8 Meio para Regeneração de Protoplastos.

No momento de uso, o MC 2x concentrado (item 3.2.4) foi diluído com a solução do estabilizador osmótico, MgSO_4 0,5 M em tampão fosfato 0,02 M pH 5,6, na proporção de 1:1.

3.2.9 Meio para Visualização de halo de degradação de celulose.

KCl		3,8 g
K_2HPO_4		2,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$		0,1 g
$(NH_4)_2SO_4$		1,0 g
Extrato de malte		0,6 g
Citrato de Sodio		
$(Na_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O)$		2,94g
Agar		15,00g
Água Destilada		1.000,00 ml

Este meio foi acrescentado de Celulose Ácida, preparada segundo TANSEY (1971), em concentração de 10 g/l. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1 N.

3.2.10 Meio de Petterson para Produção de Celulases (PETTERSON et alii, 1963).

$(NH_4)_2SO_4$		0,2 g
KH_2PO_4		1,2 g
K_2HPO_4		0,8 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$		0,5 g
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$		5,0 g
$ZnSO_4$		4,4 g
$MnSO_4$		5,0 g
$CaCl_2$		50,0 g

Extrato de Levedura

(DIFCO) 0,5 g

Proteose-peptona

(DIFCO) 1,0 g

Celulose Microcristalina. 20,0 g

Água Destilada1.000,0 ml

O pH foi ajustado para 5,8 com H_3PO_4 2N.

3.2.11 Meio E para Produção de Celulases.

Preparado segundo a composição do meio para visualização do halo de degradação de celulose (item 3.2.9) com a exceção da celulose ácida ter sido substituída por celulose microcristalina e sem adicionar agar.

3.2.12 Meio para Mutantes Desreprimidos.

KCl 3,80 g

K_2HPO_4 2,00 g

MgSO_4 0,10 g

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,00 g

Extrato de Malte 0,60 g

Celulose Ácida 5,00 g

Glicose 30,00 g

Citrato de Sódio

$(\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O})$ 2,94 g

Agar 15,00 g

Água Destilada1.000,00 ml

A celulose ácida foi preparada segundo TANSEY (1971). O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1N.

3.2.13 Meios com 2-Deoxiglicose.

No meio completo (item 3.2.2) foi substituída a glicose pela 2-Deoxiglicose e no meio E (item 3.2.11) foi adicionado 1% de 2-Deoxiglicose.

3.3. Soluções Utilizadas.

3.3.1 Solução de Tween 80.

Tween 80 1 ml

Água Destilada 1000 ml

A solução foi distribuída em alíquotas de 2,5 ml, para tubos de ensaio.

3.3.2 Solução Salina (0,85%).

NaCl 8,5 g

Água Destilada 1.000 ml

A solução foi distribuída em frascos com tampa de rosca com 9 ml cada um.

3.3.3 Solução de Vitaminas (PONTECORVO et alii, 1953) modificada por (AZEVEDO & COSTA, 1973)

Acido Nicotínico 100,0 mg

Acido p-aminobenzóico 10,0 mg

Biotina	0,2 mg
Piridoxina.....	50,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Tiamina	50,0 mg
Água Destilada	
Esterilizada	100,0 ml

A solução foi aquecida em banho-maria a 90°C por 20 minutos e conservada em frasco escuro, no refrigerador a 4°C, sob clorofórmio.

3.3.4 Solução de Ácidos Nucleicos de Levedura (AZEVEDO & COSTA, 1973).

Solução A

Ácido Nucleico

de Leveduras 2,0 g

Solução de HCl 1 N 15,0 ml

Solução B

Ácido Nucleico

de Levedura 2,0 g

Solução de NaOH 1N 15,0 ml

Ambas soluções foram aquecidas em banho-maria a 90°C por 20 minutos, misturadas e o pH ajustado para 6,0 com NaOH 1 N. A mistura foi filtrada, o volume completado para 40 ml com água destilada esterilizada e conservada em frasco escuro, no refrigerador a 4°C, sob clorofórmio.

3.3.5 Solução de Caseína Hidrolisada.

Caseína Hidrolisada100,0 mg

Água destilada

Esterilizada 10,0 ml

A solução foi aquecida em banho-maria a 90°C por 20 minutos e conservada em refrigerador a 4°C.

3.3.6 Solução de Extrato de Levedura.

Extrato de Levedura100,0 mg

Água destilada

Esterilizada 10,0 ml

A solução foi aquecida em banho-maria a 90°C por 20 minutos e conservada em frasco escuro no refrigerador a 4°C.

3.3.7 Soluções de Aminoácidos para Caracterização de Mutantes Auxotróficos.

Soluções dos 20 aminoácidos empregados (ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, arginina, asparagina, cisteína, cistina, fenil-alanina, glicina, glutamina, histidina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptófano e valina) foram preparadas em concentração de 1% ; 100,00 mg de cada aminoácido foram colocados em frascos com 10,0 ml de água destilada esterilizada. Os frascos foram aquecidos em banho-maria a 80°C por 30 minutos e, para facilitar a dissolução dos aminoácidos, foi adicionada uma gota de

HCl 1 N. As soluções foram conservadas em refrigerador a 4°C.

3.3.8 Solução de NaOH 1 N.

NaOH 4,0 g

Água Destilada100,0 ml

A solução foi conservada a temperatura ambiente.

3.3.9 Solução de HCl 1 N.

HCl 8,5 ml

Água Destilada100,0 ml

A solução foi conservada a temperatura ambiente.

3.3.10 Tampão Fosfato 0,02 M pH 5,6.

Solução A ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,02 M)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2,76 g

Água Destilada1000,00 ml

Solução B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 M)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5,36 g

Água Destilada1000,00 ml

Ambas soluções foram conservadas, separadamente no refrigerador. O tampão fosfato 0,02 M pH 5,6 foi preparado no momento do uso, adicionando-se a solução B em 920 ml de solução A até atingir pH 5,6.

3.3.11 Tampão Fosfato pH 7,0.

Solução A

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 3,73 g
 Água Destilada 1000,00 ml

Solução B

KH_2PO_4 2,40 g
 Água Destilada 1000,00 ml

A solução A foi misturada com a solução B na proporção 7:3 , o pH foi ajustado para 7,0 e a mistura conservada em refrigerador a 4°C.

3.3.12 Tampão Citrato 0,05 M pH 4,8.

Solução A (Ácido Cítrico 0,05 M)

Ácido Cítrico

Monohidratado 10,505 g
 Água Destilada 1.000,000 ml

Solução B (Citrato de Sódio 0,05 M)

Citrato de Sódio 14,705 g
 Água Destilada 1.000,000 ml

A solução A foi adicionada a 500,0 ml da solução B até pH 4,8 e a mistura conservada em refrigerador a 4°C.

3.3.13 Solução de Albumina 5% (ROBINOW & CATEN, 1969)

Clara de ovo 5,0 ml

Água destilada

Esterilizada 95,0 ml

A mistura foi homogeneizada, filtrada e conservada em frasco escuro no refrigerador.

3.3.14 Solução Estoque de Giemsa (BEÇAK & PAULETE, 1976).

Giemsa em pó 3,8 g

Metanol 250,0 ml

Glicerina 250,0 ml

As substâncias foram misturadas pela ordem e a mistura foi conservada em vidro de tampa esmerilhada por 72 horas antes de ser utilizada. Esta solução foi conservada à temperatura ambiente.

3.3.15 Solução Corante de HCl Giemsa (FURTADO, 1968).

Solução estoque de Giemsa ... 1,0 ml

Solução tampão fosfato

pH 7,0 10,0 ml

As duas soluções foram misturadas no momento de uso.

3.3.16 Soluções de Álcool Etílico.

As soluções foram preparadas nas concentrações de 95, 70 e 50% diluindo-se o álcool com água destilada e foram conservadas a temperatura ambiente.

3.3.17 Solução de Fixação.

No momento do uso, foi preparada uma solução de álcool etílico absoluto, ácido acético glacial e ácido láctico na proporção 6:1:1.

3.3.18 Reagente Acido Dinitro Salicílico (DNS).

Ácido 3,5-dinitrosalicílico	5,3 g
NaOH	9,7 g
Água destilada	708,0 ml

Os reagentes acima foram dissolvidos lentamente e em seguida foram adicionados:

Tartarato de sódio e potássio	153,0 g
Fenol (a 50°C)	13,8 g
Metabissulfito de Sódio	4,2 g

A mistura foi conservada em frasco escuro à temperatura ambiente.

3.3.19 Solução de PBS.

NaCl	8,18 g
KCl	0,20 g
KH_2PO_4	0,20 g
Na_2HPO_4	1,15 g
Água Destilada	1000,00 ml

3.3.20 Solução Estoque de Tiamina .

Tiamina	4,0 mg
Água Destilada	
Esterilizada	10,0 ml

A solução foi aquecida em banho-maria a 90°C por 20 minutos e conservada em refrigerador.

3.3.21 Solução Estoque de Biotina.

Biotina	4,0 mg
Água Destilada	
Esterilizada	10,0 ml

A solução foi aquecida em banho-maria a 90°C por 20 minutos e conservada em refrigerador.

3.3.22 Soluções de Tiamina e Biotina.

Tiamina1,0 ml da solução estoque de
tiamina em 9,0 ml de água Desti
lada esterilizada.

Biotina1,0 ml da solução estoque de
biotina em 9,0 ml de água des-
tilada esterilizada.

As soluções foram preparadas no momento de uso.

3.3.23 Solução de MgSO_4 0,5 M pH 5,6.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 123,24 g

Solução A

(tampão fosfato 0,02 M

pH 5,6) 500,00 ml

Solução B (tampão fosfato 0,02 M pH 5,6) foi
adicionada até pH 5,6 e o volume completado para 1.000,00 ml
com tampão fosfato 0,02 M pH 5,6 (item 3.3.10).

3.3.24 Solução de Sacarose 0,8 M pH 5,6 e pH 7,0.

Sacarose 27,38 g

Água Destilada 100,00 ml

O pH foi ajustado para 5,6 e 7,0 com HCl ou
NaOH segundo o caso.

3.3.25 Solução de Sorbitol 0,8 M pH 7,0

(SCHNETTLER & ZIMMERMANN, 1985 modificado).

CaCl_2 0,011 g

MgCl_2 0,010 g

Sorbitol 14,570 g

Água Destilada 100,00 ml

O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH.

3.3.26 Solução de Sorbitol 1,2 M pH 7,0 (Schnettler e Zimmermann, 1985 modificado).

CaCl ₂		0,011	g
MgCl ₂		0,010	g
Sorbitol		21,86	g
Agua Destilada		100,00	ml

O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH.

3.3.27 Solução de Sorbitol 0,8 M pH 7,0 com PEG 20% e 40%.

As soluções foram preparadas segundo o item 3.3.25 adicionada de PEG (6.000) nas concentrações de 20% e 40%.

3.3.28 Solução de Benlate.

Benlate		10	mg
Agua Destilada Esterilizada.		200	ml

Primeiramente o benlate foi dissolvido em uma gota de acetona, logo adicionou-se a água. Esta solução foi fervida em banho-maria durante 20 minutos e adicionada no meio de cultivo nas concentrações ensaiadas. A solução foi mantida no refrigerador.

3.3.29 Solução de Acriflavina.

Acriflavina		10	mg
Agua Destilada Esterilizada		100	ml

Esta solução foi fervida em banho-maria durante 20 minutos e adicionada ao meio de cultivo nas concentrações ensaiadas. A solução foi mantida em frasco escuro no refrigerador.

3.3.30 Solução de Cristal Violeta.

Cristal Violeta 10 mg
 Água Destilada
 Esterilizada 100 ml

Esta solução foi fervida em banho-maria durante 20 minutos e adicionada ao meio de cultivo nas concentrações ensaiadas. A solução foi mantida em frasco escuro no refrigerador.

3.3.31 Tampão Tris HCl 0,1 M pH 8.

Trizma Base 1,21 g
 Água Destilada 100,00 ml

O pH foi ajustado para pH 8 com HCl.

3.3.32 Vermelho Congo 0,025% pH 8.

Vermelho Congo 0,025 g
 Tampão Tris HCl 0,1 M pH 8 .. 100,000 ml

3.3.33 NaCl 0,5 M pH 8.

NaCl 3,42 g
 Tampão Tris HCl 0,1 M pH 8 .. 100,000 ml

3.3.34 Esterilização e Conservação.

Exceto quando expressamente mencionado os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121°C

durante 15 minutos e conservados em refrigerador.

3.3.35 Incubação.

Exceto quando expressamente mencionado, a cultura empregada neste trabalho foi crescida em placas com Meio Completo por 7 dias a 42°C.

3.4 Técnica semiquantitativa de avaliação da produção de celulasas em Humicola sp.

Para os estudos de melhoramento genético realizados neste trabalho, visando incrementar a produção de enzimas celulolíticas em Humicola sp, tornou-se necessário o desenvolvimento de uma técnica para quantificar de modo simples e rapidamente a produção de celulasas. Desta forma poderia-se isolar mutantes de alta produção destas enzimas, permitindo assim o melhoramento genético deste fungo.

3.4.1 Meios de Cultivo ensaiados.

A partir do meio de cultivo utilizado por CHAVES (1982), que não promove a formação de halo de degradação de celulose foi desenvolvido um meio que permite a visualização de halo e quantificação da capacidade celulolítica em Humicola sp pela medição do diâmetro do halo formado. A composição (g/l) desse meio é a seguinte: KCl 3,8; K_2HPO_4 2,0 ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1; $(NH_4)_2SO_4$ 1,0; Extrato de Malte ou de Levedura 0,6; Celulose Ácida 10,0 ; Agar 15,0 e Citrato de Sódio

5 ou 10 mM. Deste meio básico derivaram os quatro meios utilizados no presente trabalho, de acordo com a quantidade de citrato de sódio usada e emprego de extrato de malte ou de levedura: Meio 1: Extrato de Levedura; Citrato de Sódio 5mM. Meio 2: Extrato de Levedura; Citrato de Sódio 10 mM. Meio 3: Extrato de Malte; Citrato de Sódio 5mM. Meio 4: Extrato de Malte; Citrato de Sódio 10mM.

3.4.2. Condições de Cultivo: Inoculação, Incubação e Choque térmico.

Foram inoculadas cinco colônias por placa e estas mantidas em incubação durante 3,5, 7 e 10 dias a 42°C. Após a incubação o material foi submetido a um choque térmico de 50°C durante 16 horas. A seguir foi medido o diâmetro da colônia, observada a presença de halo e determinado o índice de atividade enzimática (IAE= diâmetro halo/diâmetro colônia).

3.4.3 Técnica de Coloração.

Foi ensaiado o processo de coloração descrito por TEATHER & WOOD (1982) utilizando vermelho congo além de uma modificação desse processo. Neste caso, após a incubação e choque térmico, foram utilizados 10 ml por placa de solução de vermelho congo (0,025%) em tampão Tris HCl 0,1 M pH 8 (item 3.3.32). Após 30 minutos, retirou-se essa solução e lavou-se a placa com 5 a 6 ml de NaCl 0,5 M em tampão Tris HCl 0,1 M pH 8 (item 3.3.33) durante 5 minutos.

3.5 Protoplastos de Humicola sp.

3.5.1 Obtenção de Protoplastos.

Os protoplastos foram obtidos a partir de micélio dado que os conídios de Humicola sp são multinucleados (fig. 7b, 7d). Foi utilizada a técnica descrita por FEBERDY (1979) com modificações sugeridas por MACEDO & AZEVEDO (1985). Uma suspensão de conídios de Humicola sp foi preparada em solução de Tween 80 (item 3.3.1) e o número de conídios por mililitro foi determinado com o auxílio da câmara de Neubauer. Com esta suspensão inoculou-se um erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de meio para produção de micélio (item 3.2.6) previamente esterilizado, dando uma concentração final de 10^5 conídios/ml de meio. Este foi mantido em agitador rotatório (150 rpm) a 40°C durante 20 horas. O micélio produzido foi filtrado em funil de Büchner com o auxílio de bomba de vácuo e lavado com o estabilizador osmótico $MgSO_4$ 0,5 M em tampão fosfato 0,02 M pH 5,6 (item 3.3.23). O peso úmido do mesmo foi determinado em balança analítica. A protoplastização foi feita adicionando a este micélio um complexo de enzima lítica (HAMLIN et alii 1981) e em presença do estabilizador osmótico $MgSO_4$ 0,5 M na proporção de 50 mg de micélio: 5 mg de enzima lítica (50% de celulase CP e 50% de Novozym 234): 1,0 ml do estabilizador osmótico. Esta mistura foi mantida em agitador recíproco (120-rpm) durante 3 horas. Em seguida, uma gota da suspensão foi colocada entre lâmina e lamínula e, com o auxílio de um microscópio, pôde-se observar a presença de protoplas

tos. Confirmada a presença dos mesmos, a suspensão foi centrífuga por 30 segundos a 500 rpm e o sobrenadante retirado e centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensado no estabilizador osmótico e novamente centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm. Esta operação foi repetida mais duas vezes. Os protoplastos obtidos foram ressuspensos em volume conhecido do estabilizador osmótico e, com o auxílio da câmara de Neubauer, foi determinado o número de protoplastos por mililitro de suspensão.

3.5.2 Regeneração de Protoplastos.

Com os protoplastos obtidos e uma vez conhecido o número de protoplastos por mililitro de suspensão como descrito no item 3.5.1 foram realizadas diluições apropriadas também no estabilizador osmótico. Em seguida, 1 ml dessas diluições foi semeado por "pour plate" em MC; MC MgSO_4 0,25 M e MC MgSO_4 0,5 M. A metade das placas foi incubada a 42°C durante 7 dias e a outra metade a 28°C durante 24 horas e logo transferidas a 42°C até completar 7 dias de incubação. A regeneração foi constatada pelo crescimento de colônias no MC+estabilizador enquanto a presença de células não protoplastizadas foi constatada pelo crescimento de colônias no MC.

A porcentagem de regeneração foi calculada aplicando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ regeneração} = \frac{B - A}{C} \times 100;$$

onde: A : N° de colônias crescidas em MC.

B : N° de colônias crescidas em MC+estabilizador.

C : N° de protoplastos/ml da suspensão.

3.5.3 Curva de Sobrevivência de Protoplastos á luz Ultravioleta (UV).

Foi utilizada uma lâmpada de luz ultravioleta Mineralight (Modelo N°R-52) de 2537 Å, previamente estabilizada durante 15 minutos. O material a ser irradiado foi colocado a uma distância de 19,2 cm da fonte de irradiação, a dose de UV foi de 5 joules/m²/seg.

A suspensão de protoplastos a ser irradiada foi obtida e a sua concentração estimada segundo o item 3.5.1. Os tempos de exposição da suspensão á luz UV foram de 0, 10, 20, 40, e 80 segundos correspondendo doses de 0, 50, 100, 200 e 400 joules. Para cada um desses tempos, foram feitas diluições apropriadas em MgSO₄ 0,5 M em tampão fosfato 0,02 M pH 5,6. Em seguida, 1 ml de cada diluição foi semeado por "pour plate" em MC MgSO₄ 0,25 M. As placas foram incubadas a 28°C durante 24 horas na ausência total de luz e logo transferidas para 42°C até completar 7 dias de incubação. O tempo zero correspondente a colônias não irradiadas foi considerado o 100% de sobrevivência.

3.5.4 Técnica do Doador Morto.

A suspensão de protoplastos foi obtida e a sua concentração determinada segundo o descrito no item 3.5.1.

Uma vez obtidos e contados, os protoplastos foram transferidos para tubos de ensaio de inox e colocados em banho-maria onde foram submetidos a diferentes tratamentos térmicos. A seguir eles foram semeados em MC MgSO_4 0,25 M a 28°C durante 24 horas e de aí transferidos a 42°C até completar 7 dias de incubação.

3.5.5 Liberação de protoplastos a partir do micélio.

A procura da obtenção de protoplastos uninucleados, de interesse para estudos genéticos e de melhoramento, motivou o estudo do processo de liberação de protoplastos a partir do micélio. Com esse fim foram obtidos protoplastos, como descrito no item 3.5.1, com diferentes tempos de tratamento enzimático, variando de 30 minutos até 3 horas. Para cada um deles foi determinado o número de protoplastos obtidos por mililitro de suspensão e calculada a frequência de regeneração (itens 3.5.1 e 3.5.2). Também foi realizada a coloração de protoplastos, determinada a frequência do número de núcleos dos mesmos e medido o diâmetro dos protoplastos de 30 minutos e de 3 horas.

3.5.5.1 Coloração de Conídios e Protoplastos (TANAKA et alii, 1979)

A coloração de conídios assim como de protoplastos constou dos seguintes passos:

- Montagem da lamínula: colocou-se sobre lamínula uma gota de solução de Albumina-glicerina e uma gota da suspensão de conídios ou protoplastos. Misturaram-se ambas gotas e secou-se por discreto aquecimento.

- Fixação: deixou-se a lamínula como material na solução fixadora (item 3.3.17) durante 30 minutos.
- Hidratação: o material foi tratado com álcool 95% por 5 ~~seg~~ 10 minutos ; álcool 70% (mínimo 2 horas) e lavou-se ligeiramente o material em 3 águas destiladas diferentes.
- Hidrólise: foi feita em HCl 1 N em banho-maria a 60°C. Conídios foram tratados por 3 a 10 minutos e os protoplastos 1 minuto.
- Lavagem: foram feitas três passagens em água destilada, por 10 minutos cada uma.
- Coloração: adicionou-se o corante HCl-Giemsa (item 3.3.15) sobre a lamínula. Deixou-se por 30 minutos tanto no caso de conídios como de protoplastos.
- Lavagem: foram feitas três passagens por tampão fosfato (item 3.3.11).
- Montagem: colocou-se a lamínula sobre a lâmina e observou-se em microscópio óptico.

3.5.5.2 Frequência do Número de Núcleos.

A partir das lâminas coradas (item 3.5.5.1) e por observação ao microscópio óptico foi contado o número de núcleos de protoplastos de cada tempo de tratamento enzimático ensaiado. Com esses dados determinou-se a frequência do número de núcleos em protoplastos de Humicola sp.

3.5.5.3 Diâmetro dos Protoplastos.

A partir de suspensões de protoplastos à fres-

co, no estabilizador osmótico (item 3.3.23), e com o auxílio de um micrômetro ocular e microscópio foi determinado o diâmetro de protoplastos obtidos com 30 minutos e 3 horas de tratamento enzimático

3.6 Marcas Genéticas.

3.6.1 Obtenção de Mutantes.

Uma suspensão de protoplastos contendo cerca de 10^7 células/ml, obtidos nas condições descritas no item 3.5.1. foi preparada em MgSO_4 0,5 M em tampão fosfato 0,02 M pH 5,6. A suspensão colocada em placa de Petri vazia foi irradiada com luz UV, sob leve agitação, nas condições de tempo e distância determinadas no item 3.5.3, a fim de se obter cerca de 5% de sobrevivência. Após a irradiação, a suspensão de protoplastos foi convenientemente diluída e 1 ml semeado por "pour plate" em placa com MC MgSO_4 0,25 M pH 5,6. A regeneração realizou-se nas condições descritas no item 3.5.2. Este método foi utilizado para a obtenção de mutantes morfológicos desreprimidos, resistentes e auxotróficos.

3.6.1.1 Mutantes Morfológicos.

Após a irradiação e regeneração e a partir das placas com MC MgSO_4 0,25 M (item 3.6.1) isolaram-se as colônias que apresentaram alterações morfológicas. As mesmas foram transferidas para placas com MC e incubadas a 42°C durante 7 dias. A caracterização destes mutantes foi feita comparando-se, mediante observação direta, especialmente o aspecto

morfológico, cor, etc. das colônias alteradas em relação à linhagem selvagem utilizada como controle.

3.6.1.2 Mutantes Desreprimidos..

Depois da irradiação e regeneração, as colônias crescidas no MC MgSO_4 0,25 M foram ensaiadas em meio para mutantes desreprimidos (item 3.2.12). Foram inoculados 5 possíveis mutantes por placa e incubados a 42°C durante 5 dias. A seguir aplicou-se um choque térmico de 50°C durante 16 horas e procurou-se colônias que apresentaram degradação da celulose. As colônias isoladas nesta primeira fase foram submetidas a um segundo teste, onde foram incubadas a 42°C somente durante 3 dias, selecionando-se as colônias que novamente apresentaram uma zona clara de degradação da celulose.

3.6.1.3 Mutantes Resistentes.

Foram realizados testes para a obtenção de mutantes resistentes ao fungicida Benlate; ao antimetabólito 2-Deoxiglicose e aos corantes Acriflavina e Cristal Violeta.

3.6.1.3.1 Resistência a Benlate.

A determinação do nível de resistência da linhagem selvagem a este fungicida foi realizada em dois experimentos, mediante a utilização de diferentes concentrações de Benlate em MC. Em um primeiro experimento utilizaram-se as concentrações de 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1,0 μg de Benlate/ml de MC. Foram feitas duas placas para cada concentração com 4 inoculações por placa. O diâ

metro das colônias foi medido com dois dias de incubação na temperatura ótima de crescimento do fungo (42°C). Devido aos resultados obtidos, em um segundo experimento foi estudada a resistência para as concentrações: 0,00; 0,10; 0,20; 0,30; 0,32; 0,34; 0,36; 0,38 e 0,40 µg /ml. Foram preparadas duas placas para cada concentração, inoculando, com ajuda de um fio de platina umidecido em uma suspensão de conídios em Twe en 80, um ponto no centro de cada placa. O diâmetro das colônias foi medido com 24, 48 e 72 horas de incubação a 42°C.

O isolamento de mutantes resistentes foi realizado a partir de uma suspensão de conídios da linhagem selvagem, semeando 10^6 conídios por placa, de concentração 0,4 µg/ml. A seguir realizou-se um teste para aumento de resistência no qual de duas colônias resistentes a 0,4 µg de Benlate/ml de MC (colônias A e B) foram preparadas suspensões de conídios semeando 10^6 conídios em cada placa das seguintes concentrações: 0,5; 0,7; 1,0 e 1,2 µg de Benlate/ml de MC.

3.6.1.3.2 Resistência a 2-Deoxiglicose.

A determinação do nível de resistência da linhagem selvagem a este antimetabólito (2DG) foi realizada em 2 etapas. Na primeira etapa para cada meio foram semeadas duas placas de Petri com 10^5 conídios de Humicola sp selvagem por placa e incubadas durante 6 dias a 42°C. Os meios utilizados foram os seguintes: MC-2DG:MC aonde a glicose foi substituída pela 2DG como única fonte de C; o Meio E (item 3.2.11) para produção de celulasas (ME celulose 1%) e o Meio E-2DG: Meio E

adicionado de 2DG (Meio E com celulose (1%) + 2DG (1%)). Na segunda etapa, a partir das colônias crescidas no Meio E-2DG foram inoculadas 2 placas, com 5 pontos cada uma, com os seguintes meios: Meio E-2DG; MC-2DG e MC. O Humicola sp selvagem foi novamente ensaiado em Meio E-2DG. Todas as placas foram incubadas a 42°C durante 5 dias.

3.6.1.3.3 Resistência a Corantes.

O Humicola sp selvagem foi submetido a Acriflavina e Cristal Violeta. Para cada concentração ensaiada foram preparadas duas placas por inóculo, com um ponto cada uma e uma placa por semeadura, com cerca de 10^6 conídios/placa.

3.6.1.4 Mutantes Auxotróficos.

As colônias crescidas em MC $MgSO_4$ 0,25 M, obtidas a partir da irradiação dos protoplastos, foram transferidas para placas de MMH em disposição correspondente ao replicador de 26 pontos (AZEVEDO et alii, 1976) e incubadas a 42°C. Após 24-48 horas foi realizado o isolamento dos possíveis mutantes. A partir de cada um dos locais correspondentes a um inóculo não crescido retirou-se um bloco de agar contendo o inóculo, o mesmo foi transferido para placa com MC e incubado a 42°C durante 7 dias. Conídios dessas colônias foram transferidos para as placas de caracterização. A caracterização foi feita mediante inoculação e por semeadura. Por inoculação foram ensaiados 5 mutantes por placa, colocando-se em cada placa um requisito nutricional diferente. Os meios e re-

requisitos nutricionais utilizados na primeira fase de caracterização foram: MMH + Caseína Hidrolisada; MMH + Ac.Nucleicos; MMH + Vitaminas; MMH + Extrato de Levedura e as placas controle MC e MMH, todos com duas repetições. Por semeadura foram preparadas 6 placas para cada mutante, em cada uma delas semeou-se 1 ml de uma suspensão de conídios com aproximadamente 10^6 conídios/ml. Após 24 horas de incubação a 42°C 2 placas de MMH foram divididas em 4 quadrantes. Cada quadrante recebeu 0,05 ml de um requisito nutricional diferente, sendo dispostos os 4 requisitos em cada uma das duas placas (fig.1). Assim utilizaram-se duas placas de cada um dos seguintes meios MMH + os 4 requisitos nutricionais; MMH e MC. Após 24-48 horas de incubação foram observadas as placas e/ou quadrantes em que houve crescimento. Assim de acordo com a deficiência expressada pelos mutantes, foi feita a segunda fase da caracterização com os requisitos nutricionais ensaiados individualmente.

Uma vez caracterizados os mutantes auxotróficos e conhecida a resistência natural do fungo selvagem ao benlate, acriflavina e ao cristal violeta foi estudada a resistência dos mutantes auxotróficos a estes compostos em MC, aos efeitos da introdução de uma segunda marca genética nesses isolados. Para isso realizou-se um teste em placas de concentrações conhecidas e placas em gradiente, os isolados auxotrófico-resistentes crescidos nestas placas repicaram-se para um segundo teste de resistência a esses compostos. Também foi estudada a resistência desses isolados em MMH visando seu uso em fusão de protoplastos.

Fig. 1. Esquema do método de caracterização de mutantes auxotróficos por semeadura.

3.7 Seleção de variantes para maior produção de enzimas celulolíticas.

A seleção de variantes para maior produção de enzimas celulolíticas consistiu da seleção em placa, da dosagem enzimática das variantes selecionadas e das análises estatísticas aplicadas a esses dois estudos.

3.7.1 Seleção em Placa.

Foi montado um esquema de seleção, em meio para visualização de halo de degradação de celulose (item 3.2.9) de variantes para maior produção de enzimas celulolíticas. No mesmo foram realizados 3 ciclos de seleção e de cada um deles foi selecionada a variante de melhor índice de atividade enzimática em base aos resultados das análises estatísticas da seleção em placa (item 4.7.1). O índice de atividade enzimática foi determinado pela relação entre o diâmetro do halo de degradação de celulose e o diâmetro de crescimento da colônia estimando-se assim a produção de enzima.

No primeiro ciclo estudaram-se 100 colônias do fungo no seu estado selvagem com 4 repetições de cada uma delas (fig.2). A variante selecionada neste ciclo foi protoplasmatizada como descrito no item 3.5.1, com um tratamento enzimático de 30 minutos como estabelecido no item 4.2.4.1. Uma parte dos protoplastos foi irradiada (item 3.5.3) durante 1 minuto como estabelecido no item 4.2.2, e a outra não. Após a sua regeneração (item 3.5.2), colônias provenientes desses dois

grupos de protoplastos foram inoculadas no meio para visualização de halo, iniciando o segundo ciclo de seleção. Assim foram ensaiadas 50 colônias de cada um dos grupos de protoplastos em comparação com 50 colônias da testemunha (esta última sempre foi a variante selecionada no ciclo anterior que não sofria protoplastização nem irradiação). Foram ensaiadas 3 colônias por placa (com duas repetições) uma de cada um desses 3 tratamentos: Protoplastos Irrradiados (I), Protoplastos Não Irrradiados (NI) e Testemunha (T)(fig.2). Desta mesma forma e a partir da variante selecionada no segundo ciclo foi implantado o terceiro ciclo de seleção. Para as variantes selecionadas nos 3 ciclos assim como o selvagem foi estudada sua atividade enzimática pela determinação da sua atividade em papel de filtro (FPA)(item 3.7.2).

3.7.2 Dosagem Enzimática.

3.7.2.1 Determinação de Celulases.

O processo todo da determinação de celulases está esquematizado na fig.3. A primeira etapa é a produção da massa micelial, para isso prepararam-se 3 frascos erlenmeyers com 100 ml de MMH líquido adicionado de 5 ml de uma solução de glicose 20% (item 3.2.5) todo previamente esterilizado. Os mesmos foram inoculados com 1 ml de uma suspensão de Tween 80 com 10^5 conídios/ml, então foram incubados em agitador rotatório (150 rpm) a 42°C durante 72 horas.

A segunda etapa foi a colheita e lavagem da ma

ssa micelial para retirar a glicose. Reuniu-se o conteúdo dos 3 frascos em um só e se deixou decantar o micélio, descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se aproximadamente 250 ml de solução de PBS (item 3.3.19). Agitou-se o frasco e se esperou decantar o micélio para recomençar o processo novamente. Repetiu-se esta operação 4 ou 5 vezes.

Uma vez realizada a lavagem, a massa micelial foi resuspendida em MM (sem glicose) esperando-se decantar o micélio. Frascos de 125 ml com 25 ml de meio líquido para produção de celulasas foram inoculados com 1 ml desse micélio sedimentado. Incubaram-se em agitador rotatório (150 rpm) a 40°C durante 12, 24, 36 e 48 horas. Filtrou-se o meio; com o micélio determinou-se o peso seco, o filtrado foi centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos com o sobrenadante se fez a determinação da celulase total (item 3.7.2.2) e o açúcar redutor (item 3.7.2.3).

3.7.2.2 Determinação da Celulase Total (FPA).

Para a escolha do meio líquido de produção de celulasas a ser utilizado na análise da Atividade de Papel de Filtro (FPA) foi previamente feita uma dosagem de celulase total nas condições experimentais já descritas (item 3.7.2.1). Compararam-se o meio de PETERSON et alii (1963) (item 3.2.10), já utilizado com o Humicola sp por MACEDO (1986), e o meio E desenvolvido neste trabalho (item 3.2.11).

A determinação da celulase total foi realizada

pela análise da Atividade de Papel de Filtro (FPA)(MANDELS et alii, 1976) esquematizado na fig.4. A atividade enzimática é expressa em μ moles de glicose formada/ml de filtrado/minuto por mg de peso seco de micélio/ml de filtrado (IU/mg).

3.7.2.3 Determinação do Açúcar Redutor.

O valor do Branco da Amostra da fig.4 equivale ao teor de açúcar redutor existente na mesma.

3.7.3 Análises Estatísticas.

3.7.3.1 Análises Estatísticas aplicadas na seleção de variantes para maior produção.

O delineamento experimental para a seleção de variantes para maior produção foi em blocos ao acaso para os 3 ciclos de seleção.

Devido a este fungo ser altamente variável por tratar-se de um heterocário, apresentando conídios multinucleados (item 3.5.1) no primeiro ciclo de seleção foram ensaiadas 100 colônias selvagens com 4 repetições(fig.2). Cada uma dessas 100 colônias eram provenientes de um único conídio e de cada uma delas foram tomados dois inóculos, com 2 palitos, de duas regiões diferentes da colônia. Com cada um foram feitas duas repicagens, uma em cada placa, resultando assim 4 repetições. Desta forma pode-se estabelecer um esquema de análise estatística que permitiu estudar a variabilidade devido ao ambiente, assim como a variabilidade genética entre colônias e,

pensando na heterocariose, a variabilidade genética dentro da própria colônia.

No segundo e terceiro ciclos de seleção, baseados nos resultados do primeiro ciclo foram eliminadas as repetições dentro da própria placa e o número de colônias foi reduzido para 50. Porém, com este delineamento experimental foi possível estudar o efeito da protoplastização e da irradiação como causas do incremento na produção de enzimas. Pelo uso da testemunha foi possível verificar a existência ou não de ganho em produção de um ciclo de seleção para o seguinte além de fazer possível considerar o efeito de ambiente no momento de selecionar a melhor variante através de uma correção da média pela testemunha segundo VENCovsky¹.

3.7.3.2. Análises Estatísticas aplicadas a dosagem enzimática.

O delineamento experimental utilizado para a análise estatística da dosagem enzimática foi em blocos ao acaso com os tratamentos organizados em fatorial 4x4 e foram calculadas as regressões polinomiais para cada uma das variantes selecionadas.

As análises estatísticas deste trabalho foram executadas com base em técnicas de análise de variância, regressão polinomial e estatística descritiva contidas em STEEL & TORRIE (1960).

VENCovsky, R. (ESALQ/USP. PIRACICABA, SP.) Comunicação pessoal, 1987.

Fig. 3. Esquema do método para determinação da celulase total, açúcar redutor, peso seco do micélio.

Fig.4. Esquema da análise da Atividade de Papel de Filtro para determinação de celulase total.

3.8 Fusão de Protoplastos.

Foram ensaiados dois métodos, a fusão de protoplastos por tratamento com polietilenoglicol e a fusão de protoplastos através da técnica de eletrofusão.

3.8.1 Fusão de Protoplastos por tratamento com Polietilenoglicol.

A fusão de protoplastos de Humicola sp foi realizada pela técnica de ANNE & PEBERDY (1976) através do tratamento de protoplastos dos mutantes auxotróficos arg 1 e glu 1 e do "doador morto" com polietilenoglicol.

A obtenção do micélio e dos protoplastos foi realizado como descrito no item 3.5.1. Porém, para o crescimento do micélio dos mutantes auxotróficos, ao meio para obtenção do micélio (item 3.2.6) foi adicionado o requisito nutricional (0,25 ml em 50 ml de meio) para o qual o mutante tem deficiência.

Uma vez obtidos os protoplastos colocaram-se alíquotas das suspensões das duas linhagens a serem fundidas em um tubo de centrífuga de modo a misturar números aproximadamente iguais de cada uma delas. Os tubos contendo o restante das suspensões de protoplastos das duas linhagens foram conservados para as placas controle. O tubo com a mistura de ambas linhagens foi centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em 1 ml de polietilenoglicol, previamente aquecido a

30°C. Então esta mistura de protoplastos foi mantida em banho-maria a 30°C durante 10 minutos. Logo adicionou-se 10 ml da solução estabilizadora (MgSO_4 0,5 M em tampão fosfato 0,02 M pH 5,6) e centrifugou-se a 4000 rpm durante 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspense em 10 ml do estabilizador e centrifugado novamente a 4000 rpm por 10 minutos. Esta operação foi repetida mais duas vezes. Finalmente ressuspendeu-se o precipitado em 5 ml da solução estabilizadora.

De cada uma das linhagens, fizeram-se diluições em solução estabilizadora com finalidade de semeadura das placas controle. Semearam-se placas com MC com 1.000 e 10.000 protoplastos (três placas de cada uma), com MC + estabilizador osmótico com 1.000 e 10.000 protoplastos (três placas de cada uma) e no caso específico de mutantes auxotróficos semearam-se placas com MM + estabilizador osmótico (três placas sem diluição).

Da mistura de protoplastos tratada com PEG semearam-se placas com MM + estabilizador osmótico adicionando-se 1 ml e 0,1 ml da suspensão (5 placas de cada uma) e em MC + estabilizador osmótico com 1.000 e 10.000 protoplastos (5 placas de cada uma).

A porcentagem de regeneração foi calculada pela fórmula apresentada no item 3.5.2 enquanto a frequência de fusão foi calculada pela relação entre o número de colônias crescidas no MM + estabilizador osmótico/número de colônias crescidas no MC + estabilizador osmótico.

3.8.2 Fusão de Protoplastos por Eletrofusão.

Existe pouca bibliografia desta técnica aplicada a protoplastos de microrganismos e quando encontrada ela é utilizada em bactérias ou leveduras, não tendo-se conhecimento de qualquer trabalho de eletrofusão com protoplastos de fungos filamentosos. Portanto as soluções, meios e parâmetros utilizados nestes estudos para fundir protoplastos de Humicola sp por eletrofusão foram adaptados de outros tipos de microrganismos.

Devido que a técnica de eletrofusão realiza-se só com suspensões de protoplastos em soluções não eletrolíticas a pH entre 7,0 e 7,3 deviu-se modificar as condições de manutenção dos protoplastos de Humicola sp para condições compatíveis com a eletrofusão. Então, foram realizados diferentes ensaios de sobrevivência e regeneração de protoplastos de Humicola sp após tratamento com soluções de diferentes açúcares e concentrações a pH perto da neutralidade. Assim, após a obtenção dos protoplastos, como descrito no item 3.5.1, antes da eletrofusão, os mesmos foram lavados três vezes nas soluções de eletrofusão testadas e logo ressuspensos nas mesmas aos efeitos de realizar a fusão. Para realizar a eletrofusão foi utilizado um eletromanipulador celular BTX, provido de câmara de fusão de microlâminas. Esta, permite acompanhar o comportamento dos protoplastos dentro do campo elétrico durante o processo de fusão por observação no microscópio óptico, que é importante para determinar-se os parâmetros em que se deve efetuar a fusão. A citada câmara foi carregada com aproximadamente 50 μ l de uma suspensão de protoplastos contendo entre

$0,3$ e 6×10^6 protoplastos /ml. As soluções para eletrofusão ensaiadas foram Sacarose $0,8$ M pH $5,6$ e $7,0$ (item 3.3.24) Sorbitol $0,8$ M e $1,2$ M pH $7,0$ (item 3.3.25 e 3.3.26) e Sorbitol $0,8$ M pH $7,0$ adicionado de PEG 20% e 40% (item 3.3.27). Os parâmetros de fusão, ensaiados no eletromanipulador celular foram: 1. Alinhamento celular: tempo de 50 a $60 \mu\text{seg.}$ com amplitude de 45 a 80 V; 2. Compressão celular: tempo de 10 a $20 \mu\text{seg.}$ com amplitude de 55 a 150 V e 3. Fusão celular: tempo de 60 a $98 \mu\text{seg.}$ com amplitude de 34 a 300 V; aplicando 1 ou 2 pulsos com um campo alternado com frequência de 1 ou 2 MHz.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Técnica semiquantitativa de avaliação da produção de celulasas em Humicola sp.

4.1.1 Visualização do halo e coloração.

Segundo JORGE¹ o fosfato em concentração de 25mM afeta a exportação da endo e exocelulasas, enquanto que o extrato de malte aumenta a produção de endocelulase. Assim para a visualização do halo, foi ensaiada a substituição no meio de CHAVES (1982) do extrato de levedura por extrato de malte, da celulose microcristalina por celulose ácida, preparada segundo o método de TANSEY (1971) e do KH_2PO_4 por KCl, mantendo a concentração original do ion K^+ já que segundo CHAVES (1982) este é importante para o crescimento do Humicola

JORGE, J.A. Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/ USP. Comunicação Pessoal, 1987.

sp pois ele agiria como mecanismo de co-transporte da glicose. De acordo com os resultados (Tabela 1 e 2) no meio com extrato de levedura as colônias apresentaram maior crescimento, mas não produziram halo de degradação da celulose, enquanto que no meio com extrato de malte houve produção de halo. Foi também ensaiado um método simples de coloração que permitiu revelar melhor a presença do halo. Segundo TEATHER & WOOD (1982) a interação do vermelho congo com polissacarídeos (β -D-glucanas) contendo ligações $\beta(1-4)$ ou $\beta(1-3)$ dão um complexo vermelho intenso, cuja formação é evitada pela ação das β -glucanases. Entretanto, este método de coloração de TEATHER & WOOD (1982) torna o meio de cultura extremamente escuro dificultando a visualização do halo. No processo aqui desenvolvido (figura 5) a visualização é bem mais evidente não sendo necessária a utilização do HCl 1 N como descrito por TEATHER & WOOD (1982) uma vez que este tem como única finalidade a estabilização dos halos de hidrólise por inibição da atividade enzimática.

Segundo SHARMA et alii (1986) alguns compostos químicos interferem com o vermelho congo limitando o uso deste corante para a detecção de atividade celulolítica. Por exemplo o detergente triton-X-100, lisozima, hidróxido de bário e cloreto de bário podem induzir a resultados falso positivos; também alguns sais como $ZnCl_2$; $HgCl_2$; $Pb(NO_3)_2$; PbO ; $CdCl_2$; $CuCl$ e $FeCl_3$ e outras substâncias como hidrócloro de cisteína, ácido ascórbico, 2-mercaptoetanol e persulfato de amônia precipitam o corante e inibem a sua ligação ao polissacarídeo.

4.1.2 Tamanho da Colônia.

Para se conseguir um tamanho de colônia adequado estudou-se: 1) a concentração de citrato de sódio a ser adicionada ao meio de cultura para reduzir o crescimento da colônia a um diâmetro tal que permitisse inocular e medir a capacidade celulolítica de cinco colônias por placa. Segundo os dados da tabela 1 a concentração mais efetiva para o redutor de colônia foi a de 10 mM. O citrato de sódio na concentração de 5 mM não reduziu o crescimento das colônias impedindo assim visualizar a presença do halo. 2) temperatura e período de tempo de incubação que permitissem obter colônias de tamanho adequado. Os dados da tabela 1 indicam que as colônias incubadas durante três dias desenvolveram-se muito pouco e portanto a margem de erro na medição das mesmas foi muito grande. Com dez dias de incubação as placas apresentaram ressecamento do ágar, não sendo possível uma medição correta do diâmetro das colônias. Porém, colônias de 5 e 7 dias apresentaram tamanho razoável e ideal nas condições utilizadas para visualização do halo.

4.1.3 Presença de halo de degradação e índice de atividade enzimática.

As colônias com três dias de incubação além de serem muito pequenas não apresentaram halo de degradação de celulose. Com dez dias de incubação houve ressecamento do meio de cultivo, não sendo possível uma medição correta do halo. As colônias incubadas por cinco e sete dias apresentaram

halo de degradação visível, sendo que as cultivadas durante cinco dias a 42°C apresentaram os maiores índices de atividade enzimática (tabela 2). É importante assinalar que MANDELS (1975) e MONTENECOURT & EVELEIGH (1977), trabalhando com o mutante QM 9414 e a linhagem selvagem QM 6a de Trichoderma reesei demonstraram a correlação positiva que existe entre a formação de halo de degradação de celulose em placa e a atividade enzimática dessas linhagens mostrando assim a validade do uso de técnicas semiquantitativas para medir a atividade celulolítica em fungos.

4.1.4 Choque Térmico.

A aplicação de choque térmico, 50°C durante 16 horas, auxilia a revelação do halo de degradação da celulose. Segundo MONTENECOURT & EVELEIGH (1977) o choque térmico favorece uma hidrólise mais rápida da celulose, permitindo a seleção de colônias produtoras de enzimas celulolíticas termoestáveis. Entretanto a temperatura de 50°C conduz à paralização do crescimento de Trichoderma reesei. A emergência do halo claro de hidrólise deve-se ao efeito combinado do aumento da atividade celulolítica e de uma consequente inibição do crescimento do fungo. Segundo os autores, isto poderia ser devido à liberação de celulasas das hifas localizadas nos bordos das colônias por autólise resultante do tratamento térmico. Isto não parece ocorrer em T. reesei cujos isolados permanecem viáveis após o tratamento com altas temperaturas. O mesmo fenômeno ocorre em Humicola sp de modo que o halo se manifesta pro-

vavelmente em função de uma maior atividade da enzima já difundida no meio quando em temperatura mais adequada. Entretanto, serão necessários mais estudos para esclarecer a ação do choque térmico favorecendo o aparecimento do halo.

Tabela 1. Diâmetros das colônias (medido em cm) de Humicola sp após inoculação em 4 meios de cultura por diferentes tempos e temperaturas (média de 5 repetições).

Temperatura		28°C				42°C			
Dias	Meio	1	2	3	4	1	2	3	4
3		0,75	0,66	0,63	0,49	1,2	1,0	0,95	0,86
5		*	1,44	1,77	1,01	*	1,83	*	1,43
7		*	1,42	2,89	1,23	*	2,67	*	2,45

* Não houve praticamente inibição do crescimento das colônias ocorrendo junção das mesmas o que impediu a medida do seu diâmetro.

Meio 1: Extrato de Levedura; Citrato de Sódio 5 mM.

Meio 2: Extrato de Levedura; Citrato de Sódio 10 mM.

Meio 3: Extrato de Malte; Citrato de Sódio 5 mM.

Meio 4: Extrato de Malte; Citrato de Sódio 10 mM.

Tabela 2. Índices de Atividade Enzimática de Humicola sp em 4 meios de cultura em diferentes tempos e temperaturas de incubação (média de 5 repetições).

Temperatura		28°C				42°C			
Dias	Meio	1	2	3	4	1	2	3	4
5		*	-	1,17	1,22	*	-	*	1,28
7		*	-	1,05	1,13	*	-	*	1,05

- Não foi detectado produção de halo de degradação.

* Não houve praticamente inibição do crescimento ocorrendo a junção das colônias o que impediu a medição do Índice de Atividade Enzimática.

Meio 1: Extrato de Levedura; Citrato de Sódio 5mM.

Meio 2: Extrato de Levedura; Citrato de Sódio 10mM.

Meio 3: Extrato de Malte; Citrato de Sódio 5mM.

Meio 4: Extrato de Malte; Citrato de Sódio 10mM.

Fig. 5. Placa de Petri inoculada com Humicola sp, incubada durante cinco dias, após choque térmico e corada pelo método desenvolvido no presente trabalho.

4.2 Protoplastos de Humicola sp.

4.2.1 Regeneração de Protoplastos.

A partir dos dados obtidos na tabela 3 fica evidente que a melhor concentração do estabilizador osmótico para a regeneração dos protoplastos de Humicola sp é MgSO_4 0,25 M pois a frequência de regeneração não é muito menor que em MgSO_4 0,5 M com o consequente menor gasto de MgSO_4 . A temperatura de incubação mais adequada para a regeneração foi 28°C por 24 horas e posterior transferência a 42°C até completar 7 dias de incubação. Assim protoplastos obtidos com 3 horas de tratamento enzimático e regenerados em MC MgSO_4 0,25 M a 28°C durante 24 horas e logo a 42°C, tiveram uma frequência de regeneração de 0,70% , valor similar ao encontrado por MACEDO (1986) que foi de 0,67% com o mesmo tempo de tratamento enzimático mas regenerando em MC MgSO_4 0,5 M a 42°C durante 7 dias.

[Segunda PICATAGGIO et alii (1983) a frequência de regeneração depende, entre outros fatores, do tempo de tratamento enzimático do micélio. Estes autores, a partir de esferoplastos de T. reesei obtidos após 24 horas de tratamento enzimático tiveram uma regeneração de menos de 1% enquanto os obtidos após 6 horas de tratamento regeneraram em quase 100%. Porém, TOYAMA et alii (1983) também com protoplastos de T. reesei obtidos a partir de conídios imaturos após o mesmo tempo de tratamento enzimático (6 horas) obtiveram uma frequência de regeneração de apenas 1%. PEBERDY & GIBSON, (1971) regeneraram com frequência de 50% protoplastos de A. nidulans

obtidos após 2 horas de tratamento enzimático. As condições osmóticas são outro dos fatores importantes, assim AHN & PACK (1985) aumentaram a frequência de regeneração em S. cerevisiae de 17% para 35% pela pré-adaptação, das células a serem protoplastizadas, às mesmas condições hipertônicas utilizadas na regeneração dos protoplastos. Pelos dados aqui apresentados observa-se que a frequência de regeneração de Humicola sp é consideravelmente baixa mas resta a possibilidade, de através de uma pre-adaptação osmótica aumentar a mesma.

Tabela 3. Efeito da temperatura e concentração do estabilizador osmótico na regeneração de protoplastos de Humicola sp..

Temperatura			28°C +	42°C ++
Concentração Estabilizador				
MC	MgSO ₄	0,25 M	0,70%	0,49%
MC	MgSO ₄	0,50 M	1,05%	0,73%

+ Incubado a 28°C durante 24 horas e logo transferido a 42°C até completar 7 dias de incubação.

++ Incubado a 42°C durante 7 dias.

4.2.2 Curva de Sobrevivência de Protoplastos á luz Ultravioleta (UV).

A curva de sobrevivência de protoplastos de Humicola sp á luz UV foi estudada como descrito no item 3.5. 3. De acordo com os dados de sobrevivência, apresentados na tabela 4 e fig.6, foi estabelecido como metodologia de trabalho para o futuro desta pesquisa, aos efeitos da obtenção de mutantes e ou variantes genéticas, irradiar os protoplastos durante 1 minuto, dose de UV que deve estar cerca do 5% de sobrevivência desejado (AZEVEDO & COSTA, 1973).

Tabela 4. Porcentagem de sobrevivência á luz ultravioleta de protoplastos de Humicola sp.

Tempo de Irradiação (segundos)	Dose de UV ₂ em Joules/m ²	% de Sobrevivência
0	0	100
10	50	25
20	100	18,75
40	200	9,75
80	400	2,50

Fig. 6. Curva de sobrevivência á luz ultravioleta de protoplastos de Humicola sp.

4.2.3. Técnica do Doador Morto.

Para a realização de cruzamentos genéticos por fusão de protoplastos, dentro da mesma linhagem, é indispensável o uso de marcas de resistência, auxotrofia, ou outras, que possibilitem o reconhecimento dos produtos de fusão. Porém, todos esses mutantes são obtidos através do uso de algum agente mutagênico, cuja ação nunca é direcionada, podendo então carregar junto com a marca procurada alguma outra alteração genética não desejável. Para evitar esse inconveniente é possível utilizar o chamado "doador morto". Esta técnica é então de grande utilidade no melhoramento genético de espécies de importância industrial uma vez que a técnica do doador morto elimina a necessidade de um trabalhoso programa de mutagênese (PEBERDY, 1985) e evita os riscos das mutações aleatórias. Este "doador morto" pode ser obtido de diversas formas, mas para não introduzir alterações genéticas indesejáveis é interessante obtê-los através do uso de calor. Para produzir o menor dano possível aos protoplastos, procura-se aplicar a temperatura mais baixa e o menor período de tempo possíveis, que eliminem 100% dos protoplastos.

Segundo MATSUSHIMA & BALTZ (1986) os protoplastos inativados pelo calor não são capazes de regenerar mas podem doar o seu material genético à célula receptora durante o processo de fusão.

Algumas fusões com doadores inativados pelo calor já tem sido realizadas com sucesso, entre elas a de FODOR et alii (1978) em Bacillus e OCHI (1982) e BALTZ & MATSUSHIMA

(1983) em Streptomyces. FODOR et alii (1978) já demonstraram em bactérias Bacillus megaterium o bom desenvolvimento desta técnica, obtendo recombinantes quando usado um parental "doador morto", inativado por calor a 50°C durante 120 min., e outro parental viável; porém não obtiveram recombinantes quando cruzados dois parentais inativados pelo calor. Em Streptomyces, OCHI (1982) utilizou 60°C durante 5 minutos, enquanto que BALTZ & MATSUSHIMA (1983) usaram 50°C por 150 minutos. O procedimento de OCHI (1982) resultou em uma obtenção de recombinantes mais pobre que a de BALTZ & MATSUSHIMA (1983). Essa diminuição na formação de recombinantes após o tratamento a 60°C pode ser devido ao rompimento ou desorganização da membrana citoplasmática (BALTZ & MATSUSHIMA, 1983). A temperatura à qual se inativam os protoplastos é crítica. A mesma deve ser o suficientemente alta como para inviabilizar a linhagem, mas deve ter pouco efeito sobre a integridade da membrana citoplasmática e o genoma. Uma temperatura de inativação muito alta pode ser deletéria para os protoplastos e causar o decréscimo na recuperação de recombinantes (BALTZ & MATSUSHIMA, 1983).

Na literatura existe pouca informação a respeito desta técnica. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5 concluiu-se que o tratamento térmico mais adequado era 62°C durante 10 minutos. Entretanto os dados de BALTZ & MATSUSHIMA (1983) sugerem a realização de experimentos utilizando um tratamento térmico mais longo mas a temperatura mais baixa.

Tabela 5. Número de protoplastos regenerados para cada tratamento (média de 3 placas).

Temperatura	45*	50*	56**	58**		60**		62**
Inóculo	10^3	10^3	10^3	10^3	10^7	10^3	10^6	10^6
Tempo (minutos)								
0 (Controle)	145	300	300	10	10^4	145	10^4	10^4
6	-	-	-	-	-	-	9	1
10	122	256	2	0	44	0	9	0
15	-	-	-	-	-	-	1,5	0
20	143	83	1	0	9	0	1	0
30	-	-	-	0	9	-	-	
40	144	210	1	0	1	0	0	
80	88	1	1	0	1	0	0	

(-) Tratamentos não inoculados

(*) Nº de protoplastos regenerados em 2 dias de incubação.

(**) Nº de protoplastos regenerados em 6 dias de incubação.

4.2.4 Liberação de protoplastos a partir do micélio.

4.2.4.1 Tempo de Tratamento Enzimático.

A ocorrência de protoplastos vacuolados (fig. 7 l e 7 n) e a presença de micélio bem fragmentado com abundantes protoplastos (fig. 7 e; 7 f e 7 g) mesmo no início do tratamento enzimático (30 minutos), foi observada em Humicola sp coincidentemente com o assinalado por DE VRIES & WESSELS (1972) pelo uso de MgSO_4 0,6 M como estabilizador osmótico em fungos filamentosos. Ainda para este mesmo tempo de tratamento pode-se observar a presença de esferoplastos (fig. 7 h). Após 1, 2 ou 3 horas de tratamento enzimático, observaram-se suspensões de protoplastos sem resíduo ou fragmentos de micélio, sendo na sua grande maioria células que apresentam vacúolos de grande volume (fig. 7 i até 7 n).

PEBERDY & GIBSON (1971) encontraram em Aspergillus nidulans, protoplastos após 45 a 60 minutos de tratamento enzimático, enquanto PICATAGGIO et alii (1983) em Trichoderma reesei só após 90 minutos. Porém, no presente trabalho após 30 minutos, obteve-se $3,5 \times 10^6$ protoplastos/ml de caldo de digestão. Com tempos de tratamento mais longos, o número de protoplastos obtidos foi aumentado até chegar a um máximo de $1,9 \times 10^7$ /ml, com 3 horas de tratamento (tabela 7 e fig. 10). A regeneração, ao contrário da obtenção de protoplastos, teve o seu máximo (1,258%) com protoplastos de 30 minutos (tabela 7 e fig. 11), diminuindo com períodos de tratamento enzimático mais longos. Estes resultados coincidem com o encontrado por PICATAGGIO et alii (1983) onde a frequência

de regeneração dos esferoplastos no meio completo é inversamente proporcional ao tempo de tratamento enzimático. NECAS (1971) acredita que os resquícios de parede celular possuem uma participação importante na reconstituição da nova parede, e portanto na regeneração desses esferoplastos. As afirmações destes autores confirmam os resultados encontrados no presente trabalho e portanto pensa-se que a presença de esferoplastos (fig.7 h) deve ser o motivo pelo qual a frequência de regeneração é maior em protoplastos obtidos com 30 minutos de tratamento enzimático do que em tratamentos mais longos.

A contagem do número de núcleos nos protoplastos obtidos em diversos tempos (tabela 6) demonstrou que a maior porcentagem de protoplastos uninucleados é encontrada aos 30 minutos (75,5%) e com o aumento do tempo de tratamento enzimático esta porcentagem diminui.

A análise de variância do diâmetro dos protoplastos obtidos após 30 minutos e 3 horas de tratamento enzimático apresentou um coeficiente de variação de 16,64% e demonstrou que o tamanho dos protoplastos obtidos após 3 horas ($3,341 \mu\text{m}$) é maior que o dos protoplastos obtidos após 30 minutos de tratamento enzimático ($3,095 \mu\text{m}$), diferença esta que é significativa a nível de 1%.

Esta diferença em tamanho provavelmente se deve ao fato de que os protoplastos multinucleados são maiores que os uninucleados, tal como acontece com os confídios diplóides e haplóides de A. nidulans e A. niger (PONTECORVO et alii 1953).

4.2.4.2 Emergência dos Protoplastos.

Em Aspergillus nidulans (PEBERDY & GIBSON, 1971) e Trichoderma reesei (PICATAGGIO et alii, 1983) após curtos períodos de tratamento enzimático que variam de 45 a 90 minutos, os esferoplastos são liberados exclusivamente de pontas de hifas, sendo pequenos e desprovidos de vacúolos. No presente trabalho, já com 30 minutos de tratamento enzimático foram observados esferoplastos que emergem através de orifícios formados na parede em diferentes regiões das hifas e não exclusivamente nas pontas das mesmas. (fig. 8 a; 8 b e 8 c).

4.2.4.3 Divisão Celular nos Protoplastos.

Nos protoplastos de Humicola sp encontraram-se núcleos em divisão, tanto no começo do tratamento enzimático (30 minutos, fig. 9 a), como em tempos mais longos (1 hora, fig. 9 b e 3 horas, fig. 9 c) o que está de acordo com os dados de NECAS (1971) que verificou que mesmo interferindo com a sequência normal de eventos do ciclo celular o estado de protoplasto não impede que a massa celular aumente e haja divisões nucleares. Porém, a citocinese fica paralisada e os protoplastos não se dividirão até que não tenham a sua parede celular reconstituída.

Tabela 6. Número de núcleos em protoplastos de Humicola sp, obtidos após diferentes tempos de tratamento enzimático.

Tempo de Tratamento (minutos)	Nº de Núcleos				Total	% Uni-nucleados
	1	2	3	4		
30	302	87	8	3	400	75,5
60	318	125	7	2	452	70,35
120	327	202	21	1	551	59,34
180	260	172	19	3	454	57,26

Tabela 7. Número de protoplastos/ml obtidos em diferentes tempos de tratamento enzimático; porcentagem de regeneração e seu diâmetro.

Tempo de Tratamento Enzimático (minutos)	Número de Protoplastos/ml	% Regeneração	Diâmetro dos Protoplastos (μm)
30	$3,6 \times 10^6$	1,258	3,095
60	$5,6 \times 10^6$	1,115	-
90	$1,0 \times 10^7$	0,958	-
120	$1,4 \times 10^7$	0,858	-
150	$1,6 \times 10^7$	0,922	-
180	$1,9 \times 10^7$	0,905	3,431

(-) Não medido

Fig. 7. Sequência da obtenção de protoplastos de Hemicella sp com diferentes tempos de tratamento enzimático do micélio. (a, b, c, d; micélio, conídios multinucleados e hifas septadas multinucleadas sem tratamento enzimático. e, f, g, h; micélio e protoplastos obtidos com 30 min. de tratamento enzimático. i, j; protoplastos de 60 min. de tratamento enzimático. k, l; protoplastos de 120 min. de tratamento. m, n; protoplastos de 180 min. de tratamento enzimático).

Fig. 8. Liberação de protoplastos com 30 minutos de tratamento enzimático do micélio mostrando sua produção em diversas regiões das hifas.

Fig. 9. Protoplastos em divisão nuclear, podendo-se observar cromossomos.

Fig.10. Efeito do tempo de tratamento enzimático na obtenção de protoplastos.

Fig.11. Efeito do tempo de tratamento enzimático na regeneração de protoplastos.

4.3 Marcas Genéticas.

4.3.1 Mutantes Morfológicos.

O seu isolamento e caracterização foram realizados de acordo com o item 3.6.1.1.

Foram analisadas 790 colônias isolando-se 8 colônias de morfologia alterada em relação à linhagem selvagem, o que corresponde a 1,01% de mutantes. Os mutantes foram de tipo coloração alterada (fig. 12).

GUPTA et alii (1981) por tratamento com nitro-soguanidina de um fungo do gênero Phome, obtiveram um mutante morfológico denominado km7 que incrementou a produção de β -glicosidase em 8 vezes e de carboximetilcelulase em 3 vezes. Mesmo existindo na literatura outros exemplos de mutantes morfológicos ligados a aumento de produção (ALIKHANIAN, 1962) este tipo de mutante tem a sua importância própria como marca genética para o melhoramento de microrganismos através de técnicas de recombinação genética.

4.3.2 Mutantes Desreprimidos.

Eles foram isolados segundo a técnica descrita no item 3.6.1.2. Foram analisadas 790 colônias obtendo-se 4 mutantes desreprimidos, o que corresponde a 0,5% de mutantes.

Os mutantes desreprimidos apresentam atividade celulolítica mesmo na presença do repressor catabólico (glicose ou glicerol). Estes mutantes são selecionados para obter linhagens hiperprodutoras de enzimas (DEMAIN, 1972), pois a perda do mecanismo de controle pode resultar em uma hiperprodução de enzimas.

dução destas enzimas.

As enzimas celulolíticas são catabolicamente reprimidas, mas a obtenção de mutantes capazes de sintetizar celulasas em condições de alta repressão catabólica (mutantes desreprimidos) é um meio bastante seguro para aumentar o rendimento da produção de celulasas. MONTENECOURT & EVELEIGH (1977a e 1977b) isolaram o mutante RUT NG-14 produtor de celulasas em placa de ágar com 5% de glicerol, mas em meio líquido o mesmo mostrou somente desrepressão parcial do complexo celulasase. Apesar de que os 4 mutantes aqui isolados apresentaram uma zona de degradação de celulose bem nítida mesmo em presença de glicose 3% e em um período de incubação menor (3 dias) ao comumente utilizado para medir a atividade celulolítica em placa do selvagem (5 dias), sua atividade hipercelulolítica deve ser confirmada em meio líquido.

NISIZAWA & SUZUKI (1972) e MONTENECOURT & EVELEIGH (1977a) encontraram que o glicerol é um repressor efetivo e foi preferido para ser utilizado no lugar da glicose pois esta poderia interferir nas análises enzimáticas do fungo e necessitar de uma filtração em gel do caldo de cultivo para eliminar a interferência da glicose.

4.3.3 Mutantes Resistentes.

4.3.3.1 Resistência a Benlate.

O estudo da resistência do selvagem ao Benlate foi efetuado de acordo com o item 3.6.1.3.1. Segundo os resultados

tados obtidos (tabelas 8 e 9, fig.13) verifica-se que a linhagem selvagem é resistente a 0,36 μg de Benlate/ml de MC. SANTOS & AZEVEDO (1982) encontraram que o Metarhizium resiste até 4,0 μg de Benlate/ml de MC. Isto demonstra que Humicola sp é fortemente inibido por esse fungicida. De acordo com esses resultados decidiu-se utilizar uma concentração de 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para se obter mutantes resistentes a este fungicida. Da suspensão de conídios, da linhagem selvagem, semeada (10^6 conídios por placa) isolaram-se 6 colônias resistentes a 0,4 μg de Benlate/ml de MC, sendo a frequência de mutação espontânea aproximadamente de 1,20 mutantes em 10^6 conídios. Esta frequência é intermedia á encontrada por AZEVEDO et alii (1977) com cloroneb em A. nidulans, um mutante em 10^8 conídios, e a encontrada por SANTOS & AZEVEDO (1982) com Benlate em Metarhizium que foi de 2,35 mutantes em 10^6 conídios.

O teste para aumento de resistência, a partir de 2 colônias (A e B) resistentes a 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, realizou-se como descrito no item 3.6.1.3.1. Os resultados (tabela 10) mostram que em 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ germinaram tantos conídios que cresceram em toda a placa, indicando que essas duas colônias também são resistentes a esta concentração de fungicida, já em 1,0 e 1,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ não houve crescimento. Porém na concentração de 0,7 μg de Benlate/ml de MC cresceram 9 e 6 colônias, estas poderiam ser mutantes naturais das resistentes a 0,4-0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para um segundo gene de resistência. Se fosse um caracter monogênico os mutantes também apresentariam resistência para concentrações maiores, por isso este ganho de resistência aos poucos faz pen

sar que a resistência ao Benlate se trate de um caracter poligênico e que na resistência a 0,7 µg/ml há um segundo gene envolvido. Estes resultados são similares aos encontrados por SANTOS & AZEVEDO (1982) que isolaram 5 mutantes, 3 deles apresentaram crescimento em até 1024 µg de Benlate/ml de MC e os outros dois só até 128 µg/ml. Os autores concluíram que ou diferentes sítios de um mesmo gene podem ser modificados, dando diferentes níveis de resistência, ou então, dois genes poderiam estar envolvidos determinando resistência alta ou baixa.

Com a finalidade de se obter uma marca genética para a sua utilização nos cruzamentos é preferível o emprego do mutante resistente a 0,5 µg/ml em lugar do resistente a 0,7 µg/ml pois este último precisaria sofrer uma permuta dupla para transferir a sua resistência. Porém há necessidade de confirmação posterior o que acarreta um maior conhecimento da genética de Humicola; a obtenção de marcas em todos os cromossomos, como se verifica em Aspergillus nidulans, permitirá cruzamentos entre os mutantes resistentes a 0,5 e 0,7 µg/ml e assim definir-se com certeza se se trata de um ou dois genes que estão envolvidos nessa resistência.

4.3.3.2 Resistência a 2-Deoxiglicose.

O estudo da resistência da linhagem selvagem a 2-Deoxiglicose foi realizado de acordo com o item 3.6.1.3.2.

A 2-Deoxiglicose (2DG) é um antimetabólito antagônico da glicose e tóxico para o T.reesei selvagem, sendo que o crescimento na sua presença resulta na morte do mesmo. A

resistência a este antimetabólito pode surgir por varios mecanismos, incluindo aquele de resistência à repressão catabólica. Esta metodologia permitiu a obtenção de alguns mutantes por exemplo o RUT-C30 hiperprodutor e resistente a repressão catabólica (MONTENECOURT & EVELEIGH, 1978; MONTENECOURT et alii, 1979); a partir do QM 9414 dois mutantes desreprimidos e hiperprodutores em relação á β -glicosidase (COSTA & VAN U- DEN, 1980); o mutante D1-6 hiperprodutor e desreprimido mesmo a temperaturas altas (GHOSH et alii, 1982); mutante desreprimido e superprodutor de β -glicosidase de Fusarium graminearum (LOUREIRO DIAS, 1982).

● organismo resistente a repressão catabólica, quando cultivado em meio com 2DG/celulose, hidrolisa a celulose para produzir glicose evitando o uso do antimetabólito. Ao contrário, linhagens selvagens somente podem utilizar a 2DG tóxica e não sobrevivem (MONTENECOURT et alii, 1979), porém isto parece não acontecer com o Humicola sp já que o selvagem cresceu normalmente em meio com 2DG/celulose e inclusive demonstrou ter degradado a celulose mesmo na presença da 2DG (Tabelas 11 e 12). Dos dados destas tabelas fica bem claro que o fungo não cresce quando foi usada 2DG como única fonte de carbono (MC-2DG), porém quando o meio contém celulose (1%) + 2DG(1%) (ME-2DG) o fungo cresce a expensas da celulose, evitando o uso da 2DG, fato comprovado pela degradação da celulose do meio. Ao que parece o Humicola sp é um mutante naturalmente desreprimido para a 2DG, porém isto contraria o fato do mesmo ser reprimido pela glicose.

4.3.3.3 Resistência a Corantes.

Segundo PELCZAR et alii (1980) o mecanismo de ação dos corantes derivados do trifenilmetano, entre os que se encontra o Cristal Violeta, é incerto, mas se supõe que o seu efeito inibitório é devido à interferência com os processos de oxidação celular. Segundo CARPENTER (1969) mutantes de E. coli resistentes à luz UV também são resistentes a substâncias químicas oxidantes, entre elas o cristal violeta; por esta razão se pensa que a resistência à radiação está associada com a resistência à oxidação.

Os estudos para determinar a curva de resistência do fungo selvagem à Acriflavina e Cristal Violeta foram realizados como descrito no item 3.6.1.3.3. Os resultados obtidos são apresentados nas tabelas 13 e 14.

Os mutantes resistentes a 15 e 50 μg de Cristal Violeta/ml de MC foram ensaiados juntamente com a linhagem selvagem para verificar a sua resistência em concentrações de 5; 10; 15; 50 e 70 μg /ml não havendo crescimento em qualquer das concentrações ensaiadas. O mesmo foi realizado com os mutantes resistentes a 40 e 50 μg de Acriflavina/ml em MC; estes juntamente com a linhagem selvagem foram ensaiados em concentrações de 30; 40; 50 e 70 μg /ml não havendo crescimento em qualquer delas. Estes resultados demonstraram que a resistência da linhagem selvagem ao Cristal Violeta era de 5,0 μg /ml e para Acriflavina de pelo menos 30 μg /ml. Estes valores de resistência são razoáveis pois segundo PELCZAR et alii (1980) o Cris-

tal Violeta em concentração de 100 µg/ml é letal para os gêneros Monilia e Torula , enquanto que a concentração de 1 µg/ml é inibitória. Porém, segundo o mesmo autor os corantes derivados da Acridina; entre eles a Acriflavina, possuem pouca ação antifúngica ficando comprovado por uma resistência do Humicola bem maior para este corante. Não foram obtidos mutantes resistentes para estes corantes, porém estes dados foram aproveitados para a introdução de uma marca de resistência nos mutantes auxotróficos.

4.3.4 Mutantes Auxotróficos.

O isolamento e caracterização de mutantes auxotróficos foi realizado segundo as técnicas descritas no item 3.6.1.4.

No presente trabalho analisaram-se 790 colônias irradiadas e que foram transferidas para MMH, porém não se encontraram mutantes auxotróficos. Devido à dificuldade em se obter este tipo de marca genética procedeu-se a trabalhar com mutantes auxotróficos obtidos e gentilmente cedidos por MACEDO (1986) mas que foram caracterizados no presente trabalho. Os quatro mutantes auxotróficos apresentaram bom crescimento em MMH+Caseína Hidrolisada e crescimento razoável em MMH+Extrato de Levedura (tabela 15). Por estes resultados verificou-se que os 4 mutantes eram deficientes em aminoácidos. Ensaaiados em todos os aminoácidos individualmente, um deles, o mutante 1, se mostrou deficiente em arginina, sendo denominado de arg 1. Os outros três mutantes se mostraram deficientes na síntese do á-

cido glutâmico ou glutamina, em asparagina e em menor grau em ácido aspártico. Estes mutantes foram denominados de glu 1, glu 2, e glu 3 (mutantes 2, 3 e 4 respectivamente). BERTOLDI & CATEN (1975), também em Humicola, obtiveram mutantes auxotróficos deficientes na síntese de aminoácidos (lisina, arginina e metionina) e vitaminas (piridoxina).

Dos estudos de resistência, dos mutantes auxotróficos em MC (tabela 16 e 17), ao benlate, acriflavina e cristal violeta foi visto que os mutantes 1 e 4 tem resistência aos mesmos compostos e concentrações. Já o mutante 1 se complementa com o 2 e 3. Assim foram escolhidos o 1 e 3, devido a que complementam as suas marcas auxotróficas e de resistência, para serem estudados quanto a sua resistência em MMH (Tabela 18). Os isolados 1_1 e 1_2 , do mutante 1, provêm de placas de Cristal Violeta $5\mu\text{g/ml}$, 1_3 de benlate $0,4\mu\text{g/ml}$ e 1_4 de benlate $0,5\mu\text{g/ml}$; os isolados 3_1 e 3_2 , do mutante 3, provêm de Cristal Violeta $10\mu\text{g/ml}$, 3_3 e 3_4 de Cristal Violeta $5\mu\text{g/ml}$. Dos resultados obtidos (tabela 18) pode-se pensar que para fins de fusão de protoplastos poderiam ser utilizados os isolados 3_1 ou 3_2 e 1_3 ou 1_4 que além de complementar suas marcas de auxotrofia complementam a sua resistência. Os dois primeiros isolados resistem $4,0\mu\text{g}$ de Cristal Violeta/ml de MMH e $0,3\mu\text{g}$ de Benlate/ml de MMH enquanto os dois últimos resistem $2,0\mu\text{g}$ de Cristal Violeta/ml de MMH e $0,5\mu\text{g}$ de Benlate/ml de MMH. Desta forma poderiam ser selecionados produtos de fusão em MMH+CV $4,0\mu\text{g/ml}$ + Benlate $0,5\mu\text{g/ml}$. Porém, seria conveniente passar esses isola

dos por mais um ciclo de seleção com finalidade de estabilizar suas marcas de resistência.

As mutações que determinan auxotrofia podem provar ganho, perda ou não-alteração na produção de metabólitos, havendo, na literatura, abundantes exemplos de todos estes casos (SERMONTI, 1969; DEMAINE, 1973; HOPWOOD & MERRICK, 1977). Porém, os mutantes auxotróficos são por si próprios interessantes para o melhoramento de linhagens, tendo em vista o uso cada vez maior de técnicas de recombinação que utilizam estes mutantes como marcas genéticas.

Tabela 8. Sobrevivência do Humicola sp selvagem ao fungicida Benlate.

Concentração do Benlate ($\mu\text{g/ml}$)	Média do diâmetro das colônias (cm)
0,0	4,0
0,1	4,0
0,2	4,0
0,3	3,8
0,4	-
0,5	-
0,6	-
0,7	-
0,8	-
0,9	-
1,0	-

(-) sem crescimento.

Tabela 9. Sobrevivência do Humicola sp selvagem ao fungicida Benlate.

Concentração do Benlate (µg/ml)	Média do diâmetro das Colônias (cm)		
	24 horas	48 horas	72 horas
0,00	2,40	5,15	8,25
0,10	2,30	4,80	7,80
0,20	2,10	4,75	7,35
0,30	1,40	2,75	4,35
0,32	0,80	1,50	2,25
0,34	0,25	0,50	0,90
0,36	0,30	0,50	0,70
0,38	-	-	-
0,40	-	-	-

- sem crescimento

Tabela 10. Aumento de Resistência ao Benlate a partir de duas colônias (A e B) resistentes a 0,4 µg de Benlate/ml de MC.

Tempo em dias	Benlate (µg/ml)		0,5	0,7	1,0	1,2
	Colônia					
2	Colônia A		+	-	-	-
	Colônia B		+	-	-	-
3	Colônia A		+	9 colônias	-	-
	Colônia B		+	6 colônias	-	-
7	Colônia A		+	9 colônias	-	-
	Colônia B		+	6 colônias	-	-

+ Crescimento que ocupou a placa toda.

- Sem crescimento.

Tabela 11. Resistência do Humicola sp selvagem à 2-Deoxiglicose.

Tempo (dias) \ Meio	MC-2DG	ME	ME-2DG
2	-	+	-
6	-	+	+

- Sem crescimento

+ Com crescimento e degradação de celulose

Tabela 12. Resistência à 2-Deoxiglicose do Humicola sp selvagem e de colônias previamente crescidas em meio com 2-Deoxiglicose.

Tempo (dias) \ Meio	MC	MC-2DG	ME-2DG	
	Col.2DG	Col.2DG	Selvagem	Col.2DG
2	+	-	+	+
5	+	-	*	*

- Sem crescimento

+ Com crescimento

* Com crescimento e com degradação de celulose

col.2DG Colônia que provém do meio celulose 1%+2DG
1% do experimento anterior.

Selvagem Humicola sp selvagem

MC Meio Completo (Pontecorvo, 1953)

ME Meio E com Celulose (1%)

MC-2DG Meio Completo no qual foi substituída a glicose
pela 2DG.

ME-2DG Meio E com Celulose (1%) +2DG (1%).

Tabela 13. Curva de Resistência da linhagem selvagem à Acriflavina.

Concentração (µg/ml)	Tempo (dias)	2		8	
		Semeadura	Diâmetro Colônia	Semeadura	Diâmetro Colônia
0,0 (Controle)		+	6,7/6,4	+	9,0/9,0
3,0		+	7,4/7,6	+	9,0/9,0
4,0		+	7,0/6,8	+	9,0/9,0
5,0		+	7,3/7,5	+	9,0/9,0
6,0		+	6,5/6,4	+	9,0/9,0
7,0		+	6,6/5,7	+	9,0/9,0
8,0		+	5,7/4,3	+	9,0/9,0
9,0		+	4,2/3,0	+	9,0/9,0
10,0		+	5,5/4,7	+	9,0/9,0
15,0		+	3,8/0,8	+	8,0/9,0
20,0		+	3,0/3,5	+	6,5/7,0
25,0		+	1,6/0,6	+	9,0/9,0
30,0		+	0,9/ -	+	5,6/7,0
40,0		+/-	- /0,6	4 col.	4,5/ -
50,0		-	- / -	1 col.	- / -

+ Crescimento em toda a placa
 +/- Pouco crescimento
 - Sem crescimento

Tabela 14. Curva de Resistência da linhagem selvagem ao Cristal Violeta.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Tempo (dias)	2		8	
		Semeadura	Diâmetro Colônia	Semeadura	Diâmetro Colônia
0,0 (Controle)		+	6,7/6,4	+	9,0/9,0
1,5		+	2,0/2,0	+	7,9/8,0
2,0		+	1,3/1,7	+	7,0/6,7
3,0		24 col.	0,8/0,7	33 col.	5,4/5,6
4,0		15 col.	0,5/0,4	20 col.	4,5/4,6
5,0		2 col.	0,3/0,3	4 col.	3,7/3,5
10,0		-	- / -	-	- / -
15,0		-	- / -	-	- / 0,8
20,0		-	- / -	-	- / -
25,0		-	- / -	-	- / -
30,0		-	- / -	-	- / -
40,0		-	- / -	-	- / -
50,0		-	- / -	-	0,6/ -

+ Crescimento em toda a placa

- Sem crescimento

Tabela 15. Caracterização preliminar de mutantes auxotróficos.

Mutantes	MC	MMH	MMH + E.Lev.	MMH + C.Hidrol.	MMH + Vitam.	MMH + Ac.Nuc.
1	+++	-	+	++	-	-
2	+++	-	+	++	-	-
3	+++	-	+	++	-	-
4	+++	-	+	++	-	-

+++ Crescimento vigoroso

++ Bom crescimento

+ Crescimento razoável

- Sem crescimento

MMH Meio Mínimo para *Humicola* sp

MMH+E.Lev. MMH+Extrato de Levedura

MMH+C.Hidrol. MMH+Caseína Hidrolisada

MMH+Vitam. MMH+Vitaminas

MMH+Ac.Nuc. MMH+Ácidos Nucleicos

Tabela 16. Resistência dos mutantes auxotróficos ao Benlate, Acriflavina e Cristal Violeta em Meio Completo.

Mutante Auxotróf.	Benlate		Acriflavina		Cristal Violeta	
	0,4	0,5	30	Gradiente 0-40	5	Gradiente 0-10
	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
1	-/-/1	-/-/-	-/-/1	0/0/0	19/10/5	0/0/0
2	-/-/1	-/-/-	-/-/-	0/0/0	17/12/9	9/9/9
3	-/1/1	-/-/-	-/1/-	0/0/6,5	1/1/2	9/9/9
4	7/11/9	-/-/1	-/-/-	0/0/0	1/1/25	0/0/7,0

- Sem crescimento

Nº Número de colônias na placa

Placa em Gradiente : O número indica a distância a partir do zero em que se encontravam as colônias.

Tabela 17. Resistência dos mutantes auxotróficos ao Benlate, Acriflavina e Cristal Violeta em Meio Completo.

Mutante Auxotróf.	Benlate	Benlate	Acriflavina	Cristal Violeta
	0,4 µg/ml	0,5 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml
1	+++	+++	++	-
2	-	-	-	+
3	-	-	+	++
4	+++	+++	+	-

- Sem crescimento

+

Pouco crescimento

++ Bom crescimento

+++ Crescimento abundante

Tabela 18. Resistência ao Benlate e Cristal Violeta dos mutantes auxotróficos 1 e 3 e dos seus isolados 1,1,2,3,1,4,3,1,3,2,3 e 3,4 em MMH.

Mutante Auxotrófico	BENLATE (µg/ml)					CRISTAL VIOLETA (µg/ml)				
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0
3 Original	Toda a estria	Toda a estria	Toda a estria	Ponto Inicial	-	-	-	-	-	-
3 ₁	Toda a estria	Toda a estria	Toda a estria	Primeira metade	-	Ponto Inicial	1 colônia na metade da estria	-	-	-
3 ₂	Toda a estria	Toda a estria	Toda a estria	Ponto Inicial	-	Primeira quarta parte	2 colônias no começo da estria	-	-	-
3 ₃	Toda a estria	Toda a estria	Toda a estria	Toda a estria	1 colônia	Ponto Inicial	-	-	-	-
3 ₄	Toda a estria	Toda a estria	Toda a estria	Toda a estria	-	Primeira quarta parte	-	-	-	-
1 Original	-	-	-	-	-	-	1 colônia no começo da estria	-	-	-
1 ₁	Toda a estria	Toda a estria	2 col. início 1 col. no fim	-	-	2 colônias na metade da estria	-	✓	-	-
1 ₂	Toda a estria	Toda a estria	-	-	-	2 colônias no início	1 colônia na metade	-	-	-
1 ₃	Toda a estria	Toda a estria	Toda a estria	Toda a estria	Toda a estria	2 colônias na metade da estria	-	-	-	-
1 ₄	Toda a estria	Toda a estria	Toda a estria	Toda a estria	Toda a estria	1 colônia no fim da estria	-	-	-	-

Observação: os inóculos foram realizados por meio de estrias ao longo da placa.

Toda a estria: crescimento ao longo de toda a estria.
 Primeira quarta parte: crescimento só no primeiro quarto inicial da estria
 Ponto inicial: crescimento só no ponto inicial do inóculo.

Fig. 12. Mutantes morfológicos obtidos após irradiação de protoplastos de Humicola sp com luz UV.

Fig. 13. Curva de Sobrevivência do Humicola sp selvagem ao fungicida Benlate.

4.4 Seleção de variantes para maior produção de enzimas celulolíticas.

4.4.1 Sistema de Seleção em Placa.

No primeiro ciclo de seleção, os resultados mostraram diferença significativa, Tukey 1 % , entre as 100 colônias ensaiadas (Tabela 19), selecionando-se a variante número 4 por apresentar a melhor média do índice de atividade enzimática. Só cinco das 100 colônias ensaiadas apresentaram diferença significativa para repicagens dentro de colônia motivo pelo que foi eliminada a repetição dentro de cada placa nos ciclos sucessivos.

No segundo ciclo não houve diferença significativa entre as colônias dentro de cada um dos 3 tratamentos (I, NI e T)(Tabela 20). Porém, houve aumento de produção revelado pelo incremento do valor do índice de atividade enzimática, já que I e NI diferiram significativamente de T (variante 4 do ciclo anterior) (Tabela 22, Teste de Tukey). Isto indica que os tratamentos I e NI como um todo melhoraram, mas que dentro de cada tratamento qualquer colônia é igual. Neste ciclo foi selecionada a variante 27 do tratamento I, pois foi a que apresentou melhor média do índice de atividade enzimática.

No terceiro ciclo não houve diferença significativa entre os 3 tratamentos I, NI e T (Tabela 22, Teste de Tukey) nem entre as colônias dentro de cada um dos tratamentos (Tabela 21). A variante 1 do tratamento I foi selecionada.

nada em função da sua melhor média para o índice de atividade enzimática.

4.4.2 Dosagem Enzimática.

Dos resultados obtidos na dosagem da atividade total de celulase extracelular (FPA) para a escolha do meio de produção de celulases (Tabela 23; fig.14) foi comprovado que o meio E (item 3.2.11) desenvolvido no presente trabalho (item 3.4.1) foi o mais apropriado para a produção e ou liberação de enzimas por parte dos fungos ensaiados (Humicola sp selvagem, Humicola sp variante 4 e Trichoderma reesei QM9414) já que todos eles apresentaram maior atividade enzimática neste meio que no meio de PETERSON et alii (1963). Baseados nesses resultados esse meio foi então utilizado para realizar a dosagem da atividade enzimática com o Humicola sp selvagem e as variantes escolhidas no processo de seleção.

Os resultados da dosagem da atividade total de celulase extracelular das variantes selecionadas (Tabela 24 e fig.15) assim como as análises estatísticas dos mesmos (Tabela 25) mostraram que com 12 horas de incubação não há diferenças significativas entre as 4 variantes (selvagem, 4, 27 e 1). Com 24 horas, as variantes 1, 4 e selvagem apresentaram diferenças significativas da 27 (Tukey 1%). Com 36 horas a variante 1 mostrou-se diferente da linhagem selvagem e 4 (Tukey 1%), mas não da 27. Com 48 horas as variantes 1 e 27 diferenciaram-se da 4 e do selvagem, mas 1 e 27 não foram diferentes entre si. A partir dos dados da dosagem da atividade enzimática, foram calcu-

ladas as regressões polinomiais (fig.16) que estabelecem as funções que relacionam a atividade enzimática de cada uma das variantes estudadas em função do tempo.

4.4.3 Incremento da Produção de Enzimas Celulolíticas.

Os resultados da dosagem da atividade enzimática confirmaram os resultados da seleção em placa e todos eles indicaram que houve aumento significativo da produção de enzimas celulolíticas do primeiro para o segundo ciclo, mas não do segundo para o terceiro. Segundo MONTENECOURT et alii (1980) a superprodução de celulasas pode ser resultado da capacidade de supersíntese ou de uma maior capacidade de exportação das proteínas; assim dois fatores poderiam ser os responsáveis desse aumento da produção. Um deles poderia ser simplesmente a protoplastização do fungo. Os protoplastos durante a sua regeneração sintetizam e liberam sobre a sua superfície todos os constituintes químicos da parede celular, embora eles podem ser produzidos em quantidades diferentes daquelas encontradas nas células normais (BENITEZ et alii, 1975; FARKAS & SVOBODA, 1980). Segundo VILLANUEVA & GARCIA ACHA (1972) com frequência a parede formada na superfície do protoplasto durante a sua regeneração não é estruturalmente idêntica à parede da célula normal indicando a formação de algum tipo de parede aberrante. Todas estas alterações a nível da parede, ocasionadas pela protoplastização poderiam alterar a permeabilidade provocando um aumento na exportação da enzima. A mutação induzida pela irradiação com UV pode ser o outro fator responsável desse aumento da pro

dução, podendo aumentar, a capacidade de síntese enzimática ou a capacidade de exportação dessas enzimas devido a alterações na parede e ou na membrana celular. A síntese da nova parede está sob estrito controle genético podendo ocorrer mutações que se manifestariam no produto final da parede em regeneração (PEBERDY & FERENCZY, 1985). Também os mutantes com permeabilidade de parede e ou membrana alterada permitem um incremento na exportação de produtos exibindo um incremento na produção (SAUNDERS & SAUNDERS, 1987). Assim mutantes de Penicillium chrysogenum, resistentes a antibióticos poliênicos (que atuam a nível de membrana), tem sido utilizados para incrementar o título de penicilina (LUENGO et alii, 1979); também em Streptomyces fradiae mutantes resistentes a infecção fágica, devido a alterações na membrana celular, apresentam título de antibiótico elevado (PERLMAN & HALL, 1976). Mas outros tipos de mutantes tem influido no aumento de produção; assim GOULDEN & CHATTAWAY (1969) demonstraram que um mutante, de alta produção de P. chrysogenum era menos sensível a inibição pelo produto final, a valina, que uma linhagem de baixa produção. Mutantes morfológicos de T. reesei que apresentavam hifas mais delgadas que a linhagem parental e com alto grau de ramificação apresentaram evidente aumento no índice de atividade celulolítica (FARKAS et alii, 1981), também BROWN et alii (1987b) concluíram que o aumento na produção de β -glicosidase ocorrido num mutante de Penicillium pinophilum deviu-se ao fato de apresentar um micélio mais ramificado mas com hifas mais largas o que aumentava a área de secreção de enzima. DHAR & KHAN (1971) e MORRISON & RIGHELATO (1974) encontraram que mutações que afetam a forma de crescimento das hifas de P. chrysogenum

em cultura submersa, foram importantes na fermentação da penicilina pois melhoraram a aeração e a eficiência na utilização de precursores. Talvez o aumento constatado no Humicola sp poderia dever-se a alguma destas mutações ocasionando já seja um aumento na exportação ou um verdadeiro aumento na produção enzimática.

De acordo com os dados das distribuições de frequência dos valores do índice de atividade enzimática dos três ciclos de seleção apresentados (Tabela 26) verifica-se que há um aumento no valor do desvio padrão do primeiro ciclo para o segundo da ordem das dez vezes, quase o dobro do incremento ocorrido no terceiro ciclo e percebe-se também que o aumento em I é sempre maior que em NI. O valor de curtose diminuiu em quase dez vezes no segundo ciclo e um pouco menos no terceiro, também há uma diminuição no valor de assimetria, isto se traduz nos segundo e terceiro ciclos em curvas assimétricas igual ao primeiro ciclo, mas com pendentes mais moderadas (fig.17 e 18). Todo isto indica que há uma maior heterogeneidade dos dados dos ciclos 2 e 3 em comparação com o primeiro ciclo, porém, no segundo ciclo o aumento de variabilidade é maior que no terceiro ciclo. Isto poderia dever-se ao fato de que ao selecionar a melhor variante de cada ciclo se esta homogeneizando, reduzindo a variabilidade genética do próximo ciclo; além disso, a variante 27 selecionada no segundo ciclo poderia ser mais resistente à radiação portanto a dose de UV ministrada no terceiro ciclo não teria provocado uma alteração genética tal que provocara um aumento da variabilidade da mes

ma magnitude que o produzido no ciclo anterior. Os resultados mostram também que o aumento da variabilidade é maior em I que em NI indicando que a radiação é um processo efetivo para incrementar a variabilidade, o que resulta indispensável para uma posterior seleção (SERMONTI, 1969; SILVA & AZEVEDO, 1978). Também BARACHO & FERRÃO (1983) explicam que o aumento na variabilidade genética encontrada no Aspergillus niger quanto à produção de ácido cítrico foi, sem dúvida, uma consequência da ação da luz UV, que alterou fisiologicamente os isolados de maneira diversa.

Se a irradiação fosse a responsável pelo aumento da produção de enzimas, a variabilidade genética induzida teria atingido um platô no segundo ciclo de seleção pois não produz qualquer aumento no terceiro ciclo de seleção fato verificado pelos resultados da seleção em placa (item 4.4.1) e dosagem da atividade enzimática (item 4.4.2). Segundo SILVA & AZEVEDO (1978) um incremento contínuo na produção de ácido cítrico, pelo A. niger, resultaria numa estabilização da variabilidade ainda quando estimulada por agentes mutagênicos, provavelmente esta seria uma regra geral para qualquer característica estudada. Isto também foi verificado por ALIKHANIAN (1962) em Streptomyces para a produção de estreptomicina. Também poderia ter acontecido que a variante 27, selecionada no segundo ciclo, fosse mais resistente à luz UV portanto a dose de radiação ministrada não teria sido suficiente para produzir uma nova alteração genética que provocara outro aumento de produção no terceiro ciclo. Para isso deve-se aumentar a dose de UV ministrada necessitando-se estudar uma nova curva de sobrevivência dos protoplastos da variante 27.

Segundo ANDRES & PEBERDY (1974b) Aspergillus nidulans tem parte da sua invertase localizada externamente á membrana plasmática. Os autores sugerem que esta invertase poderia encontrar-se no espaço periplásmico ou mesmo na parede celular. Porém, estudos realizados por GIBSON (1973) não revelaram qualquer localização específica para essas proteínas na parede o que indicaria que a enzima não é parte estrutural da mesma, mas que estaria em trânsito ao exterior da célula, hipótese apoiada por ANDRES & PEBERDY (1974a) uma vez que encontraram que a maior parte da invertase é exportada pelo A. nidulans. Este poderia ser o caso do Humicola sp selvagem já que a atividade de celulase da fração intracelular e da ligada á parede celular ("cell bond") foi cerca de 3 vezes maior que a atividade de celulase extracelular (MACEDO, 1986) o que está de acordo com o proposto por CHAVES (1982) que sugere que a enzima ligada á massa celular provavelmente é extracelular e não possui ligação de caráter iônico. Assim se for a protoplastização o fator responsável pelo aumento da produção registrado no segundo ciclo, isto se deveria a algum arranjo diferente da nova parede celular. Isto aconteceria só uma vez, por isso já no terceiro ciclo de seleção não houve aumento significativo de produção. Para esclarecer este fenômeno devem ser feitos estudos bioquímicos mais detalhados que permitirão saber se houve um verdadeiro aumento de produção de enzimas celulolíticas intra e extracelulares ou um aumento na capacidade de exportação e/ou permeabilidade e portanto maior exportação de enzima extracelular.

No presente trabalho, através dos 3 ciclos de seleção obteve-se um aumento considerável da atividade enzimática (FPA) (Tabela 27) incremento similar ao obtido por GRIGOROV et alii (1983) que também em Humicola lutea ensaiaram ciclos de seleção, com radiação gamma, para produção de proteases ácidas, obtendo, do primeiro ao terceiro ciclo incrementos que foram de 160% até 200% para obter variantes que diminuíram a sua produção no quarto ciclo de seleção. Também NEVALAINEN et alii (1980) e FARKAS et alii (1981) obtiveram mutantes, por irradiação com luz UV, de T. reesei que aumentaram de 2 a 3 vezes a produção de endo e exoglucanases e em até 6 vezes a de β -glicosidase.

Tabela 19. Análise de Variância em Blocos ao acaso para a variável Índice de Atividade Enzimática do primeiro ciclo de seleção.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
		$10^{-3} \times$	$10^{-3} \times$	
Blocos	1	0,0031	0,0031	0,01
Colônias	99	69,8380	0,7054	3,07 **
Resíduo (A)	99	22,7012	0,2293	
Replicagens (Colônia)	100	4,2822	0,0428	1,64
Resíduo (B)	100	2,6012	0,0260	
TOTAL	399			

Média Geral= 1.00

CV (A) = 1,07%

CV (B) = 0,51%

** significativo 1%

Tabela 20. Análise de Variância em Blocos ao acaso para a variável Índice de Atividade Enzimática do Segundo Ciclo de Seleção.

Irradiados

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	1	0,0248	0,0248	1,94
Colônias	49	0,6313	0,0129	1,00
Resíduo	49	0,6258	0,0128	
TOTAL	99			

Média Geral= 1,12

CV=10,1%

Não Irradiados

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	1	0,0014	0,0014	0,16
Colônias	49	0,4039	0,0082	0,94
Resíduo	49	0,4290	0,0087	
TOTAL	99			

Média Geral= 1,10

CV=8,5%

Tabela 21. Análise de Variância em Blocos ao Acaso para a variável Índice de Atividade Enzimática do Terceiro Ciclo de Seleção.

<u>Irradiados</u>				
Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	1	0,0018	0,0018	0,75
Colônias	49	0,1122	0,0023	0,96
Resíduo	49	0,1155	0,0024	
TOTAL	99			

Média Geral= 1,03

CV=4,8%

<u>Não Irradiados</u>				
Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	1	0,0002	0,0002	0,06
Colônias	49	0,1697	0,0035	1,13
Resíduo	49	0,1536	0,0031	
TOTAL	99			

Média Geral=1,02

CV=5,4%

Tabela 22. Análise de Variância em Blocos ao acaso para a variável Índice de Atividade Enzimática entre os Segundo e Terceiro Ciclos de Seleção.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Blocos (Ciclo)	2	0,0863	0,0431	6,73 **
Ciclo	1	0,7030	0,7030	109,34 **
Tratamento	2	0,1209	0,0604	9,44 **
Ciclo x Tratamento	2	0,0894	0,0447	6,98 **
Resíduo	592	3,8068	0,0064	

TOTAL 599

CV= 7,5%

** Significativo 1%

Teste de Tukey para médias de tratamentos dentro do Segundo Ciclo.

Tratamento	Média	5%	1%
Irradiado	1,12	a	A
Não Irradiado	1,10	b	A
Testemunha	1,06	c	B

Médias seguidas por letras distintas são diferentes entre si ao nível de significância indicado.

Teste de Tukey para médias de tratamentos dentro do Terceiro Ciclo.

Tratamento	Média	5%	1%
Irradiado	1,03	a	A
Testemunha	1,02	a	A
Não Irradiado	1,02	a	A

Médias seguidas por letras distintas são diferentes entre si ao nível de significância indicado.

Tabela 23. Peso seco do micélio (mg) e atividade total de celulase extracelular (FPA) ($\times 10^{-5}$ IU/mg) em meio E e meio de PETERSON et alii (1963).

12 horas de crescimento

Fungo	Meio E		Meio de Petterson	
	Micélio peso seco (mg)	FPA ($\times 10^{-5}$)	Micélio peso seco (mg)	FPA ($\times 10^{-5}$)
QM 9414	87,0	20,956	119,5	10,1312
H.sp.Selv.	78,5	4,51305	77,5	4,6836
H.sp.4	48,0	8,4622	43,5	6,45692

24 horas de crescimento

Fungo	Meio E		Meio de Petterson	
	Micélio peso seco (mg)	FPA ($\times 10^{-5}$)	Micélio peso seco (mg)	FPA ($\times 10^{-5}$)
QM 9414	145,0	1,81788	230	1,23999
H.sp.Selv.	81,5	3,60542	100	2,85199
H.sp.4	109,0	3,44904	152,5	1,67181

36 horas de crescimento

Fungo	Meio E		Meio de Petterson	
	Micélio peso seco (mg)	FPA ($\times 10^{-5}$)	Micélio peso seco (mg)	FPA ($\times 10^{-5}$)
QM 9414	117,5	2,39045	334	1,64309
H.sp.Selv.	81,5	2,81011	167	1,70778
H.sp.4	88,0	3,09359	90,5	4,34508

48 horas de crescimento

Fungo	Meio E		Meio de Petterson	
	Micélio peso seco (mg)	FPA($\times 10^{-5}$)	Micélio peso seco (mg)	FPA($\times 10^{-5}$)
QM 9414	102,0	2,62661	294,5	1,45263
H.sp.selv.	65,0	5,78378	113,5	2,55084
H.sp.4	87,5	5,08668	83,5	3,72607

Tabela 24. Dosagem das variantes selecionadas.

Peso seco do micélio (mg) e atividade total de celulase extracelular (FPA)($\times 10^{-6}$ IU/mg).

12 horas de crescimento

Fungo	Micélio Peso seco (mg)	FPA ($\times 10^{-6}$)
Selvagem	46,0	7,82975
Variante 4	38,5	10,04500
Variante 27	57,5	1,88200
Variante 1	51,0	2,95175

24 horas de crescimento

Fungo	Micélio Peso seco (mg)	FPA ($\times 10^{-6}$)
Selvagem	32,5	31,855
Variante 4	37,5	33,366
Variante 27	61,5	11,334
Variante 1	28,0	35,874

36 horas de crescimento

Fungo	Micélio Peso seco (mg)	FPA ($\times 10^{-6}$)
Selvagem	33,5	16,598
Variante 4	35,5	7,213
Variante 27	36,0	24,981
Variante 1	33,5	27,201

48 horas de crescimento

Fungo	Micélio Peso seco (mg)	FPA ($\times 10^{-6}$)
Selvagem	57,5	7,030
Variante 4	60,0	18,450
Variante 27	58,5	29,265
Variante 1	34,5	36,330

Tabela 25. Análise de Variância em factorial da atividade total da celulase extracelular (FPA).

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F
Erlenmeyer (Tempo x Variante)	16	2673,0281	167,06421	8,9185 **
Tempo	3	4391,9472	1463,9824	78,1533 **
Variante	3	976,0191	325,3397	17,3679 **
Tempo x Variante	9	3699,5726	411,0636	21,9442 **
Residuo	32	599,4302	18,7322	

TOTAL 63

CV= 22,91%

** significativo 1%

Teste de Tukey para as médias das variantes com 12 horas de crescimento.

Variante	Média	5%	1%
4	10,0450	a	A
Selvagem	7,8298	a	A
1	2,9518	a	A
27	1,8820	a	A

Médias seguidas por letras distintas são diferentes entre si ao nível de significância indicado.

Teste de Tukey para as médias das variantes com 24 horas de crescimento.

Variante	Média	5%	1%
1	35,8747	a	A
4	33,3432	a	A
Selvagem	31,8550	a	A
27	11,3340	b	B

Médias seguidas por letras distintas são diferentes entre si ao nível de significância indicado.

Teste de Tukey para as médias das variantes com 36 horas de crescimento.

Variante	Média	5%	1%
1	27,2010	a	A
27	24,9818	a	AB
Selvagem	16,5985	b	BC
4	7,2130	c	C

Médias seguidas por letras distintas são diferentes entre si ao nível de significância indicado.

Teste de Tukey para as médias das variantes com 48 horas de crescimento.

Variante	Média	5%	1%
1	36,3305	a	A
27	29,2657	a	A
4	18,4505	b	B
Selvagem	7,0302	c	C

Médias seguidas por letras distintas são diferentes entre si ao nível de significância indicado.

Tabela 26. Estimadores estatísticos das distribuições de frequência para os valores do Índice de Atividade Enzimática para os três ciclos de seleção.

Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3	
		I	NI	I	NI
n	400	100	100	100	100
X(Média)	1,0	1,12	1,10	1,03	1,02
Desvio Padrão	0,01	0,15	0,11	0,08	0,07
Variância	$0,01 \times 10^{-2}$	0,02	0,01	0,01	$0,49 \times 10^{-2}$
CV	1,57	13,54	10,30	8,02	6,60
Assimetria	6,72	2,16	2,15	2,77	2,74
Curtose	50,69	5,96	6,56	6,45	7,73
Moda	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Amplitude	0,17	0,83	0,67	0,37	0,35
100% Máximo	1,17	1,83	1,67	1,37	1,35
75% Q_3	1,00	1,16	1,12	1,00	1,00
50% Mediana	1,00	1,08	1,08	1,00	1,00
25% Q_1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0% Mínimo	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Tabela 27. Incremento em porcentagem da Atividade total de celulase extracelular (FPA) das variantes selecionadas em cada ciclo em relação ao selvagem.

Ciclo de Seleção	Variante	Tempo de crescimento em horas			
		12	24	36	48
Primeiro	4	28,29	4,74	-56,54	162,44
Segundo	27	-75,96	-64,42	50,50	316,28
Terceiro	1	-62,30	12,61	63,88	416,78

Fig. 14. Atividade total de Celulase Extracelular na escolha do meio para produção de celulases.

Fig. 15. Atividade total de celulase Extracelular em Humicola sp selvagem e nas variantes selecionadas.

Fig. 16. Regressões polinomiais da atividade total de celulase extracelular de cada uma das 4 variantes estudadas.

Fig. 17. Continuação.

Fig. 18. Distribuições de frequência para os valores do Índice de Atividade Enzimática para os três ciclos de seleção.

Continua ...

Fig. 18. Continuação.

4.5 Fusão de Protoplastos.

4.5.1 Fusão de Protoplastos por tratamento com polietilenoglicol.

A fusão de protoplastos de Humicola sp por tratamento com PEG foi ensaiada como descrito no item 3.8.1 e cujos resultados são apresentados na tabela 28. É preciso salientar que os valores da frequência de fusão de 10×10^{-4} e $0,33 \times 10^{-4}$ são colocados em dúvida pela reversão, da marca de auxotrofia, apresentada pelo mutante glu 1 com frequências maiores que a de fusão, 61×10^{-4} e $0,8 \times 10^{-4}$ respectivamente. Porém, deve-se destacar que as colônias revertentes apresentaram crescimento residual com um tamanho de colônia muito pequeno, sem chegar a esporular, enquanto as colônias dos possíveis produtos de fusão foram de tamanho notoriamente maior chegando a esporular. LAGUNA (1983) selecionou, com sucesso, híbridos interespecíficos, produtos de fusão de leveduras auxotróficas com crescimento residual, através do tamanho de colônia. Para elucidar este assunto seria preciso transferir esses possíveis produtos de fusão a MM sem estabilizador osmótico e MC, realizando assim uma análise genética aplicando a técnica descrita por ROPER (1952).

As frequências de fusão obtidas no presente trabalho, 0,0033% e 0,1%, estão dentro dos valores que normalmente são encontrados na literatura. Existem numerosos trabalhos, de diferentes pesquisadores, como os de KIRIMURA et alii (1986) que obtiveram com mutantes de A. niger frequências de fusão entre 2,0 e 6,3%; ANNE & PEBERDY (1976) em P. chrysogenum,

P. patulum, P. roquefortii, A. nidulans, A. niger, C. acremonium obtiveram frequências que vão de 0,1 a 0,7%; SILVEIRA & AZEVEDO (1987) em Metarhizium anisopliae foram de 0,0009% a 0,044%.

Outras tentativas de fusão não foram bem sucedidas, por exemplo dos mutantes auxotróficos arg⁻1 x Doador Morto; glu⁻1 x Doador Morto e Doador Morto x Doador Morto. Provavelmente, nestes casos, a fusão não chegou a produzir-se devido ao tratamento térmico a que foi submetido o Doador Morto. Como já foi discutido no item 4.2.3 a temperatura á qual se inativam os protoplastos é crítica. O tratamento térmico a que foram submetidos os protoplastos de Humicola sp (62°C durante 10 min.) talvez não foi o mais adequado devido á não fusão quando participaram células do Doador Morto. Provavelmente se produz alguma alteração de membrana nestes protoplastos impedindo a formação de recombinantes como afirmado por BALTZ e MATSUSHIMA (1983). Dado que BALTZ & MATSUSHIMA (1983) obtiveram mais recombinantes, de Streptomyces, que OCHI (1982) pela obtenção do Doador Morto através de um tratamento térmico mais prolongado mas a temperatura mais baixa, é razoável pensar que talvez poderia, para o caso do Humicola sp, resolver-se esse inconveniente com um tratamento térmico desse tipo.

Tabela 28. Fusão de protoplastos de mutantes auxotróficos de Humicola sp por tratamento com polietilenoglicol.

	Linhagens	Fenótipos	Frequência de fusão (10 ⁻⁴)
1	arg ⁻ 1 x glu ⁻ 1	arg ⁻ x glu ⁻	10
2	arg ⁻ 1 x glu ⁻ 1	arg ⁻ x glu ⁻	0,33

4.5.2 Fusão de Protoplastos por Eletrofusão.

Com todas as soluções ensaiadas, apresentadas nas tabelas 29 e 30, foram realizados testes de eletrofusão. De acordo com os resultados de regeneração e das observações, da eletrofusão, realizadas através do acompanhamento microscópico na câmara de microslides, chegou-se á conclusão que a solução para eletrofusão (item 3.3.25) com Sorbitol 0,8 M pH 7,0 era a mais adequada e que os parâmetros mais eficientes para o fusionamento de protoplastos de Humicola sp eram: Alinhamento 60 μ seg., 60V; Compressão 20 μ seg., 60 V; Fusão 60 μ seg., 45 V, aplicando 2 pulsos com um campo alternado com frequência de 1 MHz. Para se assegurar a fusão, WEBER et alii (1981) mantiveram a câmara de fusão em repouso durante 30 min. a 28°C enquanto SCHNETTLER & ZIMMERMANN (1985) a mantém a 20-25°C. Deve-se destacar que no caso do Humicola sp o aparecimento de células fundidas foi observado a partir de 30 minutos após realizada a fusão, mantendo a câmara a temperatura ambiente (25-30°C). As células fundidas (fig.19) foram observadas após 40 minutos de realizada a fusão. É preciso destacar que, mesmo tendo adaptado uma solução adequada para efetuar a eletrofusão de protoplastos de Humicola sp e determinado os parâmetros da mesma, os trabalhos desenvolvidos neste sentido são apenas preliminares e muito mais deve ser estudado para se alcançar o máximo de eficiência desta poderosa técnica de fusão. Por exemplo, HALFMANN et alii (1983) utilizaram pronase para melhorar a fusão, enquanto HALFMANN et alii (1982) utilizaram uma solução de Sorbitol 1,4 M e PEG 40%. Porém, este último re

curso foi ensaiado adicionando na solução de Sorbitol 0,8 M PEG nas concentrações de 40 e 20% não sendo eficiente dado que os protoplastos de Humicola sp não migraram para os eletrodos, como o faziam sem adição do PEG, durante a fase de alinhamento.

Tabela 29. Sobrevivência e Regeneração de Protoplastos de Humicola sp após tratamento com Sacarose 0,8M pH 5,6 e 7,0, após 9 dias de incubação.

Tempo (horas)		Controle MgSO ₄ 0,5M pH5,6	Sacarose 0,8M pH 5,6	Sacarose 0,8M pH7,0
Zero	Contagem Aspecto	3×10^5 Normal	3×10^5 Normal	3×10^5 Normal
5,00	Contagem Sobrevivência Aspecto Regeneração	$1,1 \times 10^5$ 36,66% Normal 0,33%	$3,1 \times 10^5$ 100% Normal 0,13%	$2,9 \times 10^5$ 96,66% Normal 0,16%

Obs.: Os protoplastos foram mantidos nessas soluções durante 5,00 horas e logo semeados para regeneração em MC MgSO₄ 0,25 M.

Tabela 30. Regeneração de Protoplastos de Humicola sp após tratamento com solução para eletrofusão de Sorbitol 0,8 M e 1,2 M pH 7,0, após 9 dias de incubação.

Tempo (horas)	Controle MgSO ₄ 0,5 M	Sorbitol 0,8 M	Sorbitol 1,2 M
1.00	1,0 %	0,52%	0,21%
2.00	0,69%	0,43%	0,14%
3.00	0,64%	0,38%	0,15%
4.00	0,38%	0,25%	0,16%

Solução para eletrofusão (item 3.3.25)

Obs.: Os protoplastos foram mantidos nessas soluções durante os tempos especificados a partir dos quais foi tirada uma amostra e semeada para regeneração em MC MgSO₄ 0,25 M.

Fig. 19. Protoplastos de Humicola sp fundidos por eletrofusão.

5. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos podem ser tiradas as seguintes conclusões:

1. A revelação do halo de degradação da celulose em Humicola sp apresentou-se mais clara em meio de extrato de malte e citrato de sódio 10 mM incubado por 5 dias a 42°C e com aplicação de choque térmico.

2. A visualização de halo de degradação de celulose ao redor das colônias comprova a capacidade do Humicola sp em exportar celulasas.

3. Tratamentos enzimáticos, do micélio, por períodos de tempo longos são adequados para estudos de regeneração, bioquímicos ou mesmo para fusão de produtos genéticos já estáveis, uma vez que são obtidos números consideravelmente maiores de protoplastos. Para a obtenção de mutantes ou estabilização de determinados produtos genéticos é apropriado um tratamento por um período mais curto de tempo, pois obtem-se uma maior proporção de protoplastos uninucleados.

4. O esquema de seleção em placa de variantes de maior produção celulólitica, demonstrou ser eficiente permitindo o isolamento de variantes de maior produção de enzimas celulóliticas.

5. A irradiação com luz UV foi um processo efetivo no incremento da variabilidade genética.

6. A transferência de material genético através da técnica de "doador morto" não foi bem sucedida, provavelmente pela não obtenção deste "doador" na forma mais adequada.

7. A solução mais eficiente para a eletro fusão foi aquela contendo sorbitol 0,8 M sendo que para completar a fusão celular é importante deixar a câmara de fusão em repouso, antes de diluir e semear a suspensão.

6. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ABDEL-KADER, M.I.A.; A.I.I. ABDEL-HAFEZ & S.I.I. ABDEL-HAFEZ.

Composition of the fungal flora of syrian soils:

2. Cellulase-decomposing fungi. Micopathologia
81:167-172, 1983.

AHN, J.S. & M.Y. PACK. Improvement of protoplast regeneration

by growing yeast cells hypertonically. Appl.
Environ. Microbiol. 49(6):1550-1552, 1985.

ALEXIEVA, P.; A. DZHEROVA; D. NIKOLAVA & P. SHEREMETSKA. Pro

duction of a highly active mutant: producer of
acid protease by treatment with gamma-rays. Ac
ta Microbiol. Bulg 6:59-63. Apud Biol.Abstr.
72(11), 1980.

ALIKHANIAN, S.I.. Induced mutagenese in the selection of mi

croorganisms. Adv.Appl.Microb. (4):1-50, 1962.

- ANDRES, I. & J.F. PEBERDY. The production of invertase in Aspergillus nidulans with reference to the effects of glucose and sucrose. Microbios 10:15-23, 1974a.
- ANDRES, I. & J.F. PEBERDY. Release of invertase from Aspergillus nidulans by the action of lytic enzymes and invertase secretion by regenerating protoplasts. Microbios 11:15-20, 1974b.
- ANNE, J.; H. EYSEN & P. DE SOMER. Somatic hybridization of Penicillium roquefortii and P. chrysogenum after protoplast fusion. Nature, London 262: 719-721, 1976.
- ANNE, J. & J.F. PEBERDY. Conditions for induced fusion of fungal protoplasts in polyethylene glycol solutions. Archives of Microbiology 105:201-205, 1975.
- ANNE, J. & J.F. PEBERDY. Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with polyethylene glycol. J. Gen. Microbiol. 92:413-417, 1976.
- ANTUNES, L.A.F.; M.P. CEREDA & R. CAMARGO. Decomposição simulada da palha de arroz e obtenção de microrganismos celulolíticos. Arq. Biol. Tecnol. 29(3): 533-543, 1986.

ARAUJO, E.F.; E.G. BARROS: R.A. CALDAS & D.O. SILVA. β -Glucosidase activity of the thermophilic and cellulolytic fungus Humicola sp. Biotechnol. Lett. 5:781-784, 1983.

ARAUJO, A. & J.D SOUZA. Characterization of cellulolytic enzyme components from Aspergillus terreus and its mutant. J. Ferment. Technol. 64(5):463-467, 1986.

AZEVEDO, J.L.. Melhoramento genético de fungos através da fusão de protoplastos. In: 3o. ENCONTRO DE GENETICISTAS PAULISTAS, 3., 1983. Anais. p.17-22.

Anais.

1983. p.17-22.

AZEVEDO, J.L. & S.O.P. COSTA. Exercícios práticos de genética. São Paulo, Companhia Editorial Nacional, 288p. 1973.

AZEVEDO, J.L.; E.P. SANTANA & R. BONATELLI Jr.. Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1,4-Oxathiin in Aspergillus nidulans. Mut. Res. 48:163-172, 1977.

BACHMANN, B.J. & D.M. BONNER. Protoplasts from Neurospora crassa. J. Bacteriol. 78:550-556, 1959.

- BALTZ, R.H. & P. MATSUSHIMA. Advances in protoplast fusion in Streptomyces. Exper. Suppl. (Basel) 46:143-148, 1983.
- BARACHO, I. R. & S. FERRÃO. Utilização da luz ultravioleta no melhoramento de Aspergillus niger para produção de ácido cítrico. Rev. Microbiol. 14(2):84-89, 1983.
- BASTIDE, M.; E. HADIBI; D. SCHEIBER; M. HIEGEUILLE; C. VERMEIL & J.M. BASTIDE. Modalités de liberation des protoplastes de Saccharomyces cerevisiae: étude en microscopie électronique a balayage. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 130A:419-433, 1979.
- BECAK, W & J. PAULETTE. Técnicas de citologia e histologia. Vol. 2. Rio Janeiro, Livros técnicos e científicos, 1976. 305p.
- BENITEZ, T.; S. RAMOS & I. GARCIA-ACHA. Protoplast from Trichoderma viridae. Arch. Microbiol. 103:199-203.
- BENITEZ, T.; T.G. VILLA & I. GARCIA-ACHA. Chemical and structural differences in mycelial and regeneration walls of Trichoderma viridae. Arch. Microbiol. 105:277-285, 1975.

- BERG, H.; K. AUGSTEN; E. BAUER; W. FORSTER; H. JACOB; P. MÜLLIG & H. WEBER. 664-possibilities of cell fusion and transformation by electrostimulation. Bioelectrochemistry and Bioenergetics 12:119-133, 1984.
- BERG, B. & A. HOFSTEN. The ultrastructure of the fungus Trichoderma viridae and investigation of its growth on cellulose. J. Appl. Bacteriol. 41:395-400, 1976.
- BERTOLDI, M. & C.E. CATEN. Isolation and haploidization of heterozygous diploid strains in a species of Humicola. J. Gen. Microbiol. 91:63-73, 1975.
- BROWN, J.A.; S.A. COLLIN & T.M. WOOD. Enhanced enzyme production by the cellulolytic fungus Penicillium pinophilum, mutant strain NTG III/6. Enzyme Microb. Technol. 9:176-180, 1987a.
- BROWN, J.A.; D.J. FALCONER & T.M. WOOD. Isolation and properties of mutants of the fungus Penicillium pinophilum with enhanced cellulase and β -glucosidase production. Enzyme Microb. Technol. 9:169-175, 1987b.

- BUSCHL, R.; H. RINGSDORF & U. ZIMMERMANN. Electric field-induced fusion of large liposomes from natural and polymerizable lipids. FEBS Lett. 150:38-42, 1982.
- CANEVASCINI, G.; M.R. COUDRAY; J.P. REY; R.J.G. SOUTHGATE & H. MEIER. Induction and catabolite repression of cellulase synthesis in the thermophilic fungus Sporotrichum thermophile. J. Gen. Microbiol. 110:291-303, 1979.
- CARPENTER, P.L.. Microbiologia. México, Interamericana S.A., 1969. 421p.
- CHAPMAN, C.M. & J.R. LOEWENBERG. Supplement to plant physiology 57:70, 1976.
- CHAVES, V.M.G.. Características fisiológicas de um fungo termófilo isolado de compostagem e propriedades de seu complexo celulase. Viçosa, 1982. 60p. (Mestrado - Universidade Federal de Viçosa).
- COSSAR, D. & G. CANEVASCINI. Cellulase enzyme production during continuous culture growth of Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24:306-310, 1986.

- COSTA, M.B. & N. Van UDEN. Use of 2-Deoxyglucose in the selective isolation of mutants of Trichoderma reesei with enhanced β -glucosidase production. Biotechnol. Bioeng. 22:2429-2432, 1980.
- COUGHLAN, M.P.. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 3:39-109, 1985.
- COUTTS, A.D. & R.E. SMITH. Factors influencing production of cellulases by Sporotrichum thermophile. Appl. Environ. Microbiol. 31:819-825, 1976.
- DAVIS, B.. Factors influencing protoplast isolation. In: PEBERDY, J.F. & L. FERENCZY. Fungal protoplasts. Marcel Dekker Inc., 1985, p.45-72.
- DEMAIN, A.L.. The marriage of genetics and industrial microbiology after a long engagement, a bright future. In: VANEK, Z.; Z. HOSTALEK & J. CUDLING, Eds. Genetics of Industrial Microorganisms. Amsterdam, Elsevier Publishing Co., 1973. Vol.1, p.19-32.
- DEMAIN, A.L.. Theoretical and applied aspects of enzyme regulation and biosynthesis in microbial cells. Biotechnol. Bioeng. Symposium (3):21-32, 1972.

- DEORAY, S.D. & V.P. BHIDE. In vitro cellulose decomposition by fungi from the rhizosphere of grapevine. J. Univ. Poona. Sci. Technol. 0:133-140, Apud. Biol. Abstr. 75(6), 1981.
- DEUTCH, C.E. & J.M. PARRY. Sphaeroplast formation in yeast during the transition from exponential phase to stationary phase. J. Gen. Microbiol. 80:259-80:259-268, 1974.
- DE VRIES, O.M.H. & J.G.H. WESSELS. Chemical analysis of cell wall regeneration and reversion of protoplasts from Schizophyllum comune. Arch. Microbiol. 102:209-218, 1975.
- DHAR, M.M. & A.W. KHAN. Formation of antibiotics. Nature (London) 233:182, 1971.
- EDDY, A.A. & D.H. WILLIAMSON. A method of isolating protoplasts from yeast. Nature (London) 179:1252-1253, 1957.
- EMERSON, S. & M.R. EMERSON. Production, reproduction and reversion of protoplast like structures in the osmotic strains of Neurospora crassa. Proc. Nat. Acad. Sci., (Washington) 44:668-671, 1958.

- ERIKSSON, K.E. & S.G. HAMP. Regulation of endo-1,4- β -glucanase production in Sporotrichum pulverulentum. Cur. J. Biochem. 90:183-190, 1978.
- EYSEN, H.. Formation of protoplasts of Penicillium chrysogenum and some other filamentous fungi. Agricultura 25:21-44, 1977.
- FARKAS V.; I. LABUDOVA; S. BAUER & L. FERENCZY. Preparation of mutants of Trichoderma viridae with increased production of cellulase. Folia Microbiol. 26:129-132, 1981.
- FARKAS, V. & A. SVOBODA. Kinetics of beta-glucan and chitin formation by cells and protoplasts of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Curr. Microbiol. 4:99-104, 1980.
- FERENCZY, L.. Microbial protoplast fusion. In: GLOWER, S. W. & D.A. HOPWOOD. Ed.. Genetics as a tool in microbiology. Cambridge, Cambridge University Press, 1981. p.1-34.
- FODOR, K.; E. DEMIRI & L. ALFOLDI. Polyethylene glycol-induced fusion of heat-inactivated and living protoplast of Bacillus megaterium. Appl. Environ. Microbiol. 135(1):68-70, 1978.

- FUJII, M. & M. SHIMIZU. Synergism of endoenzyme and exoenzyme on hydrolysis of soluble cellulose derivatives. Biotechnol. Bioeng. 28:878-882, 1986.
- FUNAGUMA, T.; H. TSUJI & A. HARA. Purification and some properties of cellulose 1,4- β -cellobiosidase from a strain of Penicillium sp. J. Ferment. Technol. 64(1):77-80, 1986.
- FURTADO, J.S.. Basidial cytology of exidia nucleata. Mycologia 60:9-15, 1968.
- GABRIEL, M.. Formation and regeneration of protoplasts in the mold Rhizopus nigricans. Folia Microbiol. 13:231-234, 1968.
- GHOSH, V.K.; T.K. GHOSE & K.S. GOPALKRISHNAN. Improvement of T. reesei strain through mutation and selective screening techniques. Biotechnol. Bioeng. 24:241-243, 1982.
- GIBSON, R.K.. Studies on protoplasts of Aspergillus nidulans and their regeneration. Nottingham, 1973.
(Ph.D.- University of Nottingham).
- GONG, C.S. & G.T. TSAO. Cellulase and biosynthesis regulation. In: PERLMAN, D.. Annuals Reports on Fermentation Processes. Academic Press, New York, 1979. 3:111-140.

- GOTTSCHALK, G.; W.H. HAMILTON; W. HARDER; A. de LEEUW; O.M. NEIJSSSEL & C. RATLEDGE. Microbial physiology and biotechnological innovation in the EEC countries, Portugal and Spain. Report No. XII-586-8-EN, DG-XII Concertion Unit for Biotechnology in Europe, Brusels.
- GOULDEN, S.A. & F.W. CHATTAWAY. End product control of acetoxyhydroxy acid synthetase by valine in Penicillium chrysogenum Q176 and a high yielding mutant. J. Gen. Microbiol. 59:111, 1969.
- GRAJEK, W.. Comparative studies on the production of cellulases by thermophilic fungi in submerged and solid-state fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26:126-129, 1987.
- GRIGOROV, I.; P. ALEKSIEVA; A. DJEROVA; P. SHEREMETSKA & B. TCHORBANOV. Selection of Gamma-ray mutants from a strain of Humicola lutea 72, producing acid proteases. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17:355-357, 1983.
- GUPTA, J.K.; C.K. SHIRKOT & S. DHAWAN. Isolation and mutation of cellulolytic fungi. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 28:31-36, 1981.

- HALFMANN, H.J.; C.C. EMEIS & U. ZIMMERMANN. Electro-fusion of haploid Saccharomyces yeast cells of identical mating type. Arch. Microbiol. 134:1-4, 1983.
- HALFMANN, H.J.; W. ROCKEN; C.C. EMEIS & U. ZIMMERMANN. Transfer of mitochondrial function into a cytoplasmic respiratory deficient mutant of Saccharomyces yeast by electro-fusion. Current Genetics. 6:25-28, 1982.
- HALLIWELL, G. & M. GRIFFIN. The nature and mode of action of the cellulolytic component C₁ of Trichoderma koningii on native cellulose. Biochem. J. 135:587-594, 1973.
- HAMLIN, P.F.; R.E. BRADSHAW; F.M. MELLON; C.M. SANTIAGO; J.M. WILSON; & J.F. peberdy. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. Enzyme Microb. Technol. 3:321-325, 1981.
- HARGER, C.C.; J.B. PASSOS & D.O. SILVA. Is the constitutive intracellular β -D-glucosidase of Humicola sp responsible for glycosylation? Arq. Biol. Tecnol. 29:47, 1986.

- HARRINGTON, J.; L. KIRWAN & M.R. STUART. Heat tolerance of thermophilic and thermotolerant fungi in composted conifer bark. J. Life Sci. R. Dublin Soc. 1,99:105. Apud. Biol. Abstr. 72(7), 1979.
- HAVELKOVA, M. & P. MENSÍK. The ultrastructures of the cells and the protoplasts of Lipomyces lipofer. Antonie van Leeuwenhoek, 35. Supplement: Yeast Symposium B15-B16.
- HAYASHIDA, S. & K. MO. Production and characteristics of avicel desintegrating endoglucanase from a protease-negative Humicola grisea var. thermoidea mutant. Appl. Environ. Microb. 51(5):1041-1046, 1986.
- HAYASHIDA, S. & H. YOSHIOKA. Production and purification of thermostable cellulases from Humicola isolens YH-8. Agric. Biol. Chem. 44:1721-1728, 1980.
- HOPWOOD, D.A. & M.J. MERRICK. Genetics of Antibiotic production. Bacteriological Review 41:595-635, 1977.
- HOUSSET, P.; M. NAGY & J. SCHNENCKE. Protoplasts of Schizosaccharomyces pombe. An improved method for their preparation and the study of their guanine uptake. J. Gen. Microb. 70:260-264, 1975.

- HULME, M.A. & D.W. STRANKS. Induction and the regulation of production of cellulase by fungi. Nature 226:469-470, 1970.
- HULME, M.A. & D.W. STRANKS. Regulation of cellulase production by Myrothecium versucaria grown on no-cellulase substrates. J. Gen. Microbiol. 60:145-155, 1971.
- JACOB, H.E.; W. FORSTER; H. BERG & H. WEBER. Vth. Inter. Symp. on Bioelectrochem Bioenerg., Weimar, Poster, 1979.
- JACOB, F. & J. MONOD. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol. 3:318-356, 1961.
- JAIN, M.K.; K.K. KAPOOR & M.M. MISHRA. Cellulase activity degradation of cellulose and lignin and humus formation by thermophilic fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 73:85-89, 1979.
- KAO, K.N. & M.R. MICHAYLUKE. A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. Planta (Berl.) 115:355-367, 1974.

- KEVEI, F. & J.F. PEBERDY. Interspecific hibridization between Aspergillus nidulans and Aspergillus rugulosus by fusion of somatic protoplasts. J. Gen. Microbiol. 102:255-262, 1984.
- KEVEI, F & J.F. PEBERDY . Further studies on protoplast fusion and interspecific hybridization within the Aspergillus nidulans group. J. Gen. Microb. 130:2229-2236, 1984.
- KIRIMURA, K.; S.P. LEE; S. KAWABE & S. USAMI. Haploid recombinants formed as sectors in the intraspecific fusants of Aspergillus niger producing citric acid. J. Ferment. Technol. 65:557-562, 1987.
- KIRIMURA, K.; T. YAGUCHI & S. USAMI. Intraspecific protoplast fusion of citric acid-producing strains of Aspergillus niger. J. Ferment. Technol. 64(6):473-479, 1986.
- KLEYN, J.G. & T.F. WETZLER. The microbiology of spent mushroom compost and its dust. Can. J. Microbiol. 27:748-753, 1981.
- LAGUNA, S.E.. Estabilidade genética e heterose em híbridos interespecíficos de leveduras. Piracicaba, 1983. 168p. (Mestrado- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USF).

- LEE, G.M.; C.Y. CHOI; J.M. PARK & M.H. HAN. The properties of immobilized whole cell of Humicola spp. with rifamycin oxidase activity. Biotechnol. Lett. 6:143-148, 1984.
- LEE, Y.H. & L.T. FAN. Properties and mode of action of cellulase. Adv. Biochem. Eng. 18:101-129, 1980.
- LUENGO, J.M.; G. REVILLA; M.J. LOPEZ; J.R. VILLANUEVA & J.F. MARTIN. Penicillin production by mutants of Penicillium chrysogenum resistant to polyene macrolide antibiotics. Biotechnol. Lett. 1:233-238, 1979.
- LYSEK, H.; O. FASSATIOVA; N.C. PINEDA & N.L. HERNANDEZ. Ovicidal fungi in soils of Cuba. Folia Parasitol. (Praha) 29:265-270, 1982.
- MACEDO, J.M.B.. Avaliação do comportamento de Humicola sp. com vistas ao melhoramento genético para produção de celulases. Rio de Janeiro, UFRJ, 1986, 90p..
- MACEDO, J.M.B. & J.L. de AZEVEDO. Utilização do método simplex na otimização de parâmetros importantes na obtenção de protoplastos em Humicola nigricans. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS. 12., 1985.

- MANDELS, M.. Microbial sources of cellulase. Biotechnol. Bioeng. Symp. 5:81-105, 1975.
- MANDELS, M.. Growth and cellulase production by Trichoderma. In: BAILEY M., T.M. ENERI & M.LINKO. Symposium on the enzymatic hydrolysis of cellulose. Helsinki, The Finnish National Fund for Research and Development (SITRA), 1975. p.81-109.
- MANDELS , M.; R. ANDREOTTI & C. ROCHE. Measurement of saccharifying cellulase. Biotechnol. Bioeng. Symposium 6:21-23, 1976.
- MANDELS, M & E.T. REESE. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. J. Bacteriol. 79:816-826, 1960.
- MANDELS, M.; J. WEBER & R. PARIZEK. Enhanced cellulase production by amutant of Trichoderma viridae. Appl. Environ. Microbiol. 21:152-154, 1971.
- MATSUSHIMA , P. & R.H. BALTZ. Protoplast fusion. In: DEMAIN, A.L. & N.A. SOLOMON. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Washington, American Society for Microbiology, 1986. 466p.

- MAZEN, M.B.; A.H. MOUBASHER & A.I.I. ABDEL-HAFEZ. some ecological studies on Jordanian soil fungi:2. Cellulose decomposing fungi. Nat. Monspel. Rev. Bot. Gen. Mediterr. 0:1-12. Apud. biol. Abstr. 72(3), 1980.
- MELLON, R.E.. Studies on microbic heredity. I. Observations on a primitive form of sexuality (zygospore formation) in the colon typhoid group. Bacteriology 10:481-501, 1925.
- MONTI, R. & J.a. JORGE. Cellulase production in Humicola sp. R.P.17. Arq. Biol. Tecnol. 29:42, 1986.
- MONTI, R. & J.A. JORGE. Purification of a extracellular xylanase from Humicola grisea var. thermoidea R.P. 17. Arq. Biol. Tecnol. 30(1):103, 1987.
- MONTI, R.; H.F. TERENCE & J.A. JORGE. Regulação de celulases em Humicola sp. Arq. Biol. Tecnol. 27(2):135, 1984.
- MORAES, M.L.T.; R.A. PRADÉ & H.F. TERENCE. Characterization of the β -glucosidase system of the cellulolytic fungus Humicola sp. Arq. Biol. Tecnol. 28(1):57, 1985.

- MORINAGA, T.; S. KANDA & R. NOMI. Lipase production of a new thermophilic fungus, Humicola lanuginosa var. catenulata. J.Ferm. Technol. 64(5):451-453, 1986.
- MORRISON, J.; U. Mc CARTHY & A.P. Mc HALE. Cellulase production by Talaromyces emersonii CBS 814.70 and a mutant UV7 during growth on cellulose, lactose and glucose containing media. Enzyme Microb. Technol. 9:422-425, 1987.
- MORRISON, K.B. & R.C. RIGHELATO. The relationship between hyphal branching, specific growth rate and colony radial growth rate in Penicillium chrysogenum. J. Gen. Microbiol. 81:517, 1974.
- MONTENECOURT, B.S. & D.E. EVELEIGH. Semiquantitative plate assay for determination of cellulase production by Trichoderma viridae. Appl. Environ. Microbiol. 33(1):178-183, 1977a.
- MONTENECOURT, B.S. & D.E. EVELEIGH. Preparation of mutants of Trichoderma reesei with enhanced cellulase production. Appl. Environ. Microbiol. 34:777-782, 1977b.

- MONTENECOURT, B.S. & D.E. EVELEIGH. Hypercellulolytic mutants and their role in saccharification. In: SHUSTER W. Ed. Second Annual Fuels from Biomass. New York, 1978. p.613-625.
- MONTENECOURT, B.S.; S.D. NHLAPO; H. TRIMIÑO-VAZQUEZ; S. CUSKEY D.H.J. SCHAMHART & D.E. EVELEIGH. Regulatory controls in relation to overproduction of fungal cellulases. In: Hollaender, A.. Trends in the biology of fermentations for fuels and chemicals. Basic life sciences 18:33-53, 1980.
- MONTENECOURT, B.S.; D.H.J. SCHAMHART & D.E. EVELEIGH. Mechanisms controlling the synthesis of the Trichoderma reesei cellulase system. In: BERKELEY, E.C.W.; G.W. GOODAY & D.C. ELWOOD(ed.). Microbiol polysaccharides and polysaccharases. New York, Academic Press, 1979. p.327-337.
- MOWE, G.; B. KING & S.J. SENN. Tropic responses of fungi to wood volatiles. J. Gen. Microbiol. 129:779-784, 1983.
- MULLER, R.. Contribution to the problem of protoplast fusion. Acta Facultatis Medicae Universitatis Brunensis 37:39-41, 1970.

- NECAS, O.. Cell wall synthesis in yeast protoplasts. Bacteriol. Rev. 35:149-170, 1971.
- NEVALAINEN, K.M.H.; E. T. PALVA & M.J. BAILEY. A high cellulase producing mutant strain of Trichoderma reesei. Enzyme Microbiol. Technol. 2:59-60, 1980.
- NIKOLOVA, D.; A. DZHEROVA; M. GEORGIEVA; P. ALEXIEVA & P. SHEREMETSKA. characteristics of an enzyme preparation containing acid protease from Humicola lutea strain 120-8:1. Purification by gel chromatography. Acta Microbiol. Bulg 6:64-69. Apud Biol. Abstr. 72(10), 1980.
- NISIZAWA, T. & H. SUZUKI. Catabolite repression of cellulase fermentation in Trichoderma viridae. J. Biochem. 71:999-1007, 1972.
- OCHI, K.. Protoplasts fusion permits high- frequency transfer of a Streptomyces determinant which mediates actinomycin synthesis. J. Bacteriol. 150:592-597, 1982.
- OGAWA, K.; J.A. BROWN & T.M. WOOD. Intraespecific hybridization of Trichoderma reesei QM9414 by protoplast fusion using colour mutants. Enzyme Microb. Technol. 9:229-232, 1987.

- OGUNDERO, V.W.. Amylase and cellulase activities of thermophilic fungi causing deterioration of tobacco products in Nigeria. Mycopathologia 69:131-136, 1979.
- OGUNDERO, V.W.. Degradation of nigerian palm products by thermophilic fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 77:267-271, 1981.
- PEBERDY, J.F.. Fungal protoplasts: Isolation, reversion and fusion. Ann. Rev. Microbiol. 33:21-39, 1979.
- PEBERDY, J.F.. Mycolytic enzymes. In: PEBERDY, J.F. & L. FERENCZY. Fungal protoplasts: their use in physiology, biochemistry and genetics. New York, Marcel Dekker Inc., 1985a. p.31-44.
- PEBERDY, J.F.. Fusão de protoplastos em fungos. In: AZEVEDO, J.L. Genética de Microrganismos em biotecnologia e engenharia genética. Piracicaba, FEALQ, 1985b. p.61-66.
- PEBERDY, J.F.; C.E. BUCKLEY; D.C. DALTRY & P.M. MOORE. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 67:23-26, 1976.

PEBERDY, J.F. & L. FERENCZY. Fungal Protoplasts. New York, Marcel Dekker, 1985. 354p.

PEBERDY, J.F. & R.K. GIBSON. Regeneration of Aspergillus nidulans protoplasts. J. Gen. Microb. 69:325-330, 1971.

PELCZAR, M.; R.REID & E.C.S. CHAN. Microbiologia. Vol.I. São Paulo, Mc Graw Hill, 1980. 566p..

PERALTA, R.M. & J.A. JORGE. Glucosidase enzymes in Humicola grisea var. thermoidea R.P. 17. Arq. Biol. Tecnol. 30(1):102, 1987.

PERLMAN, D. & T.C.C. HALL. Actinophage as a selective agent for increasing antibiotic production. Abstract of 172nd. Meeting American Chemical Society, 34, 1976.

PETTERSON, G; E.B. COWLING & J. PORATH. Studies on cellulolytic enzymes. Biochem. Biophys. Acta 67:1-8, 1963.

PICATAGGIO,S.K.; D.H.J.SCHAMHART ; B.S. MONTENECOURT & D.E. EVELEIGH. Sphaeroplast formation and regeneration in Trichoderma reesei. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17:121-128, 1983.

- POHL, H.A.. dielectrophoresis. Cambridge, Cambridge University Press, 1978. 252 p.
- POLIZELI, M.L.T.M. & H.F. TERENCE. Study of the β -glucosidase activity of the fungus Humicola sp. Arq. Biol. Tecnol. 29:44, 1986.
- PONTECORVO, G.; J.A. ROPER; L.M. HEMMONS; K.D. Mc DONALD & A.W. J. BUFTON. The genetics of Aspergillus nidulans Advances in Genetics 5:141-238, 1953.
- RAUTELA, G. S. & E.B. COWLING. Simple cultural tests for relative cellulolytic activity of fungi. Appl. Environ. Microbiol. 14:892-898, 1966.
- REESE, E.T.. History of the cellulase program at the U.S. Army Natick Development Center. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6:9-20, 1976.
- REESE, E.T.; R.G.H. SIV & H.S. LEVINSON. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hidrolise. J. Bacteriol. 59:485-497, 1950.
- ROBINOW, C.F. & C. E. CATEN. Mitose in Aspergillus nidulans. J. Cell. Sci. 5:403-431, 1969.
- RODRIGUEZ, C. E. Caracterização citogenética e bioquímica do fungo celulolítico Humicola sp. Piracicaba, 1987. 152 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- ROMANNELLI, R.A.; C.M. HOUSTON & S.M. BARNETT. Studies on thermophilic cellulolytic fungi. Appl. Environ. Microbiol. 30:276-281, 1975.
- ROPER, J.A.. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. Experientia 8:14-15, 1952.
- RYU, D.D.Y. & M. MANDELS. Cellulases: biosynthesis and applications. Enzyme Microbiol. Technol. 2:91-102, 1980.
- SAGARA, Y.. Studies on protoplasts of Geotrichum candidum : mechanisms of formation of protoplasts and their physical and morphological properties. Tokushima J. Exp. Med. 16:57-69, 1969.
- SANTOS, A.L. & J.L. DE AZEVEDO. Resistência do fungo entomopatogênico Metarrhizium anisopliae em relação a três fungicidas. Rev. Microbiol. 13(3):272-278, 1982.
- SAUNDERS, V.A. & J.R. SAUNDERS. Microbial genetics applied to biotechnology. London, Croom Helm, 1987. 422p.

SCHNETTLER, R. & U. ZIMMERMANN. Influence of the composition of the fusion medium on the yield of electrofused yeast hybrids. FEMS Microbiol. Lett. 27:195-198, 1985.

SCHWENCKE, J.; N. MAGANA-SCHWENCKE & J. LAPORTE. Yeast protoplasts from stationary and starved cells: Preparation, ultrastructure and vacuolar development. Ann. Microbiol. 128A:3-18, 1977.

SENDA, M.; I. TAKEDA; S. ABE & T. NAKAMURA. Plant and Cell. Physiol. 20:1441-1443, 1979.

SEONG, B.L.; H.J. SON; T.I. MHEEN; Y.H. PARK & M.H. HAN. Enzymatic oxidation of rifamycins by a microorganism of the genus Humicola. J. Ferm. Technol. 63(6):515-522, 1985.

SERMONTI, G.. Genetics of antibiotic-producing microorganisms John Wiley & Sons Ltd., London, 1969. 398p.

SHAKER, H.M.; M.A. FARID & A.I. EL-DIWANY. Optimization of the composition of the nutrient medium for cellulase and protein biosynthesis by thermophilic Aspergillus fumigatus NRC 272. Enzyme Microb. Technol. 6:212-216, 1984.

SHARMA, P.; S.PAJNI; N. DHILLON; D.V. VADEHARA & D.K. DUBE.

Limitations of the congo-red staining techniques for the detection of cellulolytic activities. Biotech. Lett. 8:579-580, 1986.

SHENOLIKAR, S. & K.J. STEVENSON. Purification and partial characterization of a thiol proteinase from the thermophilic fungus Humicola lanuginosa. Biochem. J. 205:147-152, 1982.

SILVA, J.C. & J.L. DE AZEVEDO. Utilization of gamma-rays in the selection of Aspergillus niger for acid production. Rev. Bras. Genet. 1(1):41-50, 1978.

SILVEIRA, W.D. & J.L. AZEVEDO. Protoplast fusion and genetic recombination in Metarhizium anisopliae. Enzyme Microb. Technol. 9:149-152, 1987.

SMITH, W.E.. Observations indicating a sexual mode of reproduction in a common bacterium (Bacteroides funduliformis). J.Bacteriology 47:417-418, 1944.

STEEL, R. & J. TORRIE. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill, New York, 1960, 473 p.

STEWART, J.C. e J.B.PARRY. Factors influencing the production of cellulases by Aspergillus fumigatus. J. Gen. Microbiol. 125:33-39, 1981.

- STREIBLOVA, E.. Surface structure of yeast protoplasts. J. Bacteriology 95:700-707, 1968.
- TAKAGI, M.. Inhibition of cellulase by fermentation products. Biotechnol. Bioeng. 26(12):1506-1507, 1984.
- TAKAGI, M.; S. ABE; S. SUZUKI; G.H. EMERT & N. YATA. Bioconversion of cellulosic substances into energy, chemicals and microbial proteins. In:PROCEEDINGS OF THE BIOCONVERSION SYMPOSIUM, Delhi, 1978. Proceedings. Delhi, Indian Inst. Tecnol., 1978. 551p.
- TAMADA, M.; N. KSAI; M.KUMAKURA & I. KAETSU. Periodical batch culture of the immobilized growing fungi Sporotrichum cellulophilum producing cellulase in the nonwoven materials. Biotechnol. Bioeng. 28:1227-1232, 1986.
- TANAKA, Y.; N. MURATA & H. KATO, 1979. Behavior of nuclei and chromosomes during ascus development in the matting between either rice-strain or weeping lovegrass-strain and ragi-strain of Pyricularia. Ann. Phytopath. Soc. Japan. Tokyo, 45: 182- 191.
- TANSEY, M.R.. Agar diffusion assay of cellulolytic ability of thermophilic fungi. Archiv. fur Mikrobiol. 77:1-11, 1971.
- TEATHER, R.M. & P.J. WOOD. Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl. Environ. Microbiol. 43:777-780, 1982

- TOYAMA , H.; A. SHINMYO & H. OKADA. Protoplast formation from conidia of Trichoderma reesei by cell wall-lytic enzymes of a strain of Trichoderma viridae. J. Ferment. Technol. 64(1):409-411, 1983.
- TOYAMA, H. ; K. YAMAGUCHI; A.SHINMYO & H. OKADA. Protoplast fusion of Trichoderma reesei, using immature conidia. Appl. Environ. Microbiol. 47:363-368, 1984.
- TRIVEDI, L.S. & K.K. RAO. Production of cellulolytic enzymes by Aspergillus fumigatus. Ind. Exp. Biol. 17:671-674, 1979.
- VIEIRA, E. & R.A. PRADE. Production of cellulases and zylanas: effect of catabolite repression on enzyme synthesis in Trichoderma reesei QM 9414, Aspergillus phoenicis and Humicola nigricans. Arq. Biol. Tecnol. 29:43, 1986.
- VILLANUEVA, J.R. & I. GARCIA ACHA. The phenomenon of regeneration in fungal protoplasts. Rev. Lat. Am. Microbiol. 14:49-64, 1972.
- WASE, D.a.J.; W. J. Mc MANAMEY; S. RAYMAHASAY & A.K. VAID. Comparison between cellulase production by Aspergillus fumigatus ~~IM1255091~~ IM1255091. Enzyme Microb. Technol. 7:225-229, 1985.

- WASSERMAN, B.P.. Thermostable enzyme production. Food Technol. 38:78-98, 1984.
- WEBER, H.; W. FORSTER; H. BERG & H.E. JACOB. Parasexual hybridization of yeasts by electric field stimulated fusion of protoplasts. Current Genetics 4:165-166, 1981.
- WOOD, T.M.. Properties of cellulolytic enzyme systems. In: CELLULASES: PRODUCTION, PROPERTIES AND APPLICATIONS. 611, Galway, 1985. Meeting. Galway, M.P. Coughlan, 1985. p407-410.
- XIMENES, E.F.F. & C.R. FELIX. Isolation characterization of the intracellular and extracellular forms of β -glucosidase of Humicola nigricans. Arq. Biol. Tecnol. 29:46, 1986.
- YOSHIOKA, H.; S.I. ANRAKU & S. HAYASHIDA. Production and purification of a novel type of carboxymethylcellulase from Humicola grisea var. thermoidea YH-78. Agric. Biol. Chem. 46:75-82, 1982.
- ZIMMERMANN, U.. Electric field- mediated fusion and related electrical phenomena. Biochem. Biophys. 694:227-277, 1982.

- ZIMMERMANN, A.L.S. & J.a. JORGE. Trehalase activity in Humicola grisea var. thermoidea R.P. 17. Arg. Biol. Tecnol. 30(1):102, 1987.
- ZIMMERMANN, U. & G. PILWAT. Electrical breakdown of cell membranes. In: BIOPHYS. CONGR., 6, Kyoto, 1978. Abstract. Kyoto, 1978. p.140.
- ZIMMERMANN, U. & P. SCHEURICH. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. Planta 151:26-32, 1981.
- ZIMMERMANN, U.; P. SCHEURICH; G. PILWAT & R. BENZ. Zellen mit manipulierten Funktionen. Neue Perspektiven für Zellbiologie, Medizin und Technik. Angew. Chem. 93:332-351, 1981.
- ZIMMERMANN, U.; I. VIENKEN & P. SCHEURICH. Biophys. Struct. Mech. 6:86, 1980.
- ZIMMERMANN, U. & I. VIENKEN. Electric field-induced cell-to-cell fusion. J. Membrane Biol. 67:165-182, 1982.