CARACTERIZAÇÃO CITOGÊNÉTICA E BIOQUÍMICA
DO FUNGO CELULOLÍTICO *Humicola* sp

ELEONORA CARMONA RODRIGUES

Orientador: Aline A. Pizzirani-Kleiner

Dissertação apresentada à Escola Su
perior de Agricultura "Luiz de Quei
roz" da Universidade de São Paulo ,
para obtenção do título do Mestre
em Agronomia. Área de Concentração:
Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro de 1987

R696c Rodrigues, Eleonora Carmona
 Caracterização citogenética e bioquímica do
 fungo celulolítico *Humicola* sp. Piracicaba,
 1987.

 152p. ilus.

 Diss. (Mestre) - ESALQ.
 Bibliografia.

 1. Celulase - Produção Microbiana; 2. Fungo
 Celulolítico - Bioquímica; 3. Fungo Celulolíti
 co - Citogenética. I. Escola Superior de Agri
 cultura "Luiz de Queiroz".

CDD 589.2

Ao Celso,
Daniela e Flávia
Aos meus pais e irmãos

Dedico.

AGRADECIMENTOS

- A Profa. Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner, pelos ensinamentos e incentivo;

- Ao Prof. Dr. Yoshitaka Tanaka, pela co-orientação e empenho na realização dos estudos citológicos;

- Ao Prof. Dr. João Atílio Jorge, pela valiosa colaboração e utilização de seu laboratório para determinação das atividades enzimáticas;

- Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pelas contribuições nas decisões quanto ao desenvolvimento desse trabalho;

- Aos colegas do Departamento de Bioquímica, incluindo o Prof. Dr. Mário Sérgio Palma e Prof. José Eduardo de Oliveira, pelo apoio e estímulo;

- A pesquisadora Maria José Valarini, pelas sugestões, críticas e revisão técnica do texto;

- A Profa. Janete Magali de Araújo, Profa. Luzia D. Paccolla e Carmelita Aparecida Basílio, pelas inúmeras sugestões e amizade;

- Ao Prof. Cláudio Costa, pela revisão do summary;

- A Profa. Terezinha de Oliveira, pela revisão do texto final;

- A Nilce Puga Sigrist, pelo auxílio na listagem bibliográfica;
- Ao Antonio Rocha Campos, Sandra E. Rocha Campos e Carlos Alberto Nolasco, pela colaboração cotidiana;
- A Lygia Vitória Galli, pelo carinho, amizade e incentivo;
- Ao CENA/USP, pela oportunidade de utilização da fonte de radiação gama;
- A FINEP, pelo fornecimento dos recursos necessários para realização dessa pesquisa;
- A CAPES/PICD, pela bolsa de estudo concedida;
- A todos que manifestaram colaboração, apoio, incentivo ou críticas, no sentido de motivar a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xiv
SUMMARY	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Aspectos biológicos do gênero <i>Humicola</i>	3
2.1.1. Taxonomia e citologia	3
2.1.2. Fisiologia e bioquímica da produção de enzimas	6
2.1.3. Genética	11
2.2. Aspectos citogenéticos de núcleos em fungos	13
2.2.1. Estrutura nuclear e divisão mitótica	13
2.2.2. Células multinucleadas e ocorrência natural de heterocariose	21
2.3. Celulases em fungos	26
2.3.1. Ação e regulação	26
2.3.2. Genética e melhoramento para produ ção de celulases	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1. Linhagem utilizada	40
3.2. Manutenção das linhagens	40

	Página
3.3. Esterilização e incubação	41
3.4. Meios de cultura utilizados	41
3.4.1. Meio mínimo (PONTECORVO <i>et alii</i> , 1953)	41
3.4.2. Meio completo (PONTECORVO <i>et alii</i> , 1953, modificado por AZEVEDO e COSTA, 1973)	41
3.4.3. Meio de farelo de trigo (YOSHIOKA <i>et</i> <i>alii</i> , 1982)	42
3.4.4. Meio de farinha de aveia (LARPENT e LARPENT-GOURGAUD, 1975)	42
3.4.5. Meio YPSs ágar (Emerson ² , citado por COONEY e EMERSON, 1964, modificado).	43
3.5. Soluções utilizadas	43
3.5.1. Solução A	43
3.5.2. Solução de ácido dinitro salicílico (DNS)	43
3.5.3. Solução de ácidos nucleicos	44
3.5.4. Solução de albumina	44
3.5.5. Solução de aminoácidos	44
3.5.6. Solução B	45
3.5.7. Solução de desoxicolato de sódio ...	45
3.5.8. Solução de Giemsa	45
3.5.9. Solução salina	45

	Página
3.5.10. Solução de tween 80	46
3.5.11. Solução de vitaminas	46
3.6. Crescimento em meio de cultura	46
3.6.1. Avaliação do crescimento em meio com pleto	46
3.6.2. Avaliação do crescimento em meio m <u>i</u> nimo	47
3.7. Tratamento com mutagênicos	48
3.7.1. Tratamento com ácido nitroso (SIDDIQI, 1962)	48
3.7.2. Tratamento com etil metano sulfonato (ROSATO, 1973)	49
3.7.3. Tratamento com luz ultra-violeta ...	50
3.7.4. Tratamento com radiação gama	51
3.8. Isolamento e caracterização de mutantes mor <u>fo</u> fológicos	52
3.9. Isolamento e caracterização de mutantes auxotróficos (TINLINE, 1961; PONTECORVO <i>et</i> <i>alii</i> , 1953)	53
3.10. Técnica citológica (TANAKA <i>et alii</i> , 1979) .	53
3.11. Complementação entre mutantes morfológicos.	54
3.12. Procedimento para estabilização de linhagens	55
3.13. Cultivo em meio semi-sólido (YOSHIOKA <i>et</i> <i>alii</i> , 1982)	56

	Página
3.14. Ensaio enzimáticos	56
3.14.1. Determinação da atividade celolol <u>i</u> tica	57
3.14.2. Determinação da atividade β -glico- sidase	57
3.14.3. Determinação da atividade amilase.	58
3.14.4. Determinação da atividade protease neutra (McDONALD e CHEN, 1965) ...	59
3.15. Dosagem de proteína (LOWRY <i>et alii</i> , 1951).	60
3.16. Tratamento estatístico	60
4. RESULTADOS	62
4.1. Determinação de meios de cultivo adequados para crescimento	62
4.1.1. Determinação dos redutores de cresci- mento em meio completo	62
4.1.2. Determinação do meio mínimo	64
4.2. Sobrevivência a mutagênicos	64
4.2.1. Sobrevivência dos esporos ao ácido nitroso	64
4.2.2. Sobrevivência dos esporos a etil me- tano sulfonato	66
4.2.3. Sobrevivência dos esporos a luz ul- tra-violeta	66
4.2.4. Sobrevivência de esporos a radiação gama	66

4.3. Características culturais da linhagem selvagem de <i>Humicola</i> sp e dos mutantes morfológicos	70
4.4. Obtenção de mutantes auxotróficos	73
4.5. Observações citológicas	75
4.5.1. Contagem do número de núcleos	75
4.5.2. Divisão nuclear em <i>Humicola</i> sp	83
4.5.3. Anastomose de hifas	88
4.6. Observações quanto a complementação morfológica	88
4.7. Estabilização de algumas linhagens de <i>Humicola</i> sp	91
4.8. Atividades enzimáticas extracelulares da linhagem selvagem e de alguns mutantes morfológicos de <i>Humicola</i> sp	93
4.9. Análises estatísticas	93
5. DISCUSSÃO	93
5.1. Desenvolvimento em meio de cultura e estudo de redutores do crescimento de <i>Humicola</i> sp	101
5.2. Indução de mutação pelos diferentes agentes mutagênicos e isolamento de mutantes	105
5.3. Características culturais da linhagem selvagem de <i>Humicola</i> sp e dos mutantes morfológicos	108

	Página
5.4. Aspectos citológicos	110
5.4.1. Comportamento nuclear em <i>Humicola</i> sp	110
5.4.2. Divisão nuclear e comportamento cro- mossomal	112
5.4.3. Anastomose de hifas	116
5.5. Complementação morfológica	117
5.6. Estabilidade de linhagens de <i>Humicola</i> sp ..	119
5.7. Produção de enzimas pela linhagem selvagem de <i>Humicola</i> sp e alguns mutantes morfológi- cos	121
6. CONCLUSÕES	125
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

LISTA DE TABELAS

Página

1 - Porcentagem de redução do diâmetro de colônias de <i>Humicola</i> sp e porcentagem de sobrevivência em relação ao meio completo	63
2 - Porcentagem de esporos de <i>Humicola</i> sp sobreviventes ao ácido nitroso em diferentes tempos de tratamento	65
3 - Porcentagem de esporos de <i>Humicola</i> sp sobreviventes a etil metano sulfonato em diferentes tempos de tratamento	67
4 - Porcentagem de esporos de <i>Humicola</i> sp sobreviventes a luz ultra-violeta em diferentes tempos de tratamento	68
5 - Porcentagem de esporos de <i>Humicola</i> sp sobreviventes a diferentes doses de radiação gama ...	69
6 - Características da linhagem selvagem e mutantes morfológicos de <i>Humicola</i> sp em meio completo	72
7 - Variação do número de núcleos por esporo na linhagem selvagem e mutantes morfológicos de <i>Humicola</i> sp	76
8 - Complementação morfológica entre as linhagens de morfologia alterada de <i>Humicola</i> sp	90

9 - Atividade avicelase extracelular da linhagem selvagem de <i>Humicola</i> sp e de alguns mutantes morfológicos (unidades/mg de proteínas totais) ..	94
10 - Atividade carboximetilcelulase extracelular da linhagem selvagem de <i>Humicola</i> sp e de alguns mutantes morfológicos (unidades/mg de proteínas totais)	95
11 - Atividade salicinase extracelular da linhagem selvagem de <i>Humicola</i> sp e de alguns mutantes morfológicos (unidades/mg de proteínas totais)	96
12 - Atividade amilase extracelular da linhagem selvagem de <i>Humicola</i> sp e de alguns mutantes morfológicos (unidades/mg de proteínas totais)	97
13 - Atividade protease neutra extracelular da linhagem selvagem de <i>Humicola</i> sp e de alguns mutantes morfológicos (unidades/mg de proteínas totais).	98
14 - Valores médios e significâncias das diferentes atividades enzimáticas extracelulares relativas à linhagem selvagem de <i>Humicola</i> sp e alguns mutantes morfológicos	99
15 - Valores dos coeficientes de correlação para os pares de combinações possíveis entre as diferentes atividades enzimáticas extracelulares da linhagem selvagem de <i>Humicola</i> sp e alguns mutantes morfológicos	100

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 - Retas padrões utilizadas para determinação das atividades enzimáticas	61
2 - Curvas de sobrevivência de esporos de <i>Humicola</i> sp submetidos aos diferentes agentes mutagênicos	71
3 - Morfologia da linhagem selvagem de <i>Humicola</i> sp e dos mutantes morfológicos	74
4 - Distribuição do número de núcleos por esporo na linhagem selvagem de <i>Humicola</i> sp e alguns mutantes morfológicos	77
5 - Distribuição do número de núcleos por esporos em alguns mutantes morfológicos de <i>Humicola</i> sp	78
6 - Distribuição do número de núcleos por esporos em alguns mutantes morfológicos de <i>Humicola</i> sp	79
7 - Características conidiais da linhagem selvagem de <i>Humicola</i> sp e dos mutantes morfológicos mor ₁ a mor ₈	80
8 - Características conidiais dos mutantes morfológicos mor ₉ a mor ₁₈ de <i>Humicola</i> sp	81
9 - Características conidiais dos mutantes morfológicos mor ₁₉ a mor ₂₇ de <i>Humicola</i> sp	82

Página

10 - Observações sobre divisão nuclear em conídios de <i>Humicola</i> sp (x 1.000)	86
11 - Diferentes estágios do processo de anastomose de hifas e divisão nuclear em células miceliais de <i>Humicola</i> sp	89
12 - Complementação morfológica entre alguns <u>mutantes</u> morfológicos de <i>Humicola</i> sp	92

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E BIOQUÍMICA
DO FUNGO CELULOLÍTICO *Humicola* sp**

Autor: Eleonora Carmona Rodrigues

Orientador: Prof^a Dr^a Aline A. Pizzirani-Kleiner

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com a finalidade de estudar aspectos biológicos básicos do fungo celulolítico *Humicola* sp. Assim, através da auxanografia, determinou-se que biotina e tiamina eram necessárias ao meio mínimo, para o desenvolvimento de culturas transferidas por inoculação de ponto; contudo, raramente ocorreu germinação nesse meio, quando suspensões de esporos foram semeadas. Devido ao crescimento não individualizado em meio completo, cinco redutores de crescimento foram ensaiados, optando-se pela utilização de citrato de sódio 0,700%, o qual possibilitou redução de 70,1% no diâmetro da colônia, sem prejuízo da sobrevivência.

Para indução de mutação foram utilizados: ácido nitroso, etil metano sulfonato, luz ultra-violeta e radiação gama, sendo estabelecidas as curvas de sobrevivência de esporos desse fungo, quando submetidos a esses mutagênicos.

Foram então isolados três mutantes auxotróficos e 27 mutantes morfológicos, que posteriormente foram caracterizados.

Observações citológicas de núcleos em 250 esporos da linhagem selvagem indicaram que a classe mais frequente, constituia de 12 núcleos por esporo, evidenciando o estado multinuclear dos conídios desse fungo. Isso pode permitir a ocorrência de heterocariose, e ser responsável, pelo menos em parte, pela variabilidade observada. As curvas de distribuição do número de núcleos por esporo dos mutantes morfológicos, apresentaram máximos para as classes 6, 12, 18 e 24 núcleos, sendo que a linhagem mor₁₀ apresentou pico em 3, podendo ser esse o número básico de núcleos em esporos dessa espécie. Estudo do comportamento cromossomal durante a divisão nuclear demonstrou que a mitose é similar a de outros fungos filamentosos. O número de cromossomos, observados no final da metáfase, não pode ser determinado, com segurança, mas sugeriu-se estar entre 6 e 8. Em culturas de *Humicola* sp foi frequentemente observada anastomose de hifas, possibilitando a ocorrência de heterocariose e/ou heteroplasmose e, indicando que o ciclo parassexual pode ocorrer nessa espécie. A interação entre vários pares de mutantes morfológicos produziu conídios pigmentados semelhantes aos da linhagem selvagem, indicando a ocorrência de algum tipo de sintrofismo ou complementação morfológica.

A linhagem selvagem e alguns mutantes morfológicos apresentaram variabilidade quanto à morfologia e produção de celulasas. Assim, após várias tentativas de estabilização da linhagem selvagem e de alguns mutantes morfológicos, foram determinadas as atividades exoglucanase, endoglucanase, β -glicosidase, amilase e protease neutra dos mesmos. A atividade β -glicosidase do mutante mor₁₃ foi superior à do selvagem e mor₂₁ destacou-se como melhor produtor de amilase, apesar do selvagem ter demonstrado boa produção das referidas enzimas. Coeficiente de correlação altamente significativo foi verificado entre as atividades exoglucanase-endoglucanase, sugerindo que as mesmas devem ser correguladas nesse microorganismo. Correlações significativas foram verificadas, também entre exoglucanase - protease, endoglucanase - protease e β -glicosidase - protease.

CYTOGENETICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION
OF THE CELLULOLYTIC FUNGUS *Humicola* sp

Author: Eleonora Carmona Rodrigues

Adviser: Prof.^a Dr.^a Aline A. Pizzirani-Kleiner

SUMMARY

This research was carried out aiming to study some biological aspects of *Humicola* sp., a cellulolytic fungus. Through the auxanographical assay, it was determined that biotin and thiamine are essential for the growth of this fungus.

It rarely occurred germination in minimal medium, when spore suspensions were plated. Since the colonies were not grown in complete medium independently, five growth reducers were tested. Sodium citrate at the concentration of 0.700% reduced in 70.1% of the colony size, however did not affect the fungus survival. Nitrous acid, sulfonethylmethane, ultra-violet light and gamma ray were used to induce mutation. The survival ratio of this fungus was observed. From these treatments, three auxotrophic and 27 morphological mutants were isolated and characterized.

From the cytological observation, multinuclear

conditions were observed in the spore cells and mycelium both wild and mutant strains. It might be possible the occurrence of heterokaryosis and probably it is responsible for part of the variability. Observations of the nuclei in 250 spores of wild strains showed that the most frequent class included 12 nuclei per spore. Classes with 6, 12, 18 and 24 nuclei per spore were observed in morphological mutants. Three nuclei as the most frequent class was observed in the mutant strain mor₁₀. It suggested that the basic number of nuclei in this fungus is three.

The chromosomal behaviour showed a typical mitosis similar to other filamentous fungi. The chromosome number observed at the end of metaphase could not properly determined, however it might be between 6 and 8. In general, *Humicola* sp. showed anastomosis and it allows the occurrence of heterokaryosis and/or heteroplasmosis. It suggests that the parasexual cycle can occur in this fungus. The association of two morphological mutants produced pigmented spores suggesting some kind of syntrophism or morphological complementation. The wild strain and some morphological mutants showed wide variability concerning to morphology and cellulase production.

Five enzyme systems: exoglucanase, endoglucanase, β -glucosidase, amylase and neutral protease activities were

analysed in wild and selected mutants. Besides the suitable production of β -glucosidase and amylase by the wild strain, the mutant mor_{13} was better producer of β -glucosidase and mor_{21} for amylase. Highly significant level of correlation was observed between exoglucanase and endoglucanase activities showing co-regulation of these enzymes in this fungus. Significant level of correlations were obtained to exoglucanase-protease, endoglucanase-protease and β -glucosidase-protease production, as well.

INTRODUÇÃO

O crescente aumento da população mundial re quer que novas fontes de produção de alimentos e energia se jam desenvolvidas, sendo, nesse sentido, imprescindível a uti lização da celulose, provavelmente o composto biológico mais abundante da terra. Os produtos da hidrólise de materiais ce lulósicos podem ser utilizados como substratos em processos fermentativos para obtenção de materiais alimentares, combus tíveis líquidos ou outras substâncias químicas de interesse econômico.

A conversão da celulose à glicose pode ser realizada através da hidrólise ácida ou enzimática, sendo a última mais vantajosa por apresentar maior rendimento e me nor custo. No entanto, a economia da conversão ainda não é

competitiva e muitos aspectos precisam ser estudados. O complexo celulolítico é constituído de, pelo menos, três enzimas ou classes de enzimas que atuam em sinergia. Muitos microorganismos existentes na natureza, principalmente no solo, são capazes de atacar os diversos tipos de materiais celulósicos e alguns já foram estudados, mas a hidrólise é, geralmente, lenta devido a inadequada proporção das enzimas que compõem o sistema celulolítico, ou a baixa capacidade de síntese. A excreção dessas enzimas, verificada em alguns fungos, constitui um fator de grande importância para a biotecnologia. Os fungos do gênero *Trichoderma* vêm sendo mais estudados, pois apresentam todos os componentes do complexo celulolítico requeridos para a hidrólise da celulose cristalina. No entanto, muitos outros fungos são potencialmente de interesse. É importante salientar que nas espécies isoladas o melhoramento genético obtido através da indução de mutação, seguida de seleção tem elevado a produção das enzimas do complexo celulolítico.

Com o objetivo de estudar aspectos biológicos básicos do fungo celulolítico *Humicola* sp como possíveis subsídios para programas de melhoramento, utilizou-se indução de mutação, estudos citológicos e cariológicos de células conidiais e miceliais e determinou-se as atividades extracelulares de algumas enzimas produzidas pela linhagem selvagem e alguns dos mutantes obtidos, com especial interesse naquelas do complexo celulolítico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos biológicos do gênero *Humicola*

2.1.1. Taxonomia e Citologia

O gênero *Humicola* foi descrito inicialmente por TRAAEN em 1914 incluindo duas espécies *H. fuscoatra* e *H. grisea*, sendo, posteriormente, classificado como Deuteromyceto, sub-classe Hypomycetidae, ordem Moniliales, família Dematiaceae (ALEXOPOULOS e MIMS, 1979). As espécies desse gênero se caracterizam pela produção de conidióforos simples ou pouco ramificados, com conídios apicais globosos ou sub-globosos, unicelulares, denominados aleuriosporos, sendo que algumas também produzem fialides simples e fialosporos em cadeia (BARNETT e HUNTER, 1972). Várias espécies desse gênero têm

sido isoladas do solo, compostagem e madeira em decomposição (WHITE e DOWNING, 1953; TANSEY, 1971; JAIN *et alii*, 1979; MOUBASHER *et alii*, 1982; ABOU-HEILAH, 1985). COONEY e EMERSON (1964) trataram detalhadamente da ocorrência, morfologia, características culturais e taxonomia das espécies termofílicas *H. insolens*, *H. grisea* var. *thermoidea*, *H. stellata* e *H. lanuginosa*.

Poucos trabalhos têm sido descritos, na literatura, sobre a citologia do gênero *Humicola*, sendo, a maioria, relacionada com classificação. Gêneros de fungos imperfeitos são notadamente difíceis de serem classificados, sendo que a maior dificuldade se deve à variação contínua e descontínua que ocorre nas linhagens pesquisadas. Existem variações, dentro de populações selvagens de fungos imperfeitos. Há, também, muitos relatos de variabilidade em isolados monospóricos, quando mantidos e cultivados em laboratório. A instabilidade em fungos assexuais pode ser causada por mecanismos genéticos tais como mutações cromossômicas ou gênicas, heteroplasmose, heterocariose e ciclo parassexual. Com o objetivo de investigar as causas de variabilidade no gênero *Humicola*, De BERTOLDI (1972) verificou a distribuição de núcleos em várias linhagens desse gênero. Ele observou que os filosporos das linhagens estudadas eram sempre uninucleados, enquanto os aleuriosporos eram polinucleados, exceto em uma delas, havendo uma rigorosa relação en-

tre o número de núcleos e o tamanho do aleuriosporo. O mesmo autor constatou também que as células miceliais dessas linhagens são, preferencialmente, polinucleadas, sendo comum a observação de anastomose entre hifas. Foi então sugerido que mutação em um núcleo ou migração de núcleos geneticamente diferentes via conexão citoplasmática poderia originar um heterocário. Uma dissociação do heterocário em seus componentes poderia ser esperada, uma vez que os esporos uninucleados poderiam originar gerações que contêm somente uma espécie de núcleo. Além disso, a condição uninucleada dos fialosporos e polinucleada das hifas e aleuriosporos poderia permitir uma alternância entre os estados homocarióticos e o heterocariótico.

LEPIDI *et alii* (1972) investigaram a composição de bases do DNA (conteúdo CG) de 25 linhagens pertencentes ao gênero *Humicola*. Essas apresentaram ampla variação em sua composição, sendo possível, contudo, detectar a existência de dois grupos de linhagens que diferem quanto ao índice CG, indicando que o *Humicola* pode ser um gênero complexo de várias origens filogenéticas. Uma comparação do conteúdo CG de linhagens pertencentes aos gêneros *Humicola*, *Botryotrichum*, *Coccospora*, *Thermomyces* e *Torula* foi efetuada por DE BERTOLDI *et alii* (1973) com a finalidade de utilizá-la na taxonomia desses Hyphomycetes. O índice CG em 32 linhagens do gênero *Humicola* analisadas variou de 28,5 a 56,9%. Dife

rentes isolados de *H. grisea* var. *thermoidea* apresentaram uma variação de 13% no conteúdo CG e nenhuma conclusão taxonômica ou filogenética pode ser obtida, sendo sugerido que estudos genéticos e bioquímicos deveriam ser efetuados para elucidar melhor essa variabilidade. Posteriormente, SUBRAHMANYAM (1980) propôs a inclusão de uma nova variedade termofílica de *Humicola grisea* a que denominou *indica*. ELLIS (1982), baseando-se em observações ultraestruturais dos esporos de *Humicola grisea* var. *thermoidea* e *H. insolens* demonstrou que ambos poderiam ser considerados como pertencentes a uma única espécie, uma vez que aleuriosporos e clamidosporos típicos foram observados tanto em posição terminal quanto intercalar. Um amplo estudo sobre classificação do gênero *Humicola* e gêneros relacionados deverá ser ainda efetuado.

2.1.2. Fisiologia e bioquímica da produção de enzimas

Algumas espécies do gênero *Humicola* vêm sendo estudadas quanto à capacidade de sintetizar importantes enzimas que apresentam atividades metabólicas diversas. Incluem-se, aqui, *Humicola* sp 72 que apresenta atividade protease ácida (ALEXIEVA *et alii*, 1980), *H. lanuginosa* que possui atividade tiol proteinase (SHENOLIKAR e STEVENSON, 1982) e atividade malato desidrogenase (WALI e MATT00, 1984), *Humicola* spp ATCC 20620 que possui atividade rifamicina oxidase (LEE *et alii*, 1984), *Humicola grisea* var. *thermoidea* com

atividades amilase (ADAMS, 1985), trealase (ZIMMERMANN e JORGE, 1987) e xilanase (MONTI e JORGE, 1987).

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura sobre o gênero *Humicola* trata da capacidade de degradar celulose apresentada por algumas de suas espécies como *H. insolens* (FERGUS, 1969; JAIN *et alii*, 1979; HAYASHIDA e YOSHIOKA, 1980b), *H. grisea* var. *thermoidea* (FERGUS, 1969; TANSEY, 1971; YOSHIOKA *et alii*, 1982), *H. alopallionella* (SGUROS *et alii*, 1973) e *H. fuscoatra* (MANDELS e REESE, 1960). Segundo FERGUS (1969) *H. lanuginosa* e *H. stellata* são incapazes de degradar celulose, porém MISHA *et alii* (1981) isolaram uma linhagem de *H. lanuginosa* que degrada significativamente a celulose. A utilização de microorganismos termofílicos ou termotolerantes para fins biotecnológicos vem sendo investigada com grande interesse, uma vez que suas enzimas celulolíticas podem ser mais estáveis (LJUNGDAHL *et alii*, 1981), além do que a fermentação em temperaturas mais elevadas diminui a incidência de contaminantes. HAYASHIDA e YOSHIOKA (1980a) isolaram de adubo *H. insolens* YH-8, um fungo termófilo celulolítico, cujas enzimas avicelase e carboximetilcelulase (CMCase) foram purificadas e estudadas quanto a estabilidade térmica. A temperatura ótima de ambas as enzimas era de 50°C, sendo que a avicelase permaneceu estável após aquecimento a 65°C por 5 minutos e CMCase apresentou 45% da atividade original após aquecimento a 95°C por 5 minutos.

Tanto avicelase, quanto CMCase mantiveram-se estáveis em faixas de pH de 3,5 a 9,0 e 3,0 a 11,0, respectivamente. YOSHIOKA e HAYASHIDA (1980) também purificaram a β -glicosidase de *H. insolens* YH-8. Esta enzima apresentou temperatura ótima de 50°C e estabilidade para uma faixa de pH de 4,5 a 7,5, sendo 5,0 seu pH ótimo. HAYASHIDA e YOSHIOKA (1980b) verificaram a relação dos resíduos de carboidratos com a termoestabilidade das celulasas de *H. insolens* YH-8. Tanto avicelase, quanto CMCase são glicoenzimas, contendo, respectivamente, 26,1% a 39,0% de resíduos dos carboidratos manose e N-acetilglicosamina. A remoção parcial desses carboidratos resultou em decréscimo significativo da estabilidade térmica e variação de pH, concluindo-se que a ligação com carboidratos é responsável pela estabilidade dessas celulasas. Uma linhagem de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, isolada por YOSHIOKA *et alii* (1982), demonstrou alta atividade CMCase, mas baixa avicelase. Um componente CMCase, que apresentou adsorção sobre avicel foi purificado. Esta enzima não apresentou atividade sobre avicel, mas quando associada à celulase de *H. insolens* YH-8 passou a degradá-la, exibindo grande sinergia.

CHAVES (1982) isolou de compostagem uma linhagem de fungo celulolítico que apresentou melhor crescimento à 40°C e pH 6,0, sendo também observadas alta atividade C_1 ligada à massa celular e maior atividade C_x no sobrenadante (REESE *et alii*, 1950). A atividade β -glicosidase foi medida apenas

no sobrenadante, sendo maior em meio com pH em torno de 7,0. Diversos trabalhos realizados no Brasil, posteriormente citados, utilizaram linhagens obtidas a partir desse isolado, mas em decorrência da variabilidade, diferentes denominações têm sido adotadas como *Humicola* sp., *H. nigricans* e *H. grisea* var. *thermoidea*. ARAÚJO *et alii* (1983) verificaram algumas propriedades da β -glicosidase de *Humicola* sp e compararam-na com aquela produzida por *T. reesei* QM 9414, observando que a atividade dessa enzima em *Humicola* foi quatro vezes maior. MORAES *et alii* (1985) caracterizaram o sistema β -glicosidase de *Humicola* sp, constatando que: (a) a atividade β -glicosidase em meio com glicose como fonte de carbono é 20-25% menor que em culturas induzidas; (b) a atividade máxima em meio com carboximetilcelulose (CMC) é duas vezes maior que em meio com celobiose; (c) a atividade β -glicosidase induzida por CMC é reprimida pela glicose, enquanto que aquela induzida por celobiose é resistente a essa repressão e (d) o sistema β -glicosidase de *Humicola* sp é constituído por quatro componentes, sendo que a proporção desses varia com a natureza do indutor utilizado. POLIZELI e TEREZINI (1986) estudaram o efeito de substâncias intra e extra-celulares, sobre a atividade β -glicosidase, observando que a glicose se comportava como um inibidor competitivo dessa enzima, sugerindo que a glicose pode modular a atividade celulolítica nesse fungo. FERREIRA-FILHO e FELIX (1986) iso

laram e purificaram as β -glicosidases de *Humicola nigricans*. Segundo os autores a enzima secretada no meio pode ser constituída por uma ou por várias espécies de pesos moleculares semelhantes, mas a enzima intracelular é constituída por duas espécies distintas. HARGER *et alii* (1986) constataram que a atividade β -glicosidase intracelular é constitutiva em *Humicola* sp cultivado em meio com glicose como fonte de carbono. Pesquisa objetivando a otimização das condições para produção de celulasas realizada por MONTI e JORGE (1986), constatou entre outras observações: aumento de 3 a 4 vezes na atividade extracelular C_x por adição de extrato de malte no meio de cultura em relação a adição de extrato de levedura, aumento de 3 a 4 vezes na atividade avicelase extracelular usando substratos naturais ao invés de celulose e maior produção de celulasas quando pH inicial foi 6,0. O efeito da repressão catabólica sobre a síntese de celulasas e xilanases foi investigado em *T. reesei* Q.M. 9414, *Aspergillus phoenics* e *Humicola nigricans* por VIEIRA e PRADE (1986). A taxa de repressão específica para celulase foi de 78,5%, 37,0% e 56,6% em *T. reesei*, *A. phoenics* e *H. nigricans* respectivamente, em meio com glicose como repressor. A produção de β -glicosidase e β -galactosidase de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, foi recentemente estudada em diferentes condições por PERALTA e JORGE (1987). Os resultados indicaram que essas enzimas podem ser correguladas e que a atividade β -galactosidase pode

ser uma celobiase. FERREIRA-FILHO e FELIX (1987) purificaram as 4 espécies de β -glicosidase de *Humicola* sp e verificaram que o pH ótimo de todos os componentes estava entre 4,5 e 6,0 e a temperatura ótima entre 60 e 70°C. Essas formas de β -glicosidase apresentaram estabilidades térmicas distintas, bem como diferentes relações carboidrato : proteína. HARGER e SILVA (1987) estudaram a atividade p-nitrofenil- β -D-glicopiranosidase de *Humicola* sp em meio com glicose como única fonte de carbono. As formas intracelular e extracelular dessa enzima foram parcialmente caracterizadas, sugerindo que a mesma é, na realidade, uma β -glicosidase.

2.1.3. Genética

Os aspectos genéticos do gênero *Humicola* têm sido pouco explorados. De BERTOLDI e CATEN (1975) descreveram o ciclo parassexual em uma espécie de *Humicola*. Através da irradiação ultra-violeta de aleuriosporos de uma linhagem de morfologia branca e outra preta, foram obtidos mutantes auxotróficos estáveis, cujo heterocário produziu conídios diploides, que, posteriormente, foram induzidos à haploidização com p-fluorfenilalanina. A segregação de marcas na haploidização indicou que a pigmentação podia ser atribuída a um único gene cromossomal e as 6 marcas estudadas foram localizadas em, pelo menos, 4 grupos de ligação distintos. A análise através do ciclo parassexual sugeriu que a simples diferencia-

ção genética de morfologia entre linhagens dessa espécie de *Humicola*, não refletia divergência extensiva e consequentemente não devia ser considerada em qualquer critério de classificação.

Com a finalidade de aumentar a produção de protease ácida da linhagem de *Humicola* sp 72, ALEXIEVA *et alii* (1980) submeteram-na por 3 vezes consecutivas à radiação gama, utilizando doses de 100, 120 e 120 Krad, respectivamente. Assim, foi obtido um mutante com atividade proteolítica ácida 4,4 vezes superior a da linhagem original. HAYASHIDA e MO (1986) utilizaram luz ultra violeta e N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) na obtenção de mutantes para protease em *Humicola grisea* var. *thermoidea*. O mutante nº 140 apresentou atividade proteolítica 65% inferior e endoglucanase 58% superior a linhagem parental, sendo que essa enzima demonstrou alta adsortividade sobre avicel. O filtrado de cultura desse mutante exibiu alta atividade sobre papel de filtro. A linhagem nº 191 apresentou aumento na produtividade de protease, mas baixa atividade sobre papel de filtro e nenhuma atividade endoglucanase com adsortividade sobre avicel. Foi, então, sugerida a existência de 2 tipos de endoglucanase em *H. grisea* var. *thermoidea*, o tipo comum que não se adsorve nem desintegra avicel, e um novo tipo que se adsorve sobre avicel, degradando-a intensivamente, sugerindo multiplicidade de formas, como observado no complexo celulolítico de outros fungos.

MACEDO (1986) otimizou o processo de obtenção de protoplastos na linhagem de *Humicola* sp. Considerando que os conídios dessa linhagem eram multinucleados, o autor utilizou protoplastos de células miceliais para obtenção de mutantes. Após irradiação com luz ultra-violeta foram isolados vários mutantes morfológicos e 4 mutantes auxotróficos para amino-ácidos (arg_1 , glu_1 , glu_2 , glu_3). NEIROTTI *et alii* (1987) estudaram o processo de obtenção de protoplastos em *Humicola* sp, concluindo que o tempo ideal de tratamento enzimático do micélio para estudos bioquímicos, de regeneração ou fusão de produtos genéticos foi de 3 horas, tempo no qual se obtém maior número de protoplastos. Por outro lado, para se obter mutantes ou estabilizar produtos genéticos, os referidos autores observaram que o melhor tempo de tratamento foi 30 minutos, obtendo-se assim, maior proporção de protoplastos uninucleados. Fusão de protoplastos parece constituir um método promissor para o melhoramento de linhagens de *Humicola*.

2.2. Aspectos citogenéticos de núcleos em fungos

2.2.1. Estrutura nuclear e divisão mitótica

A estrutura nuclear em fungos é semelhante à das plantas superiores apresentando membrana, matriz, cromatina, nucléolo, estruturas polares e fuso. O envelope nu

clear consiste de duas membranas paralelas, mas existe consi
derável variabilidade no seu grau de persistência durante a
mitose (GULL e NEWSAM, 1976). A matriz é constituída pelo
sistema mitótico e uma massa de nucleoplasma, onde a mitose
ocorre (HEATH, 1980c). A maioria dos fungos apresenta um
padrão típico de heterocromatina-eucromatina na interfase,
mas a cromatina só é observada como corpúsculos particula-
dos - os cromossomos - em divisão nuclear. Contudo, há organis
mos cujos cromossomos não se condensam durante a mitose (HEATH,
1980b). O nucléolo esférico e rico em ácido nucleico, pode
apresentar, segundo FULLER (1976), considerável variação nos
padrões de comportamento durante a mitose. HEATH (1980c)
apresenta, em sua revisão, ampla variação morfológica de estru
turas polares observadas em núcleos fúngicos, bem como suas
diversas denominações. Essas estruturas asseguram que cada
núcleo filho receba seu complemento essencial de organelas
autônomas durante o processo de divisão e, também, são conside
radas responsáveis pela formação do fuso. O fuso é o compo-
nente central dos núcleos mitóticos, uma vez que sua estru
tura foi desenvolvida para executar o trabalho primário da mi
tose: a segregação do genoma. O trabalho, anteriormente cita
do, classifica os componentes da maioria dos fusos mitóticos
em dois tipos, incluindo um feixe de microtúbulos, que se dis
tribue de um polo a outro e componentes associados a cromos
somos, que podem interagir com esse feixe, movendo os cromosso
mos na fase ativa da mitose. A função desse feixe parece ser
o estabelecimento de uma base mecânica contra a qual o movi

mento dos cromossomos pode ser gerado, separando o genoma e núcleos filhos na anáfase e telófase.

O termo mitose foi sugerido devido a condensação da cromatina em fios compactos. Entretanto, existem organismos, nos quais a condensação não é observada e outros, onde ela parece estar condensada do início até o final do ciclo mitótico (HEATH, 1980a). O avanço do conhecimento científico sobre a mitose em eucariotos inferiores revela muitas alterações em relação ao processo clássico. HEATH (1980c) analisando a mitose em mais de 200 espécies de eucariotos inferiores, mostrou que a única característica comum a todos os casos foi a presença de microtúbulos conectando os cromossomos aos polos. Essas conexões constituem a essência da separação precisa dos cromossomos, pois cromátides irmãs não devem ser conectadas por um mesmo polo. Em uma revisão mais recente MAZIA (1987) resume as variações conhecidas acerca do ciclo mitótico, apresentando um espectro de arranjos entre um esquema inteiramente fechado e outro extremamente aberto da mitose clássica. Os fusos dos polos podem ser externos ao núcleo, localizados em uma abertura do envelope nuclear, ou internos. Os centríolos podem exibir uma variedade de formas, ou não serem visualizados. Nos ciclos mitóticos estudados, podem-se notar casos onde placas metafásicas típicas são formadas e outros, onde isso não ocorre. Todos os estilos de separação cromossômica são encontrados entre os organismos eucarioti

cos inferiores: movimento de cromossomos para os polos, sepa
ração polo-polo ou combinação de ambos.

Atualmente, dispõe-se de muito mais informa
ções sobre a mitose a nível de análise ultra-estrutural
(ICHIDA e FULLER, 1968; BRASELTON *et alii*, 1975; HUANG *et*
alii, 1975; FULLER, 1976; HEATH, 1980a,b,c; MARTIN Jr. e MILLER,
1986). Contudo, muitos aspectos de microscopia ótica são rele
vantes, como observado por AIST e WILLIAMS (1972); os quais
demonstraram complementaridade entre estudos de microscopia
ótica e eletrônica em *Fusarium*. Embora muitas variações te
nham sido observadas, admite-se que a mitose em fungos siga
a mesma seqüência de eventos que em organismos superiores.

Núcleos interfásicos

Os núcleos interfásicos de fungos apresentam-
-se nítidos em espécimes vivas através de microscopia de con
traste de fase ou em espécimes fixadas e coradas. Após fixa
ção, a cromatina de núcleos interfásicos se apresenta granu
lar ou filamentosa e em alguns casos organizada na forma de
cromossomos identificáveis (ROBINOW e BAKERSPIGEL, 1965).
Observações realizadas por KNOX-DAVIES (1967) mostraram que
núcleos de *Macrophomina phaseoli* apresentam um único e gran
de nucléolo. Segundo AIST e WILSON (1967b) em *Ceratocystis*
fagacearum pode-se observar um nucléolo na periferia da cro

matina sem visualização de cromossomos a nível ótico. O núcleo interfásico, ocasionalmente se apresentou como uma massa cromatínica de contorno irregular, com nucléolo associado a dois cromossomos nucleolares. Investigações microscópicas de núcleos vivos e duplamente corados realizadas em *Helminthosporium sativum* por HUANG e TINLING (1974), revelaram que na linhagem haplóide, eram menores e continham um único nucléolo, enquanto na linhagem diplóide eram maiores, sendo que alguns apresentaram dois nucléolos. Na periferia desses núcleos foi observado um grânulo, provavelmente análogo ao centríolo. Segundo TANAKA (1976) núcleos miceliais interfásicos de *Pyricularia oryzae* podem apresentar nucléolo visível ou não. Em *Trichometasphaeria turcica* (MATSUMURA, 1981) os núcleos interfásicos continham uma matriz filamentosa, semelhante a fios cromatínicos e nucléolo esférico, fortemente corado. Em todos os casos as formas consideradas como características de núcleos interfásicos eram esféricas, ovais ou arredondadas.

Prófase

A mitose se inicia com a prófase, provavelmente a fase mais interessante do processo, por ser o período no qual a cromatina se condensa e forma-se o fuso, sendo, no entanto, a fase mais negligenciada na literatura dos fungos (HEATH, 1980a). As principais dificuldades estão relacionada

das com a distinção de alguns eventos em relação à interfase e o tempo. Em *Fusarium oxysporum* (AIST e WILLIAMS, 1972) a prófase dura aproximadamente 20 segundos. Contudo em *Saprolegnia* (HEATH, 1980b), essa é a fase mais longa do ciclo mitótico, sendo esse estágio numericamente dominante em hifas vegetativas. A maioria dos fungos apresenta um ciclo de condensação normal da cromatina, como observado em *Neurospora* (SOMERS *et alii*, 1960), *Aspergillus nidulans* (ROBINOW e CATEN, 1969) e *Helminthosporium sativum* (HUANG e TINLINE, 1974). Assim, em *A. nidulans*, foram observados, após a condensação, 8 cromossomos em núcleos haplóides e em *H. sativum* foram distinguidas 6 a 8 partículas. Cromossomos individuais também foram observados em *Fusarium oxysporum* por AIST e WILSON (1967a), bem como o início do desaparecimento do nucléolo. Em *Ceratocystis fagacearum*, AIST e WILSON (1967b) observaram o desaparecimento do nucléolo durante a prófase, sendo que os cromossomos associaram-se através das extremidades. HUANG e TINLINE (1974) relataram que em *H. sativum* o núcleo aumentou de tamanho, surgindo dois corpúsculos análogos ao centríolo, que se separaram em posições opostas. De acordo com TANAKA (1976) os núcleos profásicos de *P. oryzae* são esféricos, alongados ou deformados com grânulos, e o nucléolo pode ser visível ou não ao microscópio ótico.

Alguns autores citam um estágio intermediário entre prófase e metáfase - a prometáfase. TURIAN e CANTINO

(1960) investigando a mitose de *Blastocladiella* observaram, nesse estágio, um anel de cromatina em rosário circundando o nucléolo. Em *H. sativum*, HUANG e TINLINE (1974) citaram o aparecimento do fuso entre os centríolos e a agregação dos cromossomos no centro do núcleo, durante a prometáfase.

Metáfase

Na metáfase clássica os pares de cromátides se alinham em uma placa equatorial, mas em fungos os detalhes da metáfase também não são convencionais (HEATH, 1980c). Enquanto muitos fungos apresentam placa metafásica típica, como *Catenaria* (ICHIDA e FULLER, 1968), *Phlyctochytrium* (McNITT, 1973) e *H. sativum* (HUANG *et alii*, 1975), muitos outros mostram cromossomos dispersos ao longo do fuso, formando um cilindro que em seção ótica mediana longitudinal tem aparência de duas faixas de cromatina. Segundo DAY (1972) esse arranjo tem sido descrito como sistema "dupla barra" ("two track"), observado em muitos casos como em *A. nidulans* (ROBINOW e CATEN, 1969), *F. oxysporum* (AIST e WILSON, 1967a) e *C. fagacearum* (AIST e WILSON, 1967b). Em outros organismos como *Sorosphaera veronicae* (BRASELTON *et alii*, 1975) e *Phlyctochytrium irregulare* (McNITT, 1973), a cromatina forma uma massa aparentemente fusionada que se divide em duas partes, as quais se separam durante a anáfase. Segundo TANAKA (1976) a metáfase em células miceliais de *P. oryzae* pode ser caracte-

terizada, a nível ótico, pela presença de cromossomos em forma de rosário, conectados por fios cromatínicos ou por núcleos alongados com cromossomos não diferenciados.

Muitas vezes, contagens cromossômicas podem ser efetuadas através de microscopia ótica no estágio de metáfase, mas, de acordo com ROBINOW e BAKERSPIGEL (1965), na metáfase tardia, geralmente se observa um número de elementos separadamente visíveis, menor que o esperado, $2n$, presumivelmente devido à associações temporárias de cromátides.

Anáfase-Telófase

A anáfase em células miceliais de *F. oxysporum* (AIST e WILSON, 1967a) e *C. fragacearum* (AIST e WILSON, 1967b) é caracterizada pelo movimento de cromossomos independentes, ou grupos associados em direção às paredes opostas da hifa, sendo que nesse estágio pode-se observar o fuso entre as cromátides durante a separação. Núcleos telofásicos de *F. oxysporum* circundados pelo envelope tornam-se menos distintos, enquanto que na telófase em *C. fragacearum* os núcleos filhos se localizam em posições opostas e o fuso desaparece. Em *A. nidulans* (ROBINOW e CATEN, 1969), cujos cromossomos metafásicos formam a "dupla barra", há um movimento da cromatina em direção às extremidades, na anáfase, sugerindo uma quebra transversal da "dupla barra". Na telófase ocorre reconstr

trução dos núcleos filhos, a partir da massa cromatínica, que gradualmente se torna mais granular. HUANG e TINLINE (1974) relataram que em *H. sativum* a anáfase de núcleos somáticos se inicia pelo movimento das cromátides da placa metafásica para os polos, de maneira assincrônica, resultando em núcleos de aparência alongada. Na telófase, os cromossomos filhos começam a se descondensar, ocorre quebra da membrana na região interzonal, seguida de reestruturação na região de rompimento, desaparecendo o nucléolo, que é liberado no citoplasma. Em *P. oryzae* (TANAKA, 1976) são classificados como anafásicos, os núcleos alongados com constrição na parte central, os núcleos alongados paralelamente com ou sem fios cromatínicos e os núcleos com nucléolos na parte terminal. Como telofásicos são classificados, núcleos como barras paralelas com nucléolos; núcleos, como barras separadas com nucléolos; dois núcleos conectados por fios de cromatina e dois núcleos paralelos associados por fios cromatínicos. Em *T. turcica* (MATSUMURA, 1981) observou a presença de pares de núcleos unidos por estreito fio no final da divisão.

2.2.2. Células multinucleadas e ocorrência natural de heterocariose

Em fungos, pode-se observar uma ampla variação no tamanho, morfologia e número de núcleos por segmento de hifa. Muitas vezes ocorre diferença entre o segmento apical

e aquele que está próximo desta extremidade, o qual geralmente é destituído de núcleos (BURNETT, 1976). Em vários Basidiomicetos, o micélio vegetativo normal é dicariótico (PARMETER Jr. *et alii*, 1963). Em *Rizoctonia solani* (SANFORD e SKOROPAD, 1955) foi observado que as células de extremidades de hifas contêm 2 a 15 núcleos, enquanto em células tipo Y o número variou de 4 a 25 e em células não ramificadas de 3 a 19 núcleos. A migração de núcleos através dos poros septais, na direção de crescimento, observada nesse fungo, foi considerada como causa dessa variação. BOLKAN e BUTLER (1974) utilizaram marcadores genéticos naturais para mostrar a ocorrência de heterocariose nessa espécie, demonstrando, inclusive, que a virulência parece ser recessiva e determinada por múltiplos fatores.

Entre as diversas espécies de fungos incluem-se aquelas que possuem de 1 a 2 núcleos até 20 a 30 núcleos por célula (BRACKER, 1967). Em oposição aos Basidiomicetos, muitos Ascomicetos e Deuteromicetos apresentam uma condição nuclear menos regular (PARMETER Jr. *et alii*, 1963). Segundo ALEXOPOULOS e MIMS (1979) os Deuteromicetos ou fungos imperfeitos, usualmente, apresentam células somáticas multinucleadas. HRUSHOVETZ (1956), estudando a citologia de *Helminthosporium sativum* (forma imperfeita, classificada como Deuteromiceto) observou que o número de núcleos em células miceliais variou de 0 a 13, sendo mais comum a ocorrência de 2 a

5. Foi também constatada fusão de hifas com subsequente migração nuclear através da ponte hifal. Os conidióforos jovens surgiram como ramificações laterais da hifa principal, sendo que pelo menos dois núcleos participaram inicialmente de sua formação. O conidióforo apresentou-se multinucleado, multicelular e não ramificado, ocorrendo, invariavelmente, a entrada de muitos núcleos na formação do conídio jovem. O alongamento progressivo do conídio envolveu posterior subdivisão das células, que em alguns casos chegaram a apresentar 13 células multinucleadas. O autor sugeriu que esse é um mecanismo de perpetuação da heterocariose, que pode ser, em parte, a causa da alta variabilidade encontrada nesse fungo. KNOX-DAVIES e DICKSON (1960) relataram que as células das hifas vegetativas de *H. turcicum* eram, geralmente, multinucleadas, ocorrendo mais de 20 núcleos em hifas maduras. Fusão de hifas foi comumente observada em certos isolados, bem como a presença de núcleos na conexão entre as hifas anastomosadas. O conidióforo, multinucleado durante todo seu desenvolvimento, originou conídios que em estado jovem continham 3 núcleos, mas em estágios mais avançados apresentaram mais de 30 núcleos por célula. MASIAS e BERQUIST (1974) isolaram linhagens heterocarióticas de *H. turcicum* patogênicas para milho e sorgo e mostraram que os genes determinantes da patogenicidade atuam de maneira aditiva em heterocariose. Em *H. oryzae* (LEE *et alii*, 1984) as células somáticas e miceliais também eram multinucleadas. O número de núcleos nas células

das hifas desse fungo variou de 1 a 14, sendo mais comum 3 a 5. No entanto, em conídios, se observou uma variação de 2 a 29 núcleos por célula, mais comumente de 5 a 10, sendo que conídios maduros apresentavam 8 a 12 células. Fusão de hifas e subsequente migração nuclear foram observadas em todas as partes da colônia, indicando que a alta variabilidade entre isolados de *H. oryzae* e sub-culturas do mesmo isolado, pode ser atribuída à perpetuação da heterocariose como resultado da alta frequência de anastomose e divisão nuclear.

Uma das primeiras tentativas de estudo da ocorrência natural de heterocariose foi feita por HANSEN e SMITH (1932), em isolados de *Botrytis cinerea* coletados do campo. Algumas culturas produziam uma variedade de estados homocarióticos morfologicamente diferentes, indicando que tanto as células de hifas quanto as dos conídios eram multinucleadas. Contudo, JINKS (1959) reexaminando alguns desses resultados apontou uma base citoplasmática para muitos supostos heterocários. As espécies de *Penicillium* comumente existem, na natureza, sob a forma de heterocário, geralmente apresentando melhor crescimento que os componentes homocarióticos. Contudo, essa vantagem é condicional, pois depende do balanço de nutrientes do solo. A heterocariose em *Penicillium* selvagem parece proporcionar variação somática e adaptação natural a esse fungo (JINKS, 1952).

A ocorrência natural de estados heterocarióticos

cos tem sido raramente examinada, mas a maioria desses estudos foram efetuados com fungos do solo. BUXTON (1954) observou heterocariose em *Fusarium oxysporum*, mas não foi esclarecido se o heterocário foi isolado do solo ou de tecido de planta infectado. Ming *et alii*¹ citado por SIDHU (1983) relataram estados heterocarióticos naturais em *F. fujikuroi* (*Gibberella fujikuroi*) isolando, a partir de extremidades de hifas, 3 tipos de conídios que diferiam quanto a cor e produção de giberelina. Tais autores verificaram que heterocários naturais eram constituídos pela combinação de 2 ou 3 estados homocarióticos, e que os heterocários apresentavam vantagens seletivas tanto em arroz quanto em meio sintético. Em *F. moniliiforme* SIDHU (1983) observou que alterações nas proporções dos componentes de um meio de cultivo natural se refletem na razão nuclear, mostrando que o heterocário sofre uma adaptação específica. O autor verificou, dessa forma, que os constituintes dos heterocários, recuperados de tecido doente, eram diferentes daqueles obtidos nos estágios iniciais de crescimento da planta, indicando que esse processo é um mecanismo pelo qual as proporções de vários grupos de genes podem variar em diferentes estágios de crescimento da planta. O processo de heterocariose fornece uma adaptação contínua e oportuna ao fungo *F. moniliiforme*, através de ajus

¹MING, Y. N.; P. C. LIN e T. F. YU, 1966. Heterokaryosis in *Fusarium fujikuroi* (Saw). *Wr. Sci. Sin.*, 15: 371-378.

tes na relação de núcleos, sem causar efeitos drásticos imediatos ao respectivo hospedeiro. PARADELA FILHO e SILVA (1986) estudando a variabilidade em 197 culturas desse patógeno, observaram que 18 delas ocorriam na natureza sob a forma de heterocários.

2.3. Celulases em fungos

2.3.1. Ação e regulação

Um grande número de microorganismos existentes na natureza são capazes de degradar os diversos tipos de materiais celulósicos. Entretanto, poucos são os grupos que, potencialmente, apresentam interesse industrial. Dentre os microorganismos, os fungos têm despertado maior atenção, devido à excreção dessas enzimas, enquanto que em bactérias, geralmente estão associadas à parede celular (WOOD, 1985). Entre os fungos mais estudados encontram-se espécies dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Sporotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Schizophillum* e *Sclerotium* (BISARIA e GHOSE, 1981). Para que um microorganismo seja industrialmente viável é necessário que apresente crescimento rápido, facilidade de cultivo e possua um complexo celulolítico estável e ativo sobre celulose cristalina.

Mecanismo de ação

Nos microorganismos celulolíticos, a celulose é degradada por um sistema multienzimático. Alguns organis

mos podem consumir, rapidamente, todas as formas de celulose, enquanto outros são capazes de hidrolisar apenas seus derivados solúveis. Baseando-se nessas observações REESE *et alii* (1950) propuseram o conceito $C_1 - C_x$. O termo C_1 indica ação inicial sobre celulose cristalina, separando as cadeias de forma a permitir o ataque pelo componente C_x , que também hidrolisa os derivados solúveis. Estudos sobre o sistema enzimático das celulasas demonstraram que muitos microorganismos como *Penicillium funiculosum* (WOOD *et alii*, 1980), *Trichoderma reesei* QM 9414 (FARKAS *et alii*, 1982), *Trichoderma koningii* (WOOD e Mc CRAE, 1982) e *Schizophyllum commune* (WILLICK e SELIGY, 1985) degradam a celulose por meio de um sistema constituído de, pelo menos, três enzimas ou classes de enzimas. Estas, incluem a endo- β -1,4-glucanase (1,4- β -glucanoglucanoidrolase-E.C.3.2.1.4), a exo- β -1,4-glucanase, geralmente uma celobioidrolase (1,4- β -D-glucanocelobioidrolase - E.C.3.2.1.91) e a celobiase ou - β -glicosidase (β -D-glucosidoglucoidrolase - E.C.2.2.1.21). As endoglucanases clivam ligações β -1,4 ao acaso, ao longo da cadeia de celulose, enquanto as exoglucanases hidrolisam a celulose, liberando celobiose ou unidades de glicose, a partir das extremidades não redutoras da cadeia do polímero (WOOD e Mc CRAE, 1972; BERGHEM *et alii*, 1975; WOOD *et alii*, 1980; LEE e FAN, 1980; ERIKSSON, 1981). As β -glicosidases hidrolisam celobiose e celooligossacarídeos de cadeia pequena a glicose, mas não degradam a celulose (SHEWALE e SADANA, 1978; LEE e FAN, 1980). Pesquisas sobre as celulasas têm revelado que a ação sobre a celulose é totalmente dependente da ação

cooperativa dos componentes enzimáticos (WOOD e Mc CRAE, 1978; WOOD *et alii*, 1980; WOOD e Mc CRAE, 1982; RAO *et alii*, 1986). Quando celobioidrolase, endoglucanase e β -glicosidase são separadas, não se observa atividade sobre celulose cristalina, mas essa é recuperada quando as misturas enzimáticas são reconstituídas. Misturas de endoglucanase e celobioidrolase podem apresentar alguma atividade, mas eficiência máxima só é obtida quando a β -glicosidade está presente. Esta, remove o efeito inibidor da celobiose que é um dos principais produtos das outras duas enzimas (WOOD, 1985). Outras enzimas podem estar envolvidas no processo de degradação da celulose como em *Sporotrichum pulverulentum* (ERIKSSON, 1978), onde a atividade celulolítica ocorre simultaneamente com a atividade celobiose:quinona-oxiredutase, oxidando celobiose e celodextrinas às correspondentes lactonas.

Estudos do processo de adsorção das celulases sobre a celulose revelam que o mecanismo de hidrólise enzimática pode estar relacionado ao mecanismo sinérgico. A adsorção das celulases é afetada, significativamente, pelas condições de reação e características físico-químicas da celulose (LEE *et alii*, 1982). As endoglucanases contêm componentes que se adsorvem à celulose e outros que não apresentam tal característica. Cada componente parece apresentar locais de adsorção distintos, que podem corresponder aos sítios ativos das reações de hidrólise. RYU *et alii* (1984) observaram que a adsorção e o processo inverso são coordenados por um meca-

nismo competitivo, aumentando a velocidade de hidrólise da celulose, e, então, propuseram um modelo de adsorção competitiva associado a um mecanismo sinérgico.

Multiplicidade de componentes

Métodos de fracionamento têm demonstrado que cada tipo de componente enzimático do sistema celolítico apresenta, em muitos organismos, uma multiplicidade de formas (WOOD e Mc CRAE, 1978; WOOD *et alii*, 1980; ERIKSSON, 1981; LANGSFORD *et alii*, 1984). Contudo, tem sido sugerido que o número de genes estruturais das celulasas pode ser mais restrito, e que a multiplicidade observada deve-se a um processamento pós-transcricional. A clivagem proteolítica pós-secreção parece ser responsável pela multiplicidade, em alguns casos, como o das endoglucanases de *Sporotrichum pulverulentum* (NAKAYAMA *et alii*, 1976). Muitas proteínas eucarióticas secretadas são glicosiladas e isso também parece ser responsável pela multiplicidade de muitas celulasas fúngicas como é o caso de *Schizophyllum commune* (WILLICK e SELIGY, 1985). Nesse organismo foram encontrados dois produtos diretos de m-RNAs distintos para cada celulase (β -glicosidase, exoglucanase e carboximetilcelulase), mas a heterogeneidade adicional observada se deve a diferentes níveis de glicosilação. Em culturas submersas de *Trichoderma reesei*, LABUDOVÁ e FARKAS (1983) observaram múltiplos padrões moleculares de endoglucanase e β -glicosidade, por meio de focalização isoele

trica. Tais autores concluíram que essa multiplicidade é uma propriedade inerente do sistema celulásico sendo, pelo menos em parte, geneticamente determinada, pois não pode ser considerada como resultado de modificações proteolíticas ocorridas após secreção dessas enzimas, nem mesmo por glicosilação. A proteólise e glicosilação diferenciais podem contribuir em alguma extensão para a natureza heterogênea dos sistemas celulolíticos. Porém, como muitos componentes são geneticamente determinados, e outros não, as evidências constatadas ainda não são conclusivas, se bem que na realidade um sistema enzimático relativamente simples pode ser suficiente para degradar a celulose cristalina (WOOD, 1985).

Regulação

A biossíntese de enzimas celulolíticas está sujeita a uma variedade de controles bioquímicos e genéticos. Admite-se que as celulasas sejam enzimas adaptativas e que o controle genético da síntese seja mediado por três mecanismos diferentes: indução, repressão e repressão catabólica, que podem operar independentemente, ou em associação (GOKSOYR e ERIKSEN, 1980). Em *Trichoderma*, as endoglucanases e celobiohidrolases estão sujeitas à repressão catabólica por substratos facilmente metabolizáveis e podem ser induzidas por celulose, sofrorose e, em menor extensão, por lactose e celobiose (MONTENECOURT *et alii*, 1979; RYU e MANDELS, 1980). Recen

temente, NANDA *et alii* (1986) demonstraram que a L-sorbose também induz a produção de celulase em *T. reesei* QM 9414. Não foi observada correlação entre a indução de celulase e os níveis de AMP-cíclico intracelular (MONTENECOURT *et alii*, 1981). Para síntese e liberação das celulasas, condições ambientais, como pH e temperatura, podem ser limitantes (GHOSE e GHOSH, 1979). Segundo GONG e TSAO (1979), o indutor natural mais provável dessas enzimas deve ser a celulose, contudo, não é possível que uma macromolécula insolúvel possa efetuar a regulação da expressão do gene. BERG e PETTERSSON (1977) demonstraram a necessidade de contato entre o microorganismo e o indutor para que ocorra indução. Tal fato sugere a existência de sítios de reconhecimento na superfície da célula, que apresenta indução. VAHERI *et alii* (1979) demonstraram a existência de celulase constitutiva livre e associada à célula através da determinação de baixos níveis dessa atividade enzimática. GONG e TSAO (1979) idealizaram um modelo para regulação da biossíntese das celulasas, análogo àquele descrito para β -galactosidase de *E. coli*. Segundo esse modelo, a expressão dos genes da endoglucanase e celobioidrolase é controlada pelo mesmo sítio regulador, e ambas estão sujeitas à indução e repressão simultâneas, enquanto que a celobiose é regulada por outro mecanismo. O indutor potencial é a celobiose, que entra na célula por transporte ativo, após ação da celulase basal sobre a celulose. A indução ocorre quando a proteína repressora for inativada pelo indu

tor, seguindo-se a transcrição, tradução e posterior liberação das enzimas produzidas através da membrana celular, cujo processo pode ser regulado por um mecanismo específico. A atividade celulólitica foi detectada por KUBICEK (1981) no citossol, paredes celulares e extrato de cultura de *Trichoderma reesei*. Segundo o autor, 85% da massa de enzima está ligada à parede celular, durante a fase de crescimento, ocorrendo maior excreção na fase estacionária. ROSS *et alii* (1983) propuseram, então, outro modelo para produção e excreção das enzimas celulóliticas do *T. reesei* QM 9414, semelhante ao modelo de GONG e TSAO (1979), exceto que o aparecimento das celúlases não foi considerado como uma consequência da regulação de sua síntese, mas da regulação do transporte ativo dessas enzimas. Tais autores admitem que a aparente repressão da síntese de celulase pode ser uma inibição da atividade ou repressão da síntese da permease, responsável pelo transporte ativo das celúlases. Segundo MERIVUORI *et alii* (1985) as enzimas sintetizadas pelo *Trichoderma* em meio com celulose foram localizadas no retículo endoplasmático e em vesículas de secreção. A sequência dos eventos envolvidos na secreção de enzimas tem sido estudada em levedura, nas quais o peptídeo primário e carboidrato essencial são sintetizados no retículo endoplasmático. Os demais carboidratos são subsequentemente adicionados no complexo de Golgi, seguindo-se o armazenamento em vesículas de secreção, que se movem até a membrana plasmática, onde se fundem, liberando-as para o meio externo.

2.3.2. Genética e melhoramento para produção de celulas

O estudo genético de microorganismos celulolíticos tem despertado grande interesse, não só com finalidades básicas, concernentes aos mecanismos de síntese, regulação e excreção dessas enzimas, mas também, com finalidades aplicadas, que objetivam a otimização de processos enzimáticos de degradação de materiais celulósicos em escala industrial. A complexidade dos mecanismos de regulação das enzimas celulolíticas permite que se efetuem vários tipos de alterações a fim de se obter linhagens de alta produção. Segundo MONTENECOURT *et alii* (1979), para melhoramento dessas linhagens, devem ser consideradas sete linhas principais, incluindo a seleção de mutantes resistentes à repressão catabólica (desreprimidos), mutantes resistentes a antimetabólitos, mutantes cujas características permitam sua aplicação prática em fermentadores, linhagens de alta produção revertentes de mutantes celulase-negativos, mutantes resistentes ao produto final, mutantes para secreção dessas enzimas e mutantes constitutivos.

A indução de mutação e seleção de mutantes têm produzido resultados favoráveis, e a maioria dos trabalhos realizados envolve o gênero *Trichoderma*. BISARIA e GHOSE (1981) apresentaram os vários mutantes de *Trichoderma*

desenvolvidos em programas de melhoramento genético, a partir da linhagem selvagem de *T. reesei* QM 6a, que produz pouca celulase devido às restrições de controle genético e metabólico. O primeiro mutante obtido nesse programa foi o QM 9123; capaz de secretar duas vezes mais celulase que a linhagem QM 6a (MANDELS *et alii*, 1971). Nessa etapa, também foi isolado o mutante QM 9136, incapaz de utilizar celulose como fonte de carbono, o qual não produziu linhagens revertentes, quando submetido a agentes mutagênicos (MONTENECOURT *et alii*, 1979). A partir da linhagem de *T. reesei* QM 9123, por aceleração linear, obteve-se o mutante QM 9414 que, segundo RYU e MANDELS (1980), produziu o dobro da atividade sobre papel de filtro e β -glicosidase apresentada pela linhagem parental QM 6a. NEVALAINEN *et alii* (1980) obtiveram um mutante desreprimido, o VTT-D-78085, por tratamento do *T. reesei* QM 9414 com NTG, observando um aumento de 2 a 3 vezes na atividade celulolítica, e de mais de 6 vezes na atividade β -glicosidase, quando comparado ao QM 9414, num processo de fermentação em escala piloto. GHOSH *et alii* (1982), expondo QM 9414 à radiação ultra-violeta, obtiveram uma linhagem superior, a qual denominaram M-65. Essa linhagem tratada com NTG deu origem a uma série de mutantes hiperprodutores, D-1, parcialmente resistentes a repressão catabólica. Um derivado da série D-1, obtido após tratamento com NTG e luz ultra-violeta, o D-1-6, apresentou atividade sobre papel de filtro 3 vezes maior que o QM 9414. Ainda utilizando como linhagem parental *T. reesei*

QM 9414, MISHA e GOPALKRISHNAN (1984) isolaram o mutante constitutivo C-5, que produziu todas as enzimas do complexo celololítico em meios contendo uma ampla variedade de açúcares solúveis não indutores. Nesse mutante, a β -glicosidase era inteiramente constitutiva, enquanto que as atividades sobre papel de filtro e endoglucanase eram, apenas parcialmente, constitutivas, sugerindo uma regulação independente dessas enzimas.

Outra série de mutantes obtidos a partir da linhagem de *T. reesei* QM 6a compreendendo os mutantes NG-14 e MCG 77, apresentou maior produtividade celololítica, mas ainda sujeita à repressão catabólica. A linhagem NG-14 produziu o dobro da atividade específica sobre papel de filtro, quando comparada ao QM 9414, e, também, apresentou aumento na produção de endoglucanase e β -glicosidase (MONTENECOURT e EVELEICH, 1977a). A linhagem C-30, isolada a partir de NG-14, apresentou praticamente a mesma atividade sobre papel de filtro, quando cultivada em meio contendo apenas celulose como fonte de carbono e quando em presença de glicerol ou glicose, sendo, portanto, resistente à repressão catabólica. MONTENECOURT *et alii* (1980) demonstraram, através de imuno-precipitação quantitativa, que os mutantes NG-14 e C-30 apresentavam maior proporção de celobioidrolase. Tanto C-30, quanto NG-14 apresentaram uma atividade celololítica 15 a 20 vezes maior que a linhagem QM 6a e maior excreção de endoglucanase e celobiase (GHOSH *et alii*, 1984). SCHIMENTI *et alii* (1983) isola-

ram mutantes de *T. reesei*, a partir das linhagens QM 6a e C-30, que apresentavam resistência à nistatina e aumento na produção de celulasas. Isso confirmou o conceito de que maior liberação de enzimas pode ocorrer devido à interferência na função da membrana, como resultado de uma mutação pleiotrófica. Alguns dos mutantes hipercelulolíticos, resistentes à nistatina, derivados da linhagem C-30 apresentaram-se instáveis, revertendo a produção de enzimas a níveis basais. MORIKAWA *et alii* (1985) isolaram uma colônia de *T. reesei* QM 9414 que denominaram KY 746, a partir da qual, através de irradiação ultra-violeta, obtiveram N-25 e N-26. Esses mutantes tratados com NTG deram origem a K-14 e J-37, respectivamente. O mutante K-14 submetido a um tratamento sucessivo com o mesmo mutagênico deu origem a outros dois mutantes: o KDR-11 e KDR-27. Todos os mutantes citados apresentaram maior produção de celulasas que o KY 746. KAWAMORI *et alii* (1985) desenvolveram uma técnica que permitiu isolar mutantes resistentes à repressão catabólica. A partir do mutante KDR-11, por tratamento com o mesmo mutagênico, foi isolado o KDD-10 em meio contendo celulose e glicose. De modo similar, foi obtido KDG-12, a partir de KDR-27, em meio com celulose e glicerol. Esse mutante submetido ao mesmo mutagênico produziu DGD-16, isolado em meio contendo celulose e glicose. KDD-10 e DGD-16 produziram, inicialmente, CMCase em presença de glicose residual e, no final, apresentaram 1,5 vezes mais atividade CMCase em cultura de avicel e glicose, que em meio de avicel, somente,

sugerindo desrepressão pela glicose para produção de celulas nesses mutantes. Nesse mesmo programa de melhoramento, KAWAMORI *et alii* (1986) obtiveram através do tratamento do mutante KDG-12 com NTG, a linhagem PC-3-7, que apresentou maior indução de celulas por sorbose. Pelo tratamento de PC-3-7 com NTG foi obtido um mutante com maior atividade β -glicosidase, que submetido ao mesmo tratamento deu origem a CDU-11, um hiperprodutor de β -glicosidase. Uma cultura dessa linhagem produziu cerca de 3 vezes mais β -glicosidase que a do parental KY 746. Como consequência, foi verificado que a sacarificação de avicel ou bagaço pré-tratado com solução alcalina pelo sistema celulolítico de CDU-11, foi muito mais eficiente que pelo complexo de outras linhagens. A técnica de indução de mutação tem produzido resultados favoráveis também com outros fungos celulolíticos como *Termonospora curvata* (FENNINGTON *et alii*, 1982 e 1984); *Talaromyces emerso*n*ii* (MOLONEY *et alii*, 1983), *Sporotrichum pulverulentum* (ERIKSSON e JOHNSRUD, 1983), *Alternaria alternata* (MACRIS, 1984), *Penicillium funiculosum* (JOGLEKAR e KARANTH, 1984) entre outros.

Atualmente, técnicas mais modernas de engenharia genética vêm sendo utilizadas no melhoramento de fungos celulolíticos. Nesse sentido, TOYAMA *et alii* (1984) empregaram a técnica de fusão de protoplastos em *T. reesei*, usando o mutante não produtor QM 9136 e o hiperprodutor QM 9414, isolan

do diversos produtos de fusão. Um dos clones apresentou o dobro da atividade CMCase em relação ao QM 9414, o que sugere a possibilidade de se utilizar essa técnica na recombinação de outras linhagens celulolíticas. MANCZINGER e FERENCZY (1985) também obtiveram recombinantes de *T. reesei* QM 9414 através de fusão de protoplastos, confirmando que esta técnica pode ser aplicada em programas de melhoramento genético para fins industriais. A clonagem gênica também vem sendo ensaiada em fungos celulolíticos. GILKES *et alii* (1984) clonaram os genes determinantes dos componentes do complexo celulolítico de *Cellulomonas fimi* em *E. coli* e constatarem a expressão desses genes em 3 grupos de clones isolados. Os clones do segundo grupo continham plasmídios com inserção de 5,0 Kb, apresentaram-se fracamente antigênicos, mas com altos níveis de atividade CMCase. A análise de restrição de mostrou que os 3 grupos codificavam celulasas diferentes, que, possivelmente, atuariam de forma complementar. Em trabalho mais recente, ARSDELL *et alii* (1987) relataram a clonagem, caracterização parcial e expressão do gene, responsável pela produção da endoglucanase I de *T. reesei* em *Saccharomyces cerevisiae*. A sequência que codifica a proteína completa foi inserida em um plasmídio que contém os genes que regulam a transcrição em leveduras. As colônias de leveduras transformadas com esse plasmídio secretaram endoglucanase I hiperglicosilada e enzimaticamente ativa. Essa glicosilação exce

dente foi associada à maior resistência da enzima à inativação térmica. A tecnologia do DNA recombinante tem se mostrado útil no estudo dos aspectos básicos de síntese, regulação e excreção dessas enzimas e, é possível que a clonagem de genes permita a construção de linhagens hiperprodutoras através de um sistema enzimático originado de dois ou mais organismos diferentes, objetivando melhorar os processos de conversão da biomassa celulósica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagem utilizada

A linhagem utilizada no presente trabalho foi isolada de compostagem no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (MG) por CHAVES (1982). Posteriormente, esse fungo foi classificado como *Humicola* sp.

3.2. Manutenção das linhagens

A linhagem selvagem e os mutantes de *Humicola* sp foram mantidos em laboratório através de repiques periódicos em meio completo. O inóculo foi cultivado por uma semana a 40-42°C e, posteriormente, estocado em geladeira, até um pe

período máximo de um mês.

3.3. Esterilização e incubação

Os meios de cultura e as soluções foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a uma atmosfera de pressão.

A temperatura de incubação foi de 40-42°C em todos os experimentos. Exceto quando mencionado, os esporos utilizados apresentaram-se com 7 dias de cultivo em meio completo.

3.4. Meio de cultura utilizados

3.4.1. Meio mínimo (PONTECORVO *et alii*, 1953)

Nitrato de sódio, 6,0 g; dihidrogeno fosfato de potássio, 1,5 g; cloreto de potássio, 0,5 g; sulfato de magnésio hepta-hidratado, 0,5 g; sulfato de ferro II, traços; sulfato de zinco, traços; glicose, 10,0 g; ágar, 15,0 g e água destilada até completar 1.000 ml. O pH do meio foi ajustado a 6,8 com solução de hidróxido de sódio, sendo o mesmo, posteriormente, autoclavado e conservado à temperatura ambiente.

3.4.2. Meio completo (PONTECORVO *et alii*, 1953, modificado por AZEVEDO e COSTA, 1973)

O meio completo constituía de meio mínimo adicionado de: peptona, 2,0 g; caseína hidrolisada, 1,5g; extrato de levedura, 0,5 g; solução de vitaminas, 1,0 ml e água destilada até completar 1.000 ml. O pH do meio foi ajustado a 6,8 com solução de hidróxido de sódio, sendo, posteriormente, autoclavado e conservado à temperatura ambiente.

3.4.3. Meio de farelo de trigo (YOSHIOKA *et alii*, 1982)

Farelo de trigo, 5,0 g e água de torneira, 5,0 ml. O meio foi autoclavado e conservado à temperatura ambiente.

3.4.4. Meio de farinha de aveia (LARPENT e LARPENT-GOURGAUD, 1975)

Farinha de aveia, 4,0 g; ágar, 2,0 g e água destilada até completar 100,0 ml. O meio foi distribuído em tubos, sendo estes autoclavados e, posteriormente, inclinados.

3.4.5. Meio YPSs ágar (Emerson², citado por COONEY e EMERSON, 1964, modificado)

Extrato de levedura, 4,0 g; hidrogeno fosfato de potássio, 1,0 g; sulfato de magnésio hepta-hidratado, 0,5 g; celulose, 15,0 g; ágar, 20,0 g; água de torneira, 250,0ml e água destilada, 750,0 ml. O meio foi autoclavado e conservado à temperatura ambiente.

3.5. Soluções utilizadas

3.5.1. Solução A

Solução de carbonato de sódio 2,0%, 100,0 ml; solução de hidróxido de sódio 10,0%, 10,0 ml; solução de tartarato de sódio e potássio 2,7%, 1,0 ml e solução de sulfato de cobre 1,0%, 1,0 ml. A solução foi preparada por homogenização de seus componentes, pouco antes de ser utilizada.

3.5.2. Solução de ácido dinitro salicílico (DNS)

Ácido 3,5-dinitro salicílico, 1,0 g; tartarara

² EMERSON, R., 1941. An experimental study of the life cycles and taxonomy of Allomyces. *Lloydia*, 4: 77-144.

to de sódio e potássio, 30,0 g; solução de hidróxido de sódio 2N, 20,0 ml e água destilada até completar 100,0 ml. Os reagentes foram dissolvidos e a solução conservada em frasco escuro à temperatura ambiente.

3.5.3. Solução de ácidos nucleicos

Solução C: ácido nucleico de leveduras, 2,0 g em 15,0 ml de ácido clorídrico 1N.

Solução D: ácido nucleico de leveduras, 2,0 g em 15,0 ml de hidróxido de sódio 1N.

As soluções foram aquecidas em banho-maria por 20 minutos, misturadas e o pH ajustado a 6,0 com solução de hidróxido de sódio. Essa solução foi, então, diluída a 40,0 ml com água destilada, esterilizada e conservada em frasco escuro no refrigerador.

3.5.4. Solução de albumina

Solução de albumina 50% (v/v) em glicerina, preparada com clara de ovo filtrada. Conservou-se em refrigerador.

3.5.5. Solução de amino-ácidos

Caseína hidrolizada, 0,1 g em 10,0 ml de água destilada esterilizada. A solução foi preparada em frasco esterilizado, aquecida em banho-maria por 20 minutos e, poster

riormente, conservada em refrigerador.

3.5.6. Solução B

Solução de carbonato de sódio 2,0% em hidróxido de sódio 0,1N, 100,0 ml; solução de sulfato de cobre II 1,0%, 1,0 ml e solução de tartarato de sódio e potássio 1,0%, 1,0 ml. A solução foi preparada por homogenização de seus componentes, pouco antes de ser utilizada.

3.5.7. Solução de desoxicolato de sódio

Desoxicolato de sódio 8,0% (p/v) em água destilada, autoclavada e mantida em refrigerador.

3.5.8. Solução de Giemsa

Giemsa, 1,0 g; glicerina, 66,0 ml e metanol, 66,0 ml. A solução foi preparada pela dissolução de Giemsa em glicerina a 60°C e após resfriamento, à temperatura ambiente, foi adicionado metanol. Filtrou-se e conservou-se a solução à temperatura ambiente.

3.5.9. Solução salina

Cloreto de sódio 0,9% (p/v) em água destilada. A solução foi autoclavada e distribuída em frascos esterilizados (9,0 ml por frasco).

3.5.10. Solução de tween 80

Tween 80 (sorbitan monooleato de polioxietileno) 0,1% (v/v) em água destilada. Alíquotas de 2,5 ml da referida solução foram colocadas em tubos de ensaio, que, posteriormente, foram autoclavados e conservados em refrigerador.

3.5.11. Solução de vitaminas

Ácido nicotínico, 100,0 mg; ácido p-amino benzóico, 10,0 mg; biotina, 0,2 mg; piridoxina, 50,0 mg; riboflavina, 100,0 mg e tiamina, 50,0 mg. A solução foi colocada em banho-maria por 20 minutos e, posteriormente, conservada em frasco escuro no refrigerador, sob clorofórmio.

3.6. Crescimento em meio de cultura

3.6.1. Avaliação do crescimento em meio completo

A linhagem *Humicola* sp, em estudo, apresentou bom crescimento e esporulação no meio completo descrito por PONTECORVO *et alii* (1953), mas como nesse meio não foi possível identificar colônias provenientes de esporos individuais, foram ensaiados os seguintes redutores de crescimento: oxgall, rosa de bengala, sorbose, desoxicolato de sódio e citrato de sódio, em diferentes concentrações. Todos foram adicionados ao meio completo de composição normal, com exceção da sorbose que substituiu parcialmente a glicose, cuja con

centração foi reduzida a 0,050%. Para tanto, esporos do referido fungo foram inoculados no centro de placas, contendo meio completo com diferentes agentes redutores. Foram utilizadas 10 repetições para cada concentração. Após 96 horas de incubação, mediu-se o diâmetro das colônias, calculando-se a porcentagem de redução em relação ao meio completo sem redutor. Uma suspensão de esporos, adequadamente diluída, foi semeada nesses meios, utilizando-se 10 repetições para cada concentração. Após 96 horas de incubação, procedeu-se a contagem de colônias, calculando-se a porcentagem de sobrevivência em relação ao número de colônias que cresceram em meio completo.

3.6.2. Avaliação do crescimento em meio mínimo

A obtenção e caracterização de mutantes auxotróficos exige o conhecimento do meio mínimo requerido pela linhagem de *Humicola* sp utilizada. Neste sentido, foi ensaiado o meio mínimo para esse fungo, utilizando-se a técnica da auxanografia (PONTECORVO *et alii*, 1953) a fim de se determinar seu(s) requisito(s) nutricional(is). Esporos do fungo foram então inoculados em placas contendo meio mínimo adicionado de solução de vitaminas, de solução de aminoácidos ou de solução de ácidos nucleicos.

A mesma técnica foi, posteriormente, utilizada na caracterização das exigências para as vitaminas biotina, ácido p-aminobenzóico, riboflavina, nicotinamida, tiamina e

piridoxina, além de combinações dessas vitaminas, duas a duas e três a três.

A viabilidade de esporos desse fungo no meio mínimo definido por inoculação de ponto foi, também, ensaiada através de semeadura.

3.7. Tratamento com mutagênicos

3.7.1. Tratamento com ácido nitroso (SIDDIQI, 1962)

Os esporos de *Humicola* sp foram transferidos para solução de tween 80, e após serem desagregados por agitação, e estimada a sua concentração em câmara de Neubauer, adicionou-se tampão acetato pH 4,4 e solução de nitrito de sódio 0,5M. O controle foi feito do mesmo modo, exceto a adição de nitrito de sódio, como segue:

	Tratamento	Controle
Volume de solução de nitrito de sódio 0,5M	0,33 ml	-
Volume de solução tampão acetato pH 4,4	9,17 ml	9,50 ml
Volume de suspensão de esporos em tween 80	0,50 ml	0,50 ml
Volume total	10,00 ml	10,00 ml

Os frascos "tratamento" e "controle" foram mantidos a 37°C, em banho-maria, durante o experimento. O tratamento foi interrompido, em diferentes intervalos de tempo, pela transferência de amostras para frascos contendo tampão

fosfato pH 7,0. Foram feitas diluições convenientes em solução fosfato, e amostras de 0,1 ml foram semeadas em placas com meio completo adicionado de citrato de sódio 0,700%. Após 72 horas de incubação, procedeu-se a contagem das colônias, estimando-se o número de esporos viáveis por mililitro. As porcentagens de sobrevivência foram calculadas em relação ao controle considerado como 100,00% de sobrevivência. Através da representação gráfica do tempo de tratamento contra porcentagem de sobrevivência, determinou-se o tempo correspondente a, aproximadamente, 5,00% de sobrevivência.

3.7.2. Tratamento com etil metano sulfonato (RO-SATO, 1973)

Esporos de *Humicola* sp foram suspensos em solução de tween 80, sendo sua concentração estimada em câmara de Newbauer. Posteriormente, dividiu-se a suspensão em duas porções: uma de 2,0 ml e a outra de 1,0 ml. À porção de 2,0 ml adicionou-se 4,0 ml de solução de 2,2-bis (etilsufonil) butano (EMS) 2,0% (v/v) de modo a atingir uma concentração aproximada de 1,3% (v/v). A suspensão foi colocada em banho a 28°C, retirando-se amostras em intervalos de tempo adequados e transferindo-as para frascos contendo solução salina. Diluições adequadas, efetuadas para diminuir a concentração do mutagênico e possibilitar a formação de colônias isoladas, foram semeadas em meio completo com citrato de sódio 0,700%.

Na outra porção adicionou-se 2,0 ml de água destilada esterilizada (tempo zero). Após 72 horas de incubação, procedeu-se a contagem das colônias, estimando-se o número de esporos viáveis por mililitro, e a porcentagem de sobrevivência para cada tempo de tratamento. As colônias resultantes da porção que não sofreu tratamento foram consideradas como testemunha, com nível de 100,00% de sobrevivência. A seguir, plotou-se a curva tempo de tratamento contra porcentagem de sobrevivência e determinou-se graficamente o tempo correspondente a 5,00% de sobrevivência.

3.7.3. Tratamento com luz ultra-violeta

Esporos de *Humicola* sp transferidos para uma solução de tween 80, após agitação, tiveram sua concentração estimada em câmara de Newbauer. Após diluição de 1 para 10 com solução salina, retirou-se uma amostra (tempo zero), sendo o restante transferido para uma placa de Petri esterilizada, a fim de ser submetido à irradiação ultra-violeta (Mineralight, 50-60 CVC, 60 amps.).

O experimento foi realizado em ambiente de luz difusa, e o material colocado a 12,5 cm da fonte, previamente aquecida por 15 minutos. O tratamento foi interrompido em intervalos de tempo adequados, realizando-se diluição apropriada da amostra retirada, e semeando em meio completo com citrato de sódio 0,700%. Após 72 horas de incubação proce

deu-se a contagem de colônias, estimando-se o número de esporos viáveis por mililitro. Calculou-se a porcentagem de sobrevivência, em diferentes intervalos em relação ao controle (tempo zero), considerado como 100,00% de sobrevivência. Através da curva de sobrevivência determinou-se, graficamente, o tempo de tratamento correspondente a 5,00% de sobrevivência.

3.7.4. Tratamento com radiação gama

O tratamento foi conduzido, preparando-se uma suspensão de esporos de *Humicola* sp em tween 80, cuja concentração foi estimada em câmara de Newbauer. Em seguida, distribuiu-se a suspensão em frascos com solução salina, os quais foram submetidos a diferentes doses de radiação gama, (taxa de dose 396 Krad/h), emitida por uma fonte de ^{60}Co (tipo Gammabeam - 650, da Atomic Energy of Canada Ltd, Ottawa, Canada), usando-se duas repetições para cada dose. Após tratamento, foram feitas diluições adequadas de cada suspensão com solução salina, sendo então semeadas em placa, contendo meio completo com citrato de sódio a 0,700%. As placas foram incubadas por, aproximadamente 72 horas, procedendo-se, então, a contagem do número de colônias. Calculou-se a porcentagem de sobrevivência nas diferentes doses, tomando-se como 100,00% as colônias obtidas da suspensão que não sofreu tratamento. Através da curva de sobrevivência, determinou-se a dose correspondente a 5,00% de sobrevivência.

3.8. Isolamento e caracterização de mutantes morfológicos

Suspensões de conídios da linhagem de *Humicola* sp tiveram sua concentração estimada em câmara de Newbauer , sendo, então, preparadas, adequadamente, para tratamento com os diferentes agentes mutagênicos estudados (ácido nitroso, etil metano sulfonato, luz ultravioleta ou radiação gama). Após tratamento pelo tempo ou dose correspondente a 5,00% de sobrevivência, amostras de cada suspensão foram semeadas em meio completo com 0,700% de citrato de sódio ou sorbose 0,750%. Mutantes morfológicos foram selecionados através da observação visual das colônias e transferidos para meio completo sem redutor. Após crescimento e confirmação da alteração morfológica, cada colônia foi inoculada 5 vezes em meio completo numa tentativa de observar sua estabilidade. Foram selecionadas as colônias mais estáveis, que se apresentaram facilmente distinguíveis da linhagem selvagem.

As características culturais das linhagens de morfologia alterada foram observadas em meio completo, após 7 dias de incubação a 40-42°C. Realizaram-se avaliações quanto à cor do micélio aéreo, cor dos esporos, formato da colônia, intensidade de esporulação, presença de setores e zonação. A cor dos esporos e intensidade de esporulação foram avaliadas através de observação em microscópio ótico. Classificou-se a cor do micélio segundo o sistema de notação de MUNSSELL (1976) e as colônias selecionadas foram fotografadas.

3.9. Isolamento e caracterização de mutantes auxotróficos **(TINLINE, 1961; PONTECORVO *et alii*, 1953)**

Suspensões de esporos da linhagem selvagem, de concentração apropriada, foram submetidas a tratamentos com os mutagênicos estudados segundo o tempo ou dosagem adequados e semeadas em meio completo com 0,700% de citrato de sódio. Após crescimento, as colônias foram transferidas para meio completo sem redutor e, novamente, incubadas. Cerca de seis extremidades diferentes de cada uma dessas colônias foram transferidas para meio mínimo suplementado com biotina e tiamina. Os inóculos que não cresceram nesse meio foram recuperados em meio completo e, posteriormente, caracterizados quanto ao seu requerimento nutricional através da técnica auxanográfica.

3.10. Técnica citológica (TANAKA *et alii*, 1979)

Foram realizadas observações citológicas das linhagens de *Humicola* sp quanto a divisão nuclear em conídios e em células somáticas do micélio, e contagem do número de núcleos em células conidiais. Para o estudo da divisão nuclear em células jovens, cultivou-se a linhagem selvagem por 3 a 4 dias a 40-42°C, enquanto que para as demais observações foram utilizadas colônias de 7 dias de cultivo.

Esporos das referidas linhagens foram aderidos às lamínulas através de solução de albumina, utilizando-se,

para fixação, solução de álcool etílico-ácido-acético 3:1, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. A hidratação foi efetuada por tratamento sucessivo em álcool 95,0% e 70,0% , procedendo-se, em seguida, a hidrólise em ácido clorídrico 1N a 60°C, por 10 a 12 minutos. Os espécimes foram corados por imersão em solução de Giemsa, diluída de 1 para 5 com tampão fosfato 0,07M pH 7,0, durante 20 a 30 minutos. O excesso de corante foi retirado por lavagem com o mesmo tampão. Para observações microscópicas, foi utilizado Microscópio Olympus, modelo BHS, associado ao sistema fotomicrográfico Olympus modelo PM-10AD, quando necessário.

3.11. Complementação entre mutantes morfológicos

A inoculação de dois ou mais mutantes morfológicos, na mesma placa contendo meio completo, muitas vezes apresentou, no limite de crescimento entre eles, morfologia semelhante àquela da linhagem selvagem. Essa capacidade de complementação morfológica foi, então, ensaiada entre todos os pares de combinações possíveis dos mutantes morfológicos selecionados. Com o objetivo de se fazer uma possível distinção entre sintrofismo e heterocariose, um inóculo da região de morfologia similar à selvagem foi cultivado, por um curto período de tempo. Procedeu-se, também, em alguns casos, a fixação dos espécimes da região de complementação, submetendo-os à mesma técnica de coloração e observação microscópica, os quais foram fotografados.

3.12. Procedimento para estabilização de linhagens

A linhagem selvagem de *Humicola* sp esporula intensamente em meio de aveia. Entretanto, foi constatado que essa linhagem e vários mutantes morfológicos, frequentemente, apresentavam grande variabilidade, quando cultivados no referido meio. Assim, numa tentativa de estabilizar essas linhagens, foram selecionados alguns mutantes morfológicos, por representarem casos extremos de variação do número de núcleos por esporo (mor_{10} e mor_{27}), devido às características coloniais (mor_{21} e mor_{22}) e por se apresentarem, morfolologicamente, estáveis em meio de aveia (mor_4 e mor_{13}). O procedimento empregado consistiu na preparação de suspensões de esporos, em tween 80, a partir de colônias de 7 dias de cultivo em meio completo. Após estimativa do número de esporos em câmara de Neubauer, as suspensões foram diluídas em solução salina e semeadas em placas contendo meio YPSs, de modo a se obter 15 a 20 colônias por placa. Depois de cultivadas por 4 - 5 dias, isolaram-se extremidades das colônias que apresentaram melhor crescimento nesse meio, transferindo-as para tubos contendo meio de aveia. Em seguida, foi selecionado dentre os isolados de cada uma das referidas linhagens, aquele que apresentava menor variação morfológica. Realizaram-se várias reinoculações sucessivas desses isolados em meio de farinha de aveia até se obter colônias, morfolologicamente, homogêneas.

3.13. Cultivo em meio semi-sólido (YOSHIOKA *et alii*, 1982)

A linhagem selvagem e aquelas de morfologia alterada selecionadas foram cultivadas em meio semi-sólido para determinação das atividades enzimáticas. A partir de colônias crescidas em meio de farinha de aveia, durante 7 dias a 40-42°C, prepararam-se suspensões aquosas contendo, aproximadamente, 10^6 a 10^7 esporos por mililitro, as quais foram inoculadas em meio de farelo de trigo. Após 4 dias de cultivo foi efetuada a extração das enzimas, por adição de água gelada esterilizada. O sobrenadante foi separado por filtração e utilizado como fonte de enzimas extracelulares. Foram utilizadas quatro repetições por linhagem.

3.14. Ensaio enzimáticos

Métodos colorimétricos foram usados para determinação das atividades enzimáticas e dosagem de proteína. O equipamento utilizado foi um Espectrofotômetro Micronal B-382. Em todos os casos empregou-se o método dos quadrados mínimos, e um coeficiente de correlação acima de 0,90 foi considerado necessário para validade da análise. A Figura 1 descreve as retas padrões utilizadas na determinação das atividades enzimáticas e dosagem de proteínas.

3.14.1. Determinação da atividade celulolítica

A atividade exoglucanase (avicelase) foi de terminada, utilizando celulose microcristalina (Avicel - RIEDEL de HAËN) como substrato, enquanto que para determinação da atividade endoglucanase (carboximetilcelulase - CMCase), uti lizou-se, como substrato, carboximetilcelulose - CMC (tipo CM-23-FLUKA A.G.). A 50,0 mg de substrato, adicionou-se tampão acetato de sódio 0,05M pH 5,0 e extrato aquoso da cultura, de modo a completar o volume a 5,0 ml. Incubou-se a mistura a 50°C e, nos intervalos de tempo apropriados, interrompeu-se a reação por adição de 1,0 ml do reagente DNS. O substrato não hidrolisado foi separado por centrifugação, e, a seguir, determinado o teor de açúcares redutores liberados, submetendo a mistura de reação a banho-maria, por 5 minutos. Após resfriamento diluiu-se com 10,0 ml de água e procedeu-se a leitura de absorbância a 540 nm contra o branco (MILLER, 1959).

A glicose foi utilizada como padrão (Figura 1-A), e a atividade enzimática expressa como número de atividades por miligrama de proteínas totais. Definiu-se unidade enzimática como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de açúcar redutor, por hora, nessas condições.

3.14.2. Determinação da atividade β -glicosidase

Para determinação da atividade β -glicosidase

(salicinasase), utilizou-se como substrato 0,5 ml de solução de salicina 1% em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0. O extrato aquoso da cultura, adequadamente diluído, foi adicionado de modo a completar o volume a 1,0 ml, incubando-se, a seguir, a mistura de reação a 50°C. Em intervalos de tempo adequados, interrompeu-se a reação, por adição de 1,0 ml do reagente DNS, e o produto formado foi quantificado como anteriormente descrito. Utilizou-se, também, glicose como padrão (Figura 1-A), e expressou-se a atividade como número de atividades por miligrama de proteínas totais. Definiu-se a unidade enzimática como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de açúcar redutor, por minuto.

3.14.3. Determinação da atividade amilase

A atividade amilolítica foi medida com base na quantidade de açúcar redutor liberado, a partir de uma solução de amido 1% em cloreto de sódio 0,005 M e tampão fosfato 0,010 M pH 6,9. Adicionou-se o extrato aquoso da cultura apropriadamente diluído, de modo a completar o volume de reação a 1,0 ml, e incubou-se o sistema reagente a 50°C. Interrompeu-se a reação, em intervalos de tempo apropriados, e os açúcares redutores foram quantificados pelo método do DNS, utilizando maltose como padrão (Figura 1-B).

Expressou-se a atividade enzimática, em termos do número de atividades por miligrama de proteínas totais,

sendo que uma unidade foi definida como a quantidade de enzima que cataliza a formação de $1 \mu\text{mol}$ de açúcares redutores por minuto.

3.14.4. Determinação da atividade protease neutra (McDONALD e CHEN, 1965)

A atividade protease foi analisada por incubação de 2,0 ml de solução de caseína 1,0% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 com 2,0 ml de solução diluída do extrato aquoso da cultura, a 50°C . Em intervalos de tempo adequados, interrompeu-se a reação, por precipitação das proteínas, com solução 10,0% de ácido tricloro acético. A 1,0 ml do sobrenadante adicionou-se 5,0 ml de solução A e, após 10 minutos, 0,5 ml do reagente Folin Ciocalteau diluído de 1:1 com água destilada. Decorrida 1 hora, procedeu-se a leitura da absorbância a 700 nm contra o branco.

Utilizou-se uma solução de tirosina de concentração apropriada (TYR) como padrão (Figura 1-C). Expressou-se a atividade proteolítica em função da massa total de proteínas em miligramas, sendo que uma unidade foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir $1 \mu\text{g}$ de tirosina por minuto a 50°C .

3.15. Dosagem de proteína (LOWRY *et alii*, 1951)

A concentração de proteínas extracelulares totais, presentes no filtrado de cultura, foi determinada, usando soroalbumina bovina (SAB) como padrão (Figura 1-D). Para dosagem, foram tomadas alíquotas do extrato aquoso da cultura, adequadamente diluído, completando-se o volume a 1,0 ml com água destilada. Em seguida, adicionou-se 5,0 ml da solução B, e, após 15 minutos, foi acrescentado 0,5 ml do reagente de Folin Ciocalteu diluído de 1:1 com água destilada. Decorridos 30 minutos, procedeu-se a leitura da absorbância a 660 nm contra o branco.

3.16. Tratamento estatístico.

As análises estatísticas dos resultados das determinações de atividades enzimáticas foram realizadas segundo um delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições. As análises de variâncias obedeceram a um modelo matemático de efeitos fixos e as médias foram comparadas através do teste de Tukey.

Estimou-se a existência de associação entre as diferentes atividades enzimáticas através do cálculo do coeficiente de correlação.

Figura 1 - Retas padrões utilizadas para determinação das atividades enzimáticas (r - correlação; a - intercepto; b - inclinação).

4. RESULTADOS

4.1. Determinação de meios de cultivo adequados para crescimento

4.1.1. Determinação dos redutores de crescimento em meio completo

Foram ensaiados 5 agentes redutores, conforme descrito no item 3.6.1., em 4 concentrações diferentes, estimando-se a porcentagem de redução e a porcentagem de sobrevivência em relação ao meio completo, isento de tais substâncias. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Porcentagem de redução do diâmetro de colônias de *Humicola* sp e porcentagem de sobrevivência em relação ao meio completo

REDUTOR	CONCENTRAÇÃO % (p/v)	% DE REDUÇÃO	% DE SOBREVIVÊNCIA
Citrato de Sódio	0,400	32,6	100,0
	0,700	70,1	100,0
	1,000	91,3	100,0
	1,300	95,4	100,0
Desoxicolato de Sódio	0,040	4,8	100,0
	0,080	66,7	100,0
	0,120	100,0	0,1
	0,160	100,0	0,0
Oxgall	0,200	61,5	100,0
	0,500	92,7	100,0
	1,000	96,2	100,0
	1,500	99,2	78,1
Sorbose	0,500	56,7	100,0
	0,750	62,2	100,0
	1,000	79,7	94,7
	1,500	81,0	52,5
Rosa de Bengala	0,002	17,7	100,0
	0,005	35,1	96,9
	0,010	55,4	70,8
	0,015	64,6	29,8

4.1.2. Determinação do meio mínimo

Através da inoculação de ponto de esporos de *Humicola* sp, utilizando-se a técnica auxanográfica, foi possível, determinar que biotina e tiaminã eram os requerimentos nutricionais mínimos para esse fungo. No entanto, quando suspensões de esporos desse fungo foram semeadas nesse meio, raramente ocorreu crescimento. Experimentos realizados, separadamente, utilizando suspensões de esporos de diferentes concentrações indicaram que a germinação em meio mínimo é favorecida com o aumento do número de esporos na suspensão semeada.

4.2. Sobrevivência a mutagênicos

4.2.1. Sobrevivência dos esporos ao ácido nitroso

Os esporos de *Humicola* sp foram submetidos ao tratamento com ácido nitroso, conforme a técnica descrita no item 3.7.1. Estimou-se a porcentagem de esporos sobreviventes, em cada intervalo de tempo, em relação ao tempo zero. A Tabela 2 apresenta o número e a porcentagem relativa de sobreviventes das três repetições, bem como a porcentagem média em cada tempo.

A Figura 2-A mostra a curva de sobrevivência desse fungo a esse mutagênico. Nas condições do experimento, o tempo de tratamento necessário para se obter 5,00% de sobrevivência, correspondeu a 20 minutos, aproximadamente.

Tabela 2 - Porcentagem de esporos de *Humicola* sp sobreviventes ao ácido nítrico em diferentes tempos de tratamento

Tempo (minutos)	Esporos viáveis/ml			Porcentagem relativa de sobreviventes			Média
	Repetições			Repetições			
	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª	
0	1,54 x 10 ⁵	8,02 x 10 ⁴	1,01 x 10 ⁵	100,00	100,00	100,00	100,00
5	1,04 x 10 ⁵	5,73 x 10 ⁴	6,72 x 10 ⁴	67,53	71,45	66,53	68,50
10	8,05 x 10 ⁴	3,17 x 10 ⁴	5,40 x 10 ⁴	52,27	39,53	53,46	48,42
15	3,97 x 10 ⁴	1,73 x 10 ⁴	2,18 x 10 ⁴	25,78	21,57	21,58	22,98
20	7,70 x 10 ³	4,17 x 10 ³	3,34 x 10 ³	5,00	5,20	3,31	4,50
30	3,08 x 10 ²	2,41 x 10 ²	1,02 x 10 ²	0,20	0,30	0,10	0,20

4.2.2. Sobrevivência dos esporos a etil metano sulfo nato

A linhagem de *Humicola* sp foi submetida ao tratamento com EMS, segundo a metodologia descrita no item 3.7.2. As estimativas do número, e da porcentagem relativa de sobreviventes, em cada tempo de tratamento, estão apresentadas na Tabela 3 e a respectiva curva de sobrevivência, na Figura 2-B. Pode-se observar que o tempo de tratamento que correspondeu a 5,00% de sobrevivência foi de 9,6 horas, aproximadamente.

4.2.3. Sobrevivência dos esporos a luz ultra-violeta

Conforme a técnica descrita no item 3.7.3. foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 4. A Figura 2-C mostra a curva de sobrevivência dos esporos de *Humicola* sp, quando submetidos a esse mutagênico. A dose necessária para se obter 5,00% de sobrevivência, correspondeu a 56 minutos de tratamento, nas condições do experimento.

4.2.4. Sobrevivência de esporos a radiação gama

A linhagem de *Humicola* sp foi submetida à radiação gama, conforme descrito no item 3.7.4. Estimou-se a porcentagem de sobreviventes, em cada dose, em relação ao controle, e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 3 - Porcentagem de esporos de *Humicola* sp sobreviventes a etil metano sulfonato em diferentes tempos de tratamento

Tempo (horas)	Esporos viáveis/ml			Porcentagem relativa de sobreviventes			Média
	Repetições			Repetições			
	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª	
0	4,97 x 10 ⁵	9,85 x 10 ⁵	2,50 x 10 ⁵	100,00	100,00	100,00	100,00
2	3,98 x 10 ⁵	8,28 x 10 ⁵	2,15 x 10 ⁵	80,08	84,06	86,00	83,38
4	2,66 x 10 ⁵	6,50 x 10 ⁵	1,16 x 10 ⁵	53,52	65,99	46,40	55,30
6	1,52 x 10 ⁵	1,97 x 10 ⁵	6,85 x 10 ⁴	30,58	20,00	27,40	25,99
8	7,06 x 10 ⁴	8,80 x 10 ⁴	2,30 x 10 ⁴	14,21	8,93	9,20	10,78
10	2,14 x 10 ⁴	4,16 x 10 ⁴	5,65 x 10 ³	4,31	4,22	2,26	3,60
12	3,33 x 10 ¹	1,77 x 10 ³	2,33 x 10 ²	0,01	0,18	0,09	0,09

Tabela 4 - Porcentagem de esporos de *Humicola* sp sobreviventes a luz ultra-violeta em diferentes tempos de tratamento

Tempo (minutos)	Esporos viáveis/ml			Porcentagem relativa de sobreviventes			Média
	Repetições			Repetições			
	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª	
0	1,36 x 10 ⁵	7,85 x 10 ⁴	1,69 x 10 ⁵	100,00	100,00	100,00	100,00
10	5,67 x 10 ⁴	4,57 x 10 ⁴	9,36 x 10 ⁴	41,69	58,22	55,38	51,76
20	3,45 x 10 ⁴	2,94 x 10 ⁴	3,60 x 10 ⁴	25,37	37,45	21,30	28,04
30	2,28 x 10 ⁴	1,36 x 10 ⁴	2,28 x 10 ⁴	16,76	17,32	13,49	15,86
40	1,58 x 10 ⁴	9,85 x 10 ³	1,71 x 10 ⁴	11,62	12,55	10,12	11,43
50	6,53 x 10 ³	5,85 x 10 ³	1,18 x 10 ⁴	4,80	7,45	6,98	6,41
60	4,08 x 10 ³	4,56 x 10 ³	6,15 x 10 ³	3,00	5,81	3,64	4,15

Tabela 5 - Porcentagem de esporos de *Humicola* sp sobreviventes a diferentes doses de radiação gama

Dose (Krad)	Esporos viáveis/ml			Porcentagem relativa de sobreviventes			Média
	Repetições			Repetições			
	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª	
0	3,97 x 10 ⁴	3,57 x 10 ⁴	1,33 x 10 ⁴	100,00	100,00	100,00	100,00
20	2,30 x 10 ⁴	2,53 x 10 ⁴	7,83 x 10 ³	57,93	70,87	58,87	62,56
40	2,57 x 10 ³	2,37 x 10 ³	1,36 x 10 ³	6,47	6,64	10,22	7,78
60	4,10 x 10 ²	7,25 x 10 ¹	3,50 x 10 ²	1,03	0,20	2,63	1,29
80	2,00 x 10 ¹	5,66 x 10 ⁰	6,67 x 10 ⁰	0,05	0,02	0,05	0,04
100	5,00 x 10 ⁰	3,33 x 10 ⁰	6,25 x 10 ⁰	0,01	0,01	0,05	0,02

A Figura 2-D mostra a curva de sobrevivência dos esporos desse fungo, quando submetidos a esse tratamento. A dose necessária para obtenção de 5,00% de sobrevivência foi correspondente a 49 Krad.

4.3. Características culturais da linhagem selvagem de *Humicola* sp e dos mutantes morfológicos

Para isolamento e caracterização dos mutantes morfológicos, foram seguidas as técnicas descritas nos itens 3.8 e 3.10. Os resultados obtidos quanto aos caracteres considerados para avaliação da morfologia, cor do micélio aéreo, cor dos esporos, forma das colônias, intensidade de esporulação, presença de setores e zonação nas linhagens selecionadas em meio completo, são apresentados na Tabela 6.

As colônias foram isoladas, após tratamento com os diferentes agentes mutagênicos, com exceção de mor_3 , que foi obtido espontaneamente, pois, apresentou morfologia alterada, diferindo da linhagem selvagem, principalmente, quanto a cor do micélio aéreo.

A coloração da colônia foi apresentada de acordo com o sistema MUNSELL (1976) de notação de cores, segundo o qual a cor do meio completo corresponde a 5Y 8,5/4. A linhagem selvagem apresentou, nesse meio, coloração cinza escura, sendo que os mutantes apresentaram gradações de branco a

Figura 2 - Curvas de sobrevivência de esporos de *Humicola* sp, submetidos aos diferentes agentes mutagênicos

Tabela 6 - Características da linhagem selvagem e mutantes morfológicos de *Humicola* sp em meio completo

Colônia	Mutagênico usado	Cor do micélio aéreo	Cor do esporo	Forma da colônia	Esporulação	Presença de setores	Presença de zonação
			1/	2/	3/	4/	4/
sel.	-	5Y 8,5/4	p	N	+++	-	-
mor ₁	U.V.	5Y 8,5/2	b c	N	+	-	+
mor ₂	Y	7,5Y 8,5/2	b	N	++	-	+
mor ₃	-	5Y 9/1	b	N	+++	-	+
mor ₄	Y	7,5Y 9/2	b	N	+++	-	+
mor ₅	Y	5Y centro 8,5/1 anel 8/1	b p	N	++	-	+
mor ₆	Y	centro e anéis 5Y 8/1	b p	N	+	-	+
mor ₇	EMS	5Y 8/2	b p	N	+++	-	-
mor ₈	HNO ₂	5Y 8/2	b p	N	+	-	-
mor ₉	Y	7,5Y centro 8/2 bordo 8/4	b p	N	+	-	-
mor ₁₀	Y	7,5Y 7/4	b p	N	+	-	-
mor ₁₁	U.V.	5Y 5/2	b p	N	++	-	+
mor ₁₂	EMS	5Y 7/4	b p	N	+-	-	-
mor ₁₃	HNO ₂	5Y centro 8,5/2 anel bordo 8/4	b c	N	+-	+	+
mor ₁₄	EMS	5Y centro 7/1 bordo 8/4	b c	N	+	-	+
mor ₁₅	U.V.	5Y 4/1	b p	N	++	-	+
mor ₁₆	HNO ₂	7,5Y 8/2	b c	N	+	-	-
mor ₁₇	EMS	5Y centro 7/1 bordo 8/4	b c	N	++	-	+
mor ₁₈	Y	5Y 5/1	b c	N	+++	-	+
mor ₁₉	Y	5Y 6/2	b c	N	+++	-	+
mor ₂₀	EMS	centro e bordo 7,5Y 6/2 anel 5Y 8,5/1	b c	N	+++	+	+
mor ₂₁	Y	5Y 3/1	c p	C, BI	++	+	+
mor ₂₂	Y	5Y centro 9/1 anéis 7/2	b	C, BA	+-	+	+
mor ₂₃	Y	5Y 4/1	c p	N	+++	-	+
mor ₂₄	EMS	5Y 4/1	b c p	BI	++	+	+
mor ₂₅	EMS	5Y 4/2	c b	BI	++	+	+
mor ₂₆	U.V.	5Y 9/1	b	C, BA	++	-	+
mor ₂₇	HNO ₂	7,5Y 9/2	b	C, BA	++	-	-

1/b branco, c - cinza, p - preto; 2/ N - normal, C - compacta, BA - bordo arredondado, BI - bordo irregular; 3/ +++ abundante, ++ regular + escassa, +- rara; 4/ + presença, - ausência.

preto, embora se verificassem, também, linhagens de coloração verde amarelada, conforme se pode observar na Figura 3. Também podem ser observados, nessa figura, os caracteres, formato de colônia, presença de setores e zonação.

A coloração dos esporos foi classificada como branca, preta ou cinza, de acordo com observações microscópicas (Figuras 7, 8 e 9). A intensidade de esporulação, também, pode ser melhor avaliada através de observações microscópicas, conforme se pode visualizar nessas figuras.

4.4. Obtenção de mutantes auxotróficos

Para isolamento e caracterização dos mutantes auxotróficos, utilizou-se a técnica descrita no item 3.9. Os resultados iniciais indicaram que todos os isolados que não cresciam em meio mínimo suplementado com biotina e tiamina requeriam algum tipo de amino-ácido como suplemento nutricional. Posteriormente, foram caracterizados dois mutantes auxotróficos, de morfologia semelhante à do selvagem, que requeriam metionina como suplemento nutricional. A linhagem de morfologia branca designada mor₄, submetida a tratamento com luz ultra-violeta, também originou um mutante que requeria metionina. Com excessão deste último, os demais foram isolados como extremidades de colônias crescidas, após tratamento com um dos agentes mutagênicos.

Figura 3 - Morfologia da linhagem selvagem de *Humicola* sp e dos mutantes morfológicos

4.5. Observações citológicas

4.5.1. Contagem do número de núcleos

Utilizando a técnica de coloração de núcleos, descrita no item 3.10, foi possível realizar a contagem do número de núcleos por esporo, presentes na linhagem selvagem, e nos mutantes morfológicos selecionados. Em todos os casos foram observados, pelo menos, 250 esporos, conforme mostra a Tabela 7. A média e o erro foram calculados assumindo distribuição desconhecida, se bem que em muitos casos a distribuição se assemelhou à normal, conforme pode-se observar nas Figuras 4, 5 e 6.

O número de núcleos em células conidiais da linhagem selvagem variou de 5 a 18, observando-se uma tendência monomodal na distribuição, sendo 12 a classe mais frequente (Figura 4). Os 27 mutantes selecionados apresentaram um número de núcleos altamente variável (Figuras 7, 8 e 9). Duas das linhagens (mor_3 e mor_4) mostraram padrão de distribuição semelhante a do selvagem. Dezoito mutantes morfológicos apresentaram distribuição monomodal do número de núcleos com pico em 6, metade da quantidade de núcleos da linhagem original. Uma distribuição monomodal com pico em 3 foi observada para o mutante mor_{10} , correspondendo, aproximadamente, a um quarto da quantidade mais frequente, no selvagem. A linhagem mor_5 apresentou distribuição bimodal do número de núcleos

Tabela 7 - Variação do número de núcleos por esporo na linhagem selvagem e mutantes morfológicos de *Humicola* sp

Linha gem	Número de núcleos/esporo																																				Número to tal de es poros ob- servados	Média e erro	
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36			mais de 36
sel.	-	-	-	-	2	9	10	28	19	30	32	64	22	11	9	7	4	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	250	11,03 ± 2,59
mor ₁	-	-	7	31	60	80	42	23	7	8	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	263	6,10 ± 2,82
mor ₂	-	-	-	-	-	11	31	58	101	25	18	6	7	2	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	264	5,98 ± 1,72
mor ₃	-	-	-	-	-	-	-	1	4	15	13	28	34	61	33	24	21	7	3	8	2	2	1	2	2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	268	12,79 ± 3,81
mor ₄	-	-	-	-	-	-	-	1	2	5	13	21	26	32	22	60	19	14	12	7	4	7	1	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	250	11,40 ± 3,06
mor ₅	-	-	-	-	-	-	-	2	13	48	34	34	32	15	19	35	8	7	8	3	1	5	1	1	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	270	9,42 ± 3,52
mor ₆	-	-	-	-	-	-	-	2	9	24	65	58	28	19	15	9	11	4	2	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	250	7,50 ± 2,34
mor ₇	-	-	-	-	-	-	-	2	10	37	81	43	30	15	9	8	11	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	250	7,03 ± 2,10
mor ₈	-	-	-	-	-	-	-	11	37	73	75	25	19	5	7	2	4	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	259	5,88 ± 1,84
mor ₉	-	-	-	-	-	-	-	5	40	36	37	59	19	24	5	14	4	9	5	1	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	261	6,18 ± 2,97
mor ₁₀	2	43	70	50	27	26	11	13	5	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	250	4,18 ± 1,92	
mor ₁₁	-	-	-	3	12	26	50	37	35	18	17	27	9	4	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	262	8,18 ± 2,83
mor ₁₂	-	-	-	3	26	32	36	73	33	27	19	5	8	4	1	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	270	6,28 ± 2,41
mor ₁₃	-	-	-	17	27	34	61	37	26	16	4	8	14	-	2	3	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	250	6,77 ± 2,62	
mor ₁₄	-	-	-	1	11	43	47	84	28	21	10	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	250	5,80 ± 1,57	
mor ₁₅	-	-	-	2	20	35	48	85	26	11	11	3	5	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	251	5,85 ± 1,93	
mor ₁₆	-	-	-	13	33	61	79	36	27	11	10	4	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	280	6,19 ± 1,92	
mor ₁₇	-	-	-	1	7	24	59	97	42	20	15	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	267	6,03 ± 1,49	
mor ₁₈	-	-	-	4	9	20	34	35	45	29	21	19	26	7	4	3	1	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	260	8,50 ± 2,81	
mor ₁₉	-	-	-	2	10	29	35	48	29	32	15	16	9	17	3	2	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	250	7,14 ± 2,77	
mor ₂₀	-	-	-	4	25	24	60	52	27	29	11	13	13	4	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	264	7,28 ± 2,35	
mor ₂₁	-	-	-	-	2	11	20	30	28	29	27	29	36	15	6	11	-	3	4	2	1	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	258	10,15 ± 3,52	
mor ₂₂	-	-	-	1	14	29	34	71	41	26	16	11	4	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	250	6,36 ± 1,99	
mor ₂₃	-	-	-	2	1	5	12	7	9	21	6	17	41	17	15	36	13	11	29	8	12	22	10	7	22	8	5	7	2	-	12	3	2	3	6	1	10	402	18,62 ± 9,58
mor ₂₄	-	-	-	3	19	22	51	40	40	34	18	15	11	5	3	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	263	7,69 ± 2,44	
mor ₂₅	-	-	-	3	10	25	69	45	20	21	16	16	16	2	3	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	250	7,63 ± 2,52	
mor ₂₆	-	-	-	-	-	-	4	-	3	9	12	13	50	15	15	23	3	6	25	5	7	12	3	5	15	2	2	2	1	-	1	-	3	1	4	2	5	250	16,71 ± 6,85
mor ₂₇	-	-	-	-	1	1	13	5	8	21	14	18	52	27	10	8	3	3	12	3	5	9	3	3	4	4	-	4	1	3	5	-	2	-	1	-	7	250	15,14 ± 8,99

Figura 4 - Distribuição do número de núcleos por esporo na linhagem selvagem de *Humicola* sp e alguns mutantes morfológicos

Figura 5 - Distribuição do número de núcleos por esporos em alguns mutantes morfológicos de *Humicola* sp

Figura 6 - Distribuição do número de núcleos por esporos em alguns mutantes morfológicos de *Humicola* sp

Figura 7 - Características conidais da linhagem selvagem de *Humicola* sp e dos mutantes morfológicos mor_1 a mor_8 .

SEL - Linhagem selvagem (x 400)

1 a 8 - Variação do número de núcleos e pigmentação dos esporos das linhagens de morfologia alterada mor_1 a mor_8 (x 1.000).

Figura 8 - Características conidiais dos mutantes morfológicos mor_9 a mor_{18} de *Humicola* sp.

9 a 18 - Variação do número de núcleos, intensidade de esporulação e pigmentação dos esporos nas linhagens de morfologia alterada de mor_9 a mor_{18} (x 1.000).

Figura 9 - Características conidiais dos mutantes morfológicos mor_{19} a mor_{27} de *Humicola* sp.

- 19 a 27 - Variação do número de núcleos, intensidade de esporulação e pigmentação nas linhagens mor_{19} a mor_{27} ($\times 1.000$)
- 23 - A seta indica um esporo da linhagem mor_{23} , contendo aproximadamente 36 núcleos.
- 27 - A seta indica um esporo da linhagem mor_{27} , contendo mais de 60 núcleos.

com picos em 6 e 12. Um outro mutante, mor₂₃, mostrou ampla variação no número de núcleos por conídio, desde 2 até mais de 64, o que não permitiu a caracterização de uma distribuição específica, em 250 células observadas, conduzindo à investigação de maior número de células que os demais. A linhagem mor₂₁, também não apresentou uma distribuição típica do número de núcleos. A distribuição de núcleos na linhagem mor₁₈ apresentou pico em 8, com média correspondente a 8,5. O número de núcleos por esporos variou amplamente nas linhagens mor₂₆ e mor₂₇, mas a classe mais frequente de distribuição coincide com a do selvagem. No mutante mor₂₇, também foram observados esporos contendo mais de 60 núcleos, constatando-se alterações morfológicas nas hifas, geralmente mais largas e levemente globosas.

As células somáticas das hifas, também eram multinucleadas, mas tinham menos núcleos que as células conidiais. O número de núcleos nessas células variou de 1 a 7 ou 8. No entanto, em hifas globosas da linhagem mor₂₇ foram observadas células contendo até 12 núcleos.

4.5.2. Divisão nuclear em *Humicola* sp

Os núcleos variaram em tamanho e forma, tanto em conídios quanto em células somáticas do micélio, dependendo da fase de divisão. O processo de divisão, em ambos os casos, foi classificado em cinco estágios, de acordo com o tama

nho e forma dos núcleos, utilizando-se o critério proposto por TANAKA (1976) para o fungo filamentoso *Pyricularia oryzae*.

a) Divisão nuclear em conídios

Interfase

Em células conidiais maduras, cultura incubada por 7 dias, os núcleos se apresentaram de forma esférica a sub-esférica e, compactados (Figura 10-1). Foram frequentemente, observados nucléolos esféricos e concentrados associados aos núcleos. O processo de divisão, em geral, ocorreu sincronizadamente em conídios jovens.

Prófase

Os núcleos em conídios jovens, cultura incubada por 3 a 4 dias, apresentaram-se irregulares, de forma ovalada ou alongada (Figura 10-1). Em estágios avançados da prófase, o nucléolo desapareceu. Em pro-metáfase, muitas vezes, foram observados corpos cromatínicos como fio, linha ou sob forma de anel (Figura 10-2 e 3).

Metáfase

As características que distinguem a metáfase, em núcleos de plantas, são: o aparecimento de cromossomos e a formação da placa equatorial; contudo, essas, nem sempre, são constatadas em núcleos de fungos. Nesse estágio, foram obser

vados, freqüentemente, cromossomos ou corpos cromatômicos irregulares, em forma de rosário (Figura 10-3 e 4). Os núcleos em conídios eram muito pequenos, e não foi possível identificar cromossomos, com precisão. Contudo, ocasionalmente, 7 a 8 partículas foram observadas durante a metáfase (Figura 10-5).

Anáfase-Telófase

Na Figura 10-6, 7 e 8, é apresentada uma sequência de divisão nuclear da anáfase até a telófase. Em anáfase foram observados dois núcleos, bem próximos, ligados através de fios de cromatina (Figura 10-6), enquanto em telófase foram constatados núcleos-filhos mais afastados, também associados por fios de cromatina (Figura 10-7 e 8). Em estágios mais avançados da telófase foram observados núcleos-filhos separados, raramente distintos de núcleos interfásicos.

b) Divisão nuclear em células somáticas do micélio

Interfase

Nesse estágio, os núcleos apresentaram-se esféricos ou sub-esféricos; uniformemente corados e, comumente, pode-se reconhecer o nucléolo (Figura 11-5). O processo de divisão nuclear em células miceliais se mostrou semelhante ao das células conidiais, com algumas diferenças que serão relacionadas a seguir.

Figura 10 - Observações sobre divisão nuclear em conídios de *Hemicola* sp (x 1.000).

- 1 - Núcleos interfásicos e em prófase
- 2 - A seta indica um núcleo em estágio intermediário entre prófase e metáfase.
- 3 - Núcleos em pro-metáfase e metáfase
- 4 - Núcleos em metáfase e anáfase. A seta indica cromossomos em forma de rosário na metáfase.
- 5 - A seta indica 6 a 7 cromossomos na metáfase.
- 6 - A seta indica núcleo em anáfase.
- 7 e 8 - A seta indica núcleo em telófase.

Prófase

Núcleos profásicos apresentaram-se menos corados que os interfásicos, com formato esférico, de diâmetro entre 2 e 3 μm , ou alongados, com diâmetro maior de cerca de 5 μm , sendo que os cromossomos não foram diferenciados nesse estágio (Figura 11-5 e 6).

Metáfase

Núcleos que apresentavam corpos cromatínicos em forma de rosário, ou irregulares e não diferenciados em cromossomos, foram incluídos na metáfase desse fungo (Figura 11-6 e 7). Em células miceliais, foi muito difícil identificar cromossomos, diferindo, portanto, da divisão nuclear em conídios. No entanto, em raros casos, corpos semelhantes a cromossomos foram observados no final da metáfase, podendo-se, ocasionalmente, contar de 5 a 6.

Anáfase - Telófase

Na anáfase, em geral, os núcleos movem-se em direção oposta à elongação da hifa. Classificaram-se como anafásicos, dois núcleos conectados por fios de cromatina, como pode-se observar na Figura 11-7. Dois núcleos-filhos associados por fios ou grupos cromatínicos, muitas vezes foram observados em ambos os polos, assumindo-se que correspondam ao estágio de telófase (Figura 11-8).

4.5.3. Anastomose de hifas

As ramificações das hifas de *Humicola* sp, em geral, se apresentaram em ângulo reto, ou próximo disso, em relação ao eixo principal. Anastomose de hifas foi, frequentemente, observada dentro do mesmo isolado e, também entre isolados diferentes como pode ser observado na Figura 11-1. Na Figura 11-2 e 3 são apresentados diferentes estágios do processo de anastomose entre hifas. A fusão pode acontecer em qualquer parte da colônia, tanto entre hifas paralelas com conexão tipo H (Figura 11-4), como também, entre uma extremidade hifal e a parede lateral de outra hifa. Também foi constatada a presença de núcleos, na ponte hifal.

4.6. Observações quanto a complementação morfológica

Como descrito no item 3.11, foram efetuados ensaios de complementação morfológica entre os mutantes morfológicos, e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8. Quando inóculos da região de complementação entre mor_1 e mor_4 , mor_1 e mor_5 e mor_6 e mor_{10} foram incubados, verificou-se, após crescimento, que a morfologia correspondia a mor_1 , mor_1 e mor_6 , respectivamente. Esses casos de complementação foram fotografados e podem ser observados na Figura 12-1 e 4.

Figura 11 - Diferentes estágios do processo de anastomose de hifas e divisão nuclear em células miceliais de *Humicola* sp.

- 1 - As setas indicam regiões de anastomose de hifas (x 400).
- 2 - A seta indica germinação lateral da hifa (x 1.000).
- 3 - Prolongamento lateral da hifa (x 1.000).
- 4 - Anastomose em ponte tipo H com migração de núcleos (x 1.000).
- 5 - Células miceliais multinucleadas (x 1.000).
- 6, 7 e 8 - Núcleos de células miceliais em diferentes estágios de divisão. A seta em 7 indica anastomose de hifas na linhagem mor₇ (x 1.000).

Tabela 8 - Complementação morfológica entre as linhagens de morfologia alterada de *Humicola* sp

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: + presença de complementação morfológica
- ausência de complementação morfológica

Os resultados da coloração dos espécimes das regiões de com
plementação podem ser observados na Figura 12-2, 3, 5 e 6.

4.7. Estabilização de algumas linhagens de *Humicola* sp

Experimentos prévios de dosagem de celulases extracelulares foram efetuados, cultivando-se a linhagem selvagem e os mutantes morfológicos em meio semi-sólido, e extraindo-se as enzimas por adição de água, após o cultivo (YOSHIOKA *et alii*, 1982). Os resultados dessas determinações de atividades enzimáticas extracelulares (avicelase, carboxiimetilcelulase, salicinase, amilase e protease neutra), expressos em unidades/mg de proteínas totais, apresentaram-se altamente variáveis em 9 repetições realizadas com a linhagem selvagem.

Na tentativa de se obter isolados mais estãveis quanto às características morfológicas em meio de aveia e produção de celulases, utilizou-se o procedimento descrito no item 3.12. Isolados da linhagem selvagem e dos mutantes morfológicos mor_4 , mor_{10} , mor_{13} , mor_{21} , mor_{22} e mor_{27} , que se apresentaram morfolologicamente homogêneos, foram utilizados na determinação das atividades enzimáticas. Algumas sub-culturas desses isolados supostamente homogêneos, principalmente, da linhagem selvagem e mor_{21} , ainda se apresentaram morfológicamente instáveis.

Figura 12 - Complementação morfológica entre alguns mutantes morfológicos de *Humicola* sp.

- 1 - Vista frontal de placas contendo linhagens que apresentam complementação morfológica; esquerda mor_6 e mor_{10} , direita mor_1 , mor_4 e mor_5 .
- 4 - Reverso das mesmas placas.
- 2 - Complementação morfológica entre mor_6 e mor_{10} (x 200).
- 3 - Complementação entre mor_6 e mor_{10} (x 400).
- 5 - Complementação morfológica entre mor_1 e mor_5 (x 200).
- 6 - Complementação entre mor_1 e mor_5 (x 400).

4.8. Atividades enzimáticas extranucleares da linhagem selvagem e de alguns mutantes morfológicos de *Humicola* sp

As atividades avicelase, carboximetilcelulase, salicinase, amilase e protease neutra foram determinadas no extrato de cultura da linhagem selvagem e dos mutantes morfológicos selecionados (item 3.14). Os resultados obtidos, expressos em termos do número de atividades/mg de proteínas totais, para as 4 repetições, bem como os valores médios e erros dessas determinações são apresentados nas Tabelas 9, 10, 11, 12 e 13, respectivamente.

4.9. Análises estatísticas

As significâncias dos diferentes valores de atividades enzimáticas da linhagem selvagem e dos mutantes selecionados foram detectadas pela análise de variância e são apresentadas na Tabela 14.

Os graus de associação entre as diferentes atividades enzimáticas obtidos através do cálculo do coeficiente de correlação encontram-se na Tabela 16.

Tabela 9 - Atividade avicelase extracelular da linhagem selvagem de *Humicola* sp e de alguns mutantes morfológicos (unidades/mg de proteínas totais)

Linha gem	Atividade avicelase extracelular (U/mg de proteínas totais)				
	Repetições				m $\pm$ e
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	
Sel.	308,13	265,53	253,95	259,25	271,72 $\pm$ 24,73
mor ₄	132,09	102,78	135,13	117,72	121,93 $\pm$ 14,85
mor ₁₀	81,39	79,98	98,96	102,81	90,79 $\pm$ 11,78
mor ₁₃	185,12	173,66	162,61	170,65	173,01 $\pm$ 9,32
mor ₂₁	93,20	103,31	105,30	93,47	98,82 $\pm$ 6,39
mor ₂₂	251,48	203,59	214,96	243,33	228,34 $\pm$ 22,74
mor ₂₇	283,50	275,68	253,36	231,83	261,09 $\pm$ 23,32

Tabela 10 - Atividade carboximetilcelulase extracelular da linhagem selvagem de *Humicola* sp e de alguns mutantes morfológicos (unidades/mg de proteínas totais)

Atividade CMCase extracelular (U/mg de proteínas totais)					
Linha gem	Repetições				m $\pm$ e
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	
Sel.	310,64	300,66	293,14	286,62	297,77 $\pm$ 10,32
mor ₄	139,17	141,99	145,51	120,68	136,84 $\pm$ 11,08
mor ₁₀	119,52	115,12	136,25	123,82	123,68 $\pm$ 9,10
mor ₁₃	171,49	214,78	227,72	180,85	198,71 $\pm$ 26,83
mor ₂₁	134,84	141,96	128,90	105,31	127,75 $\pm$ 15,88
mor ₂₂	286,18	224,47	257,95	246,70	253,83 $\pm$ 25,67
mor ₂₇	296,28	325,55	266,21	242,82	282,72 $\pm$ 35,98

Tabela 11 - Atividade salicinase extracelular da linhagem selvagem de *Humicola* sp e de alguns mutantes morfológicos (unidades/mg de proteínas totais)

Linha gem	Atividade salicinase extracelular (U/mg de proteínas totais)				
	Repetições				m $\pm$ e
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	
Sel.	786,27	742,46	780,44	706,97	754,04 $\pm$ 36,90
mor ₄	496,41	608,62	661,85	721,76	662,16 $\pm$ 95,73
mor ₁₀	726,07	486,75	702,63	877,44	698,22 $\pm$ 160,87
mor ₁₃	923,15	1299,12	1313,80	913,42	1112,37 $\pm$ 224,23
mor ₂₁	438,95	536,69	536,09	556,56	517,07 $\pm$ 52,94
mor ₂₂	447,93	389,07	456,09	491,52	446,15 $\pm$ 42,50
mor ₂₇	402,26	332,56	330,95	380,44	361,55 $\pm$ 35,55

Tabela 12 - Atividade amilase extracelular da linhagem sel
vagem de *Humicola* sp e de alguns mutantes mor
fológicos (unidades/mg de proteínas totais)

Linha gem	Atividade amilase extracelular (U/mg de proteínas totais)				m $\pm$ e
	Repetições				
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	
Sel.	1483,68	1177,21	1657,80	1582,29	1475,25 $\pm$ 211,09
mor ₄	1820,15	1464,03	2133,95	1728,88	1786,75 $\pm$ 276,38
mor ₁₀	490,30	455,02	472,85	477,43	473,90 $\pm$ 14,59
mor ₁₃	782,31	1127,60	1162,27	965,62	1009,45 $\pm$ 174,00
mor ₂₁	2287,56	2717,72	2949,55	2526,53	2620,34 $\pm$ 281,31
mor ₂₂	623,41	823,97	697,01	772,02	729,10 $\pm$ 87,64
mor ₂₇	865,56	1080,52	1144,41	775,44	966,48 $\pm$ 174,49

Tabela 13 - Atividade protease neutra extracelular da linhagem selvagem de *Humicola* sp e de alguns mutantes morfológicos (unidades/mg de proteínas totais)

Atividade protease neutra extracelular (U/mg de proteínas totais)						
Linha gem	Repetições				m $\pm$ e	
	1ª	2ª	3ª	4ª		
Sel.	43,62	45,71	41,74	35,87	41,74 $\pm$	4,23
mor ₄	43,45	50,84	47,93	41,75	45,99 $\pm$	4,15
mor ₁₀	30,85	28,07	24,48	31,50	28,73 $\pm$	3,20
mor ₁₃	40,42	47,80	44,46	42,86	43,89 $\pm$	3,09
mor ₂₁	51,33	55,09	51,71	51,81	52,49 $\pm$	1,75
mor ₂₂	47,05	49,22	43,71	64,91	51,22 $\pm$	9,40
mor ₂₇	59,38	64,32	51,04	53,33	57,02 $\pm$	6,01

Tabela 14 - Valores médios e significâncias das diferentes atividades enzimáticas extracelulares relativas à linhagem selvagem de *Humicola* sp e alguns mutantes morfológicos

Linhagem	Médias das atividades enzimáticas (U/mg de proteínas totais)				
	Avicelase	CMCase	Salicinase	Amilase	Protease neutra
Sel.	271,72 A	297,77 A	704,04 B	1475,25 BC	41,74 BC
mor ₄	121,93 C	136,84 C	662,16 BC	1786,75 B	45,99 AB
mor ₁₀	90,79 C	123,68 C	698,22 B	473,90 D	28,73 C
mor ₁₃	173,01 B	198,71 B	1112,37 A	1009,45 CD	43,89 AB
mor ₂₁	98,82 C	127,75 C	517,07 BC	2620,34 A	52,49 AB
mor ₂₂	228,34 A	253,83 AB	446,15 BC	729,10 D	51,22 AB
mor ₂₇	261,09 A	282,72 A	361,55 C	966,48 CD	57,02 A
<hr/>					
	cv=9,87%	cv=10,59%	cv=17,84%	cv=15,14%	cv=11,13%
	d.m.s.(1%)	d.m.s.(1%)	d.m.s.(1%)	d.m.s.(1%)	d.m.s.(1%)
	=49,64	=60,78	=324,98	=553,73	=14,43

Médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente entre si.

Tabela 15 - Valores dos coeficientes de correlação para os pares de combinações possíveis entre as diferentes atividades enzimáticas extracelulares da linhagem selvagem de *Humicola* sp e alguns mutantes morfológicos.

Correlações Enzimáticas	Coef. Correlação	Valor t
Avicelase x CMCase	0,97215	21,1509 **
Avicelase x Salicinasase	-0,14684	0,7569 n.s.
Avicelase x Amilase	-0,28129	1,4947 n.s.
Avicelase x Protease	0,40336	2,2477 *
CMCase x Salicinasase	-0,10234	0,5246 n.s.
CMCase x Amilase	-0,28179	1,4975 n.s.
CMCase x Protease	0,37390	2,0556 *
Salicinasase x Amilase	-0,08147	0,4168 n.s.
Salicinasase x Protease	-0,38690	2,1395 *
Amilase x Protease	0,34427	1,8698 n.s.

** (P. < 0,01); * (P. < 0,05); n.s. (não significativo).

5. DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento em meios de cultura e estudo de redutores do crescimento de *Humicola* sp

A linhagem selvagem de *Humicola* sp, utilizada no presente trabalho, apresentou crescimento rápido (4 dias) e esporulação (7 dias) em meio completo (PONTECORVO *et alii*. 1953) sendo, por esta razão, recomendável a inoculação de uma única colônia por placa. A semeadura de uma suspensão de células de *Humicola* sp, nesse meio, indicou, após crescimento, que as colônias não ficavam individualizadas, requerendo, para isso, adição de substâncias que reduzissem o diâmetro da colônia. HANKIN e ANAGNOSTAKIS (1977) utilizaram desoxicolato de sódio no meio de cultura em concentração de 200 a 400

$\mu\text{g/ml}$ e sorbose 1 ou 3% (p/v) para restringir o crescimento de fungos celulolíticos em meio contendo CMC. Rosa de bengala 50 $\mu\text{g/ml}$ e oxgall 1,5% foram utilizados por MONTENECOURT e EVELEICH (1977b) para limitar o tamanho de colônias mutantes de *Trichoderma viride*. Ainda, quanto a esse aspecto, o citrato foi citado por CHAVES (1982) como uma fonte de carbono que a referida linhagem não se mostrou capaz de utilizar, inibindo seu crescimento, em concentrações acima de 10 mM. Essas cinco substâncias, anteriormente mencionadas, foram ensaiadas como redutores de crescimento para *Humicola* sp, em diferentes concentrações (Tabela 1). Assim, rosa de bengala agiu como inibidor de crescimento, numa concentração em que também afetou a sobrevivência, o que impediu sua utilização. O desoxicolato de sódio atuou nesse fungo em uma faixa de concentração muito estreita, tornando-o pouco prático em trabalhos de rotina. Com oxgall, sorbose e citrato de sódio, foram obtidos os melhores resultados, apesar de oxgall reduzir, excessivamente, o tamanho das colônias em concentrações maiores que 0,500%, fato esse, indesejável, no isolamento de mutantes morfológicos, principalmente. Portanto, citrato de sódio 0,700% e sorbose 0,750% apresentaram-se mais eficazes para tal finalidade, optando-se pela utilização de citrato. No entanto, comparando-se as colônias do referido fungo, cultivadas nesse meio e em meio completo sem redutor, observou-se uma alteração de morfologia. No isolamento de mutantes morfológicos foi

utilizada a sorbose, em alguns casos, e citrato, em outros, ha vendo necessidade de transferirem-se as colônias para meio completo, sem redutor, para confirmar a alteração de morfolo gia verificada em meio com esse último. O citrato, no cito sol, atua como um modulador negativo da glicólise, inibindo a fosfofrutoquinase. Excesso de citrato, durante a respiração, leva à diminuição na velocidade da glicólise e, em consequência, no suprimento de piruvato às mitocôndrias (LEHNINGER, 1976). Segundo BAKER *et alii* (1953) o citrato induz, também, deficiência de íons metálicos, devido a sua habilidade quelante. Como tal, o citrato complexa íons metálicos, necessários ao desenvolvimento celular de fungos (ALEXOPOULOS e MIMS, 1979).

As referidas alterações exercidas pelo citrato podem ser a causa de seu efeito redutor sobre o crescimento de *Humicola* sp.

Foi também observado visualmente que a linhagem de *Humicola* utilizada apresentou melhor esporulação em meio de farinha de aveia, que em meio completo. Efeito similar sobre a esporulação de *Pyricularia oryzae* em aveia - dextrose - agar, foi relatado por TANAKA (1982) e BORDIN (1986). Segundo NAMAI e YAMANAKA (1983), a prolamina presente na aveia é uma das substâncias responsáveis por este estímulo.

É fundamental, em estudos genéticos de microor

ganismos, o estabelecimento de um meio de cultura mínimo e definido, exigido pelo mesmo. Para a linhagem de *Humicola* sp utilizada, o meio definido constituiu-se de biotina e tiamina adicionadas ao meio mínimo de PONTECORVO (1953), conforme resultados obtidos através de inoculação, e verificado em outros fungos (ALEXOPOULOS e MIMS, 1979). No entanto, em geral, não ocorreu germinação, nesse meio, quando uma suspensão de esporos, adequadamente diluída, foi semeada, verificando-se crescimento com aumento da concentração de esporos na suspensão semeada. Isso permite especular quanto a ocorrência de algum tipo de sintrofismo ou protocooperação quando do aumento da densidade populacional ou diminuição da distância entre os esporos semeados, verificados através da germinação em meio mínimo suplementado com biotina e tiamina. Torna-se oportuno considerar aqui a hipótese "dinâmica" da termofilia, uma vez que, segundo CHAVES (1982), o referido isolado de *Humicola* sp apresentou crescimento numa faixa de temperatura de 20 a 60°C, com temperatura ótima em torno de 40°C, podendo ser considerado termofílico, segundo o critério de Crisan³ citado por COONEY e EMERSON (1964). Tal hipótese foi sustentada pela demonstração de que espécies termofílicas de *Bacillus* apresentavam aumento na complexidade de nutrientes com aumento da

³CRISAN, E. V., 1959. The isolation and identification of termophilic fungi. Lafayette, Indiana. Purdue University, 107 p. (M. S. thesis).

temperatura (BAKER *et alii*, 1953). Segundo essa hipótese, a termofilia estaria relacionada a uma capacidade excepcionalmente rápida de síntese e constante substituição de enzimas (ALLEN, 1953). Portanto, microorganismos que crescem em altas temperaturas necessitariam de "blocos construtores", já confeccionados, como requerimento para rápida substituição de enzimas. Realmente, a referida linhagem de *Humicola* apresentou ótimo crescimento a 40-42°C em meios ricos como meio completo e meio de aveia, tanto quando inoculada através de alça como quando semeada. Ausência de germinação, contudo, só ocorreu em meio mínimo suplementado de biotina e tiamina a 40-42°C, quando suspensões de esporos foram semeadas. Transferência de cultura, por inoculação de ponto, permitiria trocas nutritivas de intermediários metabólicos entre esporos próximos. No entanto, isso não seria possível entre esporos fisicamente distantes, o que, geralmente, ocorre em sementeiras. A definição de uma condição de crescimento em meio mínimo é fundamental para estudos genéticos, como a análise mitótica através do ciclo parassexual.

5.2. Indução de mutação pelos diferentes agentes mutagênicos e isolamento de mutantes

O estabelecimento das curvas de sobrevivência de esporos de *Humicola* sp aos agentes mutagênicos utilizados possibilitou a determinação da dose ou tempo de tratamento adequado para obtenção de mutantes (5,00% de sobrevivência). Os

mutagênicos usados, no presente trabalho, se caracterizaram por apresentarem distintos mecanismos de ação, incluindo desanimação de bases (ácido nitroso), alquilação (etil metano sulfonato), formação de dímeros de pirimidina (luz ultra-violeta) e ionização de bases (radiação gama, o mais potente mutagênico utilizado)(AZEVEDO, 1979).

As curvas de sobrevivência obtidas, apresentaram resultados característicos de esporos multinucleados (Tabelas 2, 3, 4, 5 e Figura 2). Os resultados indicam que os esporos de *Humicola* sp são mais resistentes aos efeitos desses mutagênicos que os conídios de outros fungos como *Aspergillus nidulans* (PIZZIRANI, 1977), *A. niger* (BONATELLI JR., 1981) e *A. awamori* (FUNGARO, 1984) em condições experimentais similares. Nessas, foi observada uma relação entre a diminuição de sensibilidade a mutagênicos com aumento do número médio de núcleos por conídios. Tal observação pode ser atribuída ao fato de mutações letais em conídios multinucleados serem mascaradas pelos alelos selvagens, em núcleos diferentes, o que diminui a sensibilidade, permitindo maior sobrevivência. De BERTOLDI e CATEN (1975) obtiveram resultados semelhantes quanto à sobrevivência à radiação ultra violeta com linhagem desse mesmo gênero. Outros estudos sobre o efeito da radiação ultra-violeta em *Cochliobolus sativus*, realizados por TINLINE *et alii* (1960), constataram que uma linhagem de esporos escuros era consideravelmente mais resistente à

altas doses de radiação que outras de esporos brancos. A variação, na resistência dos esporos, pode ser causada por diferenças na espessura da parede celular e densidade do pigmento. Similarmente, a pigmentação dos conídios de *Humicola* sp poderia, também, justificar sua maior resistência à luz ultra-violeta, além do grande número de núcleos por esporo.

A presença de vários núcleos por conídio e também por septo de hifa poderia explicar a grande variabilidade, bem como a instabilidade dos mutantes morfológicos isolados como colônias individuais ou, mais comumente, como setores, após tratamento mutagênico. Desse modo, não raramente, as colônias de morfologia alterada produziram setores distintos, que poderiam ter surgido, devido à simples segregação de núcleos no heterocário. Da mesma forma, o isolamento de mutantes auxotróficos foi dificultado pela natureza multinucleada desse fungo, uma vez que um setor auxotrófico numa colônia prototrófica não pode ser visualmente distinguido como no caso de alterações morfológicas. Tal fato pode ser observado, nesse trabalho, onde foram selecionados 27 mutantes morfológicos, mas, apenas, 3 auxotróficos, concordando com MACEDO (1986), que isolou 24 morfológicos e, somente, 4 auxotróficos. A técnica de isolamento de mutantes auxotróficos, utilizada nesse estudo, foi proposta por TINLINE (1961) para o fungo multicelular e multinucleado *Cochliobolus sativus*. Tal procedimento justifica-se, porque mutações podem ser induzidas, mas,

ocorrerem em heterocários que contenham núcleos normais. Estes, podem dissociar-se em seus componentes e o isolamento de extremidades de hifas pode selecionar mutantes em condições homocarióticas. Dois dos 3 mutantes auxotróficos, isolados nesse trabalho, constituíam setores de colônias prototróficas, sendo que todos apresentaram deficiências para a síntese de metionina. MACEDO (1986) obteve 4 auxotróficos para aminoácidos, através da irradiação ultra-violeta de protoplastos de *Humicola* sp. De BERTOLDI e CATEN (1975) também obtiveram 3 mutantes auxotróficos para aminoácidos e, 1 para vitamina, através da irradiação ultra-violeta de aleuriosporos de uma linhagem desse gênero.

Dentre os vários mutantes morfológicos selecionados, mor_{10} pareceu ser o mais promissor para posterior estudo genético e indução de mutação, pois apresentou a menor média do número de núcleos por conídio ($4,18 \pm 1,92$), sendo 3 a classe mais frequente (Tabela 7). Esse, possivelmente, será menos resistente a mutagênicos, tornando mais provável o isolamento de duplos mutantes.

5.3. Características culturais da linhagem selvagem de *Humicola* sp e dos mutantes morfológicos

A linhagem selvagem de *Humicola* sp apresentou, frequentemente, segregação para coloração em meio de aveia, sendo que linhagens de morfologia branca podem ser facilmen

te isoladas a partir da mesma, sem tratamento mutagênico.

As características morfológicas, observadas entre os mutantes isolados no presente trabalho, evidenciaram, as variações encontradas (Tabela 6 e Figura 3). Assim, pode-se notar a presença de setores e zonação, em algumas linhagens, sugerindo que as mesmas deveriam ser heterocários alterados. Em alguns desses casos, sub-culturas dessas linhagens ainda apresentaram variações morfológicas, sugerindo segregação de núcleos. A maioria das colônias diferiram quanto à cor do micélio aéreo e cor dos conídios e, em alguns casos, ocorreram alterações no formato das colônias. Apenas 7 dos mutantes morfológicos apresentaram em meio completo a mesma intensidade de esporulação que a linhagem selvagem, podendo-se observar que a maioria exibiu esporulação esparsa, e que as linhagens mor_{12} , mor_{13} e mor_{22} apresentaram raros conídios, o que dificultou a amostragem necessária para a contagem do número de núcleos por esporo nas mesmas. Mutantes morfológicos de *Humicola* sp, com características culturais similares, foram isolados por MACEDO (1986), que os classificou em grupos, dentre os quais, os mais semelhantes seriam os de coloração alterada, os compactos, os aconidiais e os instáveis.

5.4. Aspectos citológicos

5.4.1. Comportamento nuclear em *Humicola* sp

Como anteriormente mencionado, pouco se conhece acerca da citologia e genética do gênero *Humicola*, não tendo sido relatados detalhes sobre o comportamento do núcleo durante a divisão mitótica e importância da variação cromossomal nesse organismo. No presente trabalho foram efetuadas observações citológicas com o objetivo de esclarecer alguns desses aspectos de fundamental importância para compreensão, não só da variabilidade natural da linhagem em estudo, mas também como técnica auxiliar nos estudos genéticos, considerando suas implicações no melhoramento.

As observações citológicas do fungo celulolítico *Humicola* sp evidenciaram a natureza multinucleada das células somáticas e conidiais desse organismo, sugerindo que a heterocariose pode ser, pelo menos em parte, responsável pela variabilidade observada nesse caso, como mencionado por De BERTOLDI (1972).

O número de núcleos observados na linhagem selvagem variou de 5 a 18, sendo 12, a classe mais freqüente, como mostrado na sua curva de distribuição (Figura 4). Isso sugeriu que o número mais comum de núcleos por esporo nessa linhagem foi 12, sendo que conídios com menos de 12 núcleos,

possivelmente, aumentariam este número através de outras divisões mitóticas. Por outro lado, a observação de conídios com mais de 12 núcleos evidencia a ocorrência de ampla multiplicidade no número de núcleos. A maioria dos núcleos em um conídio apresentou divisão nuclear sincronizada, contudo, foram observados núcleos em divisão e núcleos interfásicos num mesmo conídio. Isso poderia explicar a grande diversidade observada no número de núcleos, bem como a forma da curva de distribuição.

A formação de conídios com mais de um núcleo ocorre em outras espécies além das do gênero *Humicola* e muitas vezes está relacionada à instabilidade dessas linhagens. Nessas, variações no número de núcleos são comuns, tendo sido constatadas em *Neurospora crassa* (HUEBSCHMAN, 1952), *Rhizoctonia solani* (SANFORD e SKOROPAD, 1955), *Aspergillus oryzae* (ISHITANI e SAKAGUCHI, 1955), *Helminthosporium sativum* (HRUSHOVETZ, 1956), *H. turcicum* (KNOX-DAVIES e DICKSON, 1960) e *H. oryzae* (LEE *et alii*, 1984) entre outros.

Os resultados das observações da frequência do número de núcleos por esporo, nas linhagens de morfologia alterada, apresentaram uma variação bastante ampla (Tabela 7 e Figuras 4, 5 e 6). Entre as 27 linhagens, 18 mostraram uma curva de distribuição cuja classe mais freqüente correspondeu a 6 núcleos e 4 apresentaram distribuição com pico em 12. O mutante mor₅ mostrou distribuição nitidamente bimodal com nú

meros máximos em 6 e 12. No entanto, 3 das linhagens não apresentaram uma curva de distribuição típica, havendo, contudo, uma tendência para o aparecimento de picos em 12, 18 ou 24. O mutante *mor*₁₀ apresentou uma curva de distribuição, cuja classe mais freqüente correspondeu a 3 núcleos. Esses resultados indicaram que o número básico de núcleos, nessa espécie foi 3, e que essa multiplicidade pode ser um mecanismo de perpetuação da heterocariose, responsável, pelo menos em parte, pela variabilidade observada. Um estudo citológico do número de núcleos que migra para o conídio e do comportamento nuclear durante a conidiogênese seria importante para o esclarecimento desse aspecto.

As células miceliais de *Humicola* sp também são multinucleadas, sendo que, geralmente, o número de núcleos variou de 1 a 7 ou 8 por segmento de hifa. Esse estado pode ser um fator importante para a sobrevivência e adaptação ambiental dessa espécie, pois mutações letais não se expressariam na propagação do organismo através dessas estruturas polinucleadas, enquanto que mutações que causam melhor adaptação do fungo a novos ambientes poderiam levar a uma alteração na razão de núcleos no heterocário, como já constatada em *Fusarium moniliforme* (SIDHU, 1983).

5.4.2. Divisão nuclear e comportamento cromossomal

As observações sobre divisão nuclear em células conidiais de *Humicola* sp demonstraram mitose similar a

de outros fungos filamentosos como *Endogone sphagnophila* Atk. (BAKERSPIGEL, 1958), *Fusarium oxysporum* (AIST e WILSON, 1967a), *Ceratocystis fagacearum* (AIST e WILSON, 1966 a 1967b), *Macrophomina phaseoli* (KNOX-DAVIES, 1967) E *Pyricularia oryzae* (TANAKA, 1976).

A sequência dos eventos da divisão nuclear em conídios de *Humicola* sp foi apresentada nesse trabalho (Figura 10). O processo de divisão de núcleos em uma célula, muitas vezes, mostrou-se sincronizado; contudo, figuras diferentes foram observadas na mesma célula, podendo ser atribuídas à diferenças no tempo necessário para ocorrências dos vários eventos do processo. Em células vivas de *Ceratocystis fagacearum*, AIST e WILSON (1966) verificaram, através de microscopia de contraste de fase, que o processo de divisão nuclear é relativamente rápido, prolongando-se por 3 a 5 minutos.

A divisão nuclear em conídios de *Humicola* sp se iniciou quando núcleos esféricos ou ligeiramente ovalados, que supostamente são núcleos interfásicos, sofreram alongamento caracterizando o estágio inicial da prófase. Em estágio mais avançado dessa fase, não foi observado o nucléolo, como ocorre em outros organismos. Em pró-metáfase, o núcleo se apresentou como um grupo de corpos cromatínicos, devido à condensação dos cromossomos, que posteriormente se expandiram. Algumas vezes, corpos cromossomais separados, foram observados no final da metáfase. O número de cromossomos em

Humicola sp ainda não foi relatado, mas no final da metáfase pode-se observar 6 a 7 cromossomos em conídios (Figuras 10-4 e 5). O pequeno tamanho dos cromossomos (aproximadamente 0,5 a 0,8 μ), a maneira através da qual o núcleo se divide e a velocidade do processo de divisão contribuíram para dificultar a observação do número de cromossomos. No entanto, os resultados indicaram que o número deve estar entre 6 e 8. Essas dificuldades, também impediram a constatação de qualquer irregularidade mitótica. As Figuras da metáfase mostradas nos quadros 10-4 e 5 apresentam apreciáveis diferenças. A primeira apresenta uma cadeia com 5 a 6 cromossomos, enquanto a última mostra claramente 6 a 7. Isso sugere que a primeira, corresponde a uma vista lateral da distribuição cromossômica no estágio inicial da metáfase, enquanto a segunda é uma vista frontal. O quadro 10-6 apresenta uma vista frontal de uma anáfase típica, onde 2 corpos cromossômicos divididos estão se afastando em direções opostas, e os quadros 10-7 e 8 mostram núcleos mais distantes no estágio de telófase. Como se pode constatar através da Figura 10, a seqüência dos eventos de divisão nuclear parece ser complexa; contudo, observações mais detalhadas poderão elucidar melhor o comportamento cromossomal em *Humicola* sp.

Em células miceliais, a seqüência de eventos e a forma de divisão nuclear se apresentaram semelhantes à dos conídios. O processo de divisão em células somáticas ocorreu, perpendicularmente, em relação ao eixo da hifa, quando o núme-

ro de núcleos, por células, estava entre 1 e 2. Em células multinucleadas ocorreu, em qualquer direção, e pareceu ser, preferencialmente, sincronizado (Figura 11-6 a 8). Os núcleos interfásicos em células miceliais são, morfologicamente, similares aos dos conídios, podendo se observar os nucléolos, nesse estágio. Quando a divisão se iniciou, a massa cromatínica sofreu uma expansão característica e o núcleo se tornou ovalado ou irregular durante a prófase. Na metáfase 5 a 6 cromossomos foram ocasionalmente observados, contudo não foi possível determinar, com segurança, o número dos mesmos. Através dessas observações, não foi constatada a presença de rearranjos cromossômicos, nem de núcleos diplóides formados em possíveis fusões nucleares. Por outro lado, esses resultados não excluem a possibilidade da variabilidade ser causada por aneuploidia de cromossomos, que também originaria estados heterocarióticos. Rearranjos cromossômicos foram considerados como causa da variação em outros casos como *Macrophomina phaseoli* (KNOX-DAVIES, 1967), uma vez que núcleos haplóide, diplóide, poliplóide e aneuplóide ocorreram em um mesmo micélio. O esclarecimento desses aspectos em *Humicola* sp requer observações citológicas mais detalhadas. Um refinamento das técnicas de fixação e coloração, estudos com microscopia de contraste de fase ou microscopia eletrônica poderiam fornecer maiores detalhes do processo de divisão e do comportamento cromossomal nesse fungo. A elucidação do mecanismo da mi

tose é de grande importância para a filogenia dos fungos, para o estudo da evolução da mitose e das relações entre os fungos e demais eucariotos.

5.4.3. Anastomose de hifas

Em culturas de *Humicola* sp, freqüentemente foi observada anastomose de hifas (Figura 11). Comprovação genética de anastomose entre células miceliais de uma linhagem de *Humicola* foi apresentada por De BERTOLDI e CATEN (1975), que descreveram o ciclo parassexual nessa espécie.

O processo de anastomose permite interação entre núcleos e citoplasma de diferentes células de uma mesma cultura. O fato do microorganismo em questão apresentar estruturas vegetativas multinucleadas, e ter sido verificada anastomose entre essas células, sugere que essa pode ser um dos mecanismos responsáveis pela variação, nesse caso. De acordo com PARMETER Jr. *et alii* (1963), a anastomose é de fundamental importância na iniciação da heterocariose. O fenômeno de anastomose refere-se ao estabelecimento e desenvolvimento de heterocários, envolvendo fusão de hifas, movimento de um ou mais núcleos entre as células fusionadas, e o possível estabelecimento de estados heterocarióticos compatíveis. No entanto, segundo HANSEN (1942), a causa básica da heterocariose é a mutação. Além disso, a heteroplasmosse também pode ser especulada como uma das causas de variação nesse fungo.

Contudo, os mecanismos determinantes dos processos envolvidos na fusão de hifas e formação de heterocários, através de anastomose, são fenômenos complexos, não totalmente esclarecidos, com informações ainda escassas (HARVEY, 1975; VALK e MARCHANT, 1978; MATSUMURA, 1981; AYLMORE e TODD, 1986).

Finalmente, a constatação da ocorrência de anastomose entre hifas de *Humicola* sp, indica que o ciclo parassexual deve ocorrer nessa espécie, o que poderia originar outros estados heterocarióticos e conseqüente variabilidade genética. O estabelecimento das condições de obtenção de recombinantes, através do ciclo parassexual, permitirá a utilização dessa técnica no melhoramento genético desse fungo.

5.5. Complementação morfológica

As colônias selvagens de *Humicola* sp em meio completo apresentaram coloração cinza escura com esporos pretos, enquanto todos os mutantes morfológicos selecionados apresentaram coloração diferente nesse meio, que variou de branca à amarela esverdeada ou cinza.

Foi verificado, nessa pesquisa, que muitos pares de mutantes morfológicos de *Humicola* sp podem interagir de modo a produzir conídios pigmentados semelhantes aos da linhagem selvagem, ao longo da linha de contato entre os mes

mos (Tabela 8 e Figura 12). Isso sugere que algum tipo de sintrofismo ou fusão de hifas, com subsequente formação de heterocário, deve ocorrer entre esses mutantes. Algumas das linhagens de esporos brancos ou cinza, certamente apresentam bloqueios diferentes na via biossintética do pigmento, o que permite essa protocooperação ou complementação, semelhante a que ocorre entre linhagens auxotróficas. Indubitavelmente, a ocorrência desse fenômeno indica que a biossíntese do pigmento, nesse fungo, é controlada por mais de um locus gênico.

PUHALLA (1979) observou fenômeno similar entre mutantes morfológicos de *Verticillium dahliae*. Nos casos em que esporos pretos se desenvolveram ao longo da região de contato entre mutantes albinos, havendo necessidade de interação entre as células, ocorria complementação. Nos demais, a produção de esporos pretos se estendeu além da linha de contato, tendo sido observado que um dos mutantes apresentava secreção de intermediários da via biossintética da melanina. Em trabalho posterior, PUHALLA (1984) observou o desenvolvimento de uma linha alaranjada na região de contato entre alguns pares de mutantes amarelos e brancos de *Fusarium oxysporum*. A transferência dessas áreas alaranjadas deram origem a colônias com setores alaranjados, brancos e amarelos, sugerindo tratar-se de segregação em um heterocário. Em *Humicola* sp, inóculos da região de esporos pretos entre pa-

res de mutantes apresentaram, após crescimento, morfologia de um dos mutantes utilizados, nos poucos casos testados. Tal fato sugere que, nesse caso, a causa mais provável seja sintrofismo ou protocooperação entre as linhagens, apesar da anastomose entre hifas ter sido comumente observada nesse fungo. A confirmação do fenômeno poderia ser obtida, colocando-se celofane entre dois mutantes morfológicos de *Humicola* sp que apresentaram essa protocooperação ou complementação, permitindo, assim, a passagem de moléculas como precursores metabólicos de pigmentos, mas impedindo a fusão de hifas.

RYAZANOVA *et alii* (1985) estudaram a formação de heterocário entre mutantes morfológicos de *Trichothecium roseum*. O processo se apresentou seletivo, durante o crescimento combinado de diferentes mutantes e o micélio, na região de contato entre várias colônias mutantes, foi intensificado em diferentes graus. Os autores sugeriram que esse fenômeno refletia diferentes níveis de indução de um sistema gênico hipotético que controla a formação de heterocários. Indubitavelmente, muitos aspectos relacionados a heterocariose em fungos devem ser esclarecidos através de estudos mais detalhados desse processo.

5.6. Estabilização de linhagens de *Humicola* sp

A estabilização das linhagens de *Humicola* sp se tornou necessária, devido à variabilidade apresentada, pe

las mesmas, quanto à morfologia em meio de aveia e a produção de celulases. Isso, também foi verificado por MACEDO (1986) ao quantificar as celulases produzidas pela linhagem selvagem, sendo sugerido que a variação no número e genótipo dos núcleos, no interior dos conídios, poderia ser responsável por isso. Assim, FELIX e FERREIRA-FILHO (1986) propuseram a inoculação, em meio contendo celulose cristalina, com micélio do fungo ao invés de conídios, como forma de diminuir as variações nos resultados de diferentes experimentos de dosagem de celulases produzidas por *Humicola* sp.

O procedimento utilizado no presente trabalho para viabilizar a estabilização de linhagens de *Humicola* sp não se mostrou adequado a todos os casos, uma vez que algumas sub-culturas de isolados, supostamente homogêneos, ainda se apresentaram morfologicamente variáveis em meio de farinha de aveia. Em meio completo, não se observou a mesma instabilidade morfológica nas linhagens selecionadas, sugerindo que o cultivo em meio de aveia poderia ser acompanhado por uma alteração na relação de núcleos no heterocário, como verificado por SIDHU (1983) em *Fusarium moniliforme* cultivado em diversos meios naturais. A obtenção de culturas monoconidiais, a partir de fungos que contenham esporos uninucleados, ou maior proporção dos mesmos, pode constituir um método eficaz de se conseguir isolados homocarióticos. No entanto, com fungos de esporos multinucleados, muitas vezes se obser-

vou variabilidade em sub-culturas de isolados monoconidiais como em *Helminthosporium turcicum* (HILU, 1964; HERMES, 1979). Este processo sugerido por MACEDO (1986) para estabilização de *Humicola* sp, não parece ser recomendável nesse caso.

Considerando que o elevado número de núcleos por conídio em *Humicola* sp pode representar um estado hetero_cariótico, responsável, pelo menos em parte, pela instabilidade fenotípica, a obtenção de colônias através da regeneração de protoplastos uninucleados, possivelmente, constituirá um procedimento útil para estabilização desse fungo. Nesse particular, NEIROTTI *et alii* (1987) demonstraram que foi possível obter protoplastos uninucleados, com pouco tempo de tratamento enzimático, cuja regeneração originaria colônias homocarióticas.

5.7. Produção de enzimas pela linhagem selvagem de *Humicola* sp e alguns mutantes morfológicos

As atividades exoglucanase (avicelase), endoglucanase (CMCase), β -glicosidase (salicinase), amilase e protease neutra foram determinadas para a linhagem selvagem de *Humicola* sp e para os mutantes morfológicos mor₄, mor₁₀, mor₁₃, mor₂₁, mor₂₂ e mor₂₇ (Tabela 14). Tal como observado por ARAÚJO *et alii* (1983), a linhagem selvagem de *Humicola* sp apresentou elevada produção extracelular de β -glicosidase, sendo, no entanto, superado por mor₁₃. Esta linhagem pode pos-

suir algum tipo de alteração na regulação e/ou liberação dessa enzima, sendo interessante para estudos genéticos mais detalhados. Do ponto de vista aplicado, um recombinante, obtido através de técnicas de engenharia genética que contivesse os genes determinantes da atividade β -glicosidase de mor₁₃, juntamente com os das outras enzimas do complexo celulólitico do *Trichoderma reesei*, por exemplo, possivelmente apresentaria maior sacarificação da celulose.

O fungo em estudo demonstrou ser também um bom produtor de amilase, mas não de avicelase e CMCase. Quanto à atividade CMCase, foi constatado que a utilização de CMC depende da procedência do substrato (CMC-Hercules, tipo 7H35F apresentou melhores resultados que CMC - FULKA A.G., tipo CM-23). As atividades avicelase e CMCase das linhagens mor₂₂ e mor₂₇ não diferiram significativamente da linhagem selvagem, enquanto os demais mutantes apresentaram menor produção. Quanto a atividade amilase, verificou-se que mor₂₁ apresentou quase o dobro da atividade da linhagem selvagem. No entanto mor₂₂ e mor₁₀ apresentaram cerca da metade dessa atividade.

A atividade proteolítica foi significativamente maior nos mutantes mor₄, mor₁₃, mor₂₁, mor₂₂ e mor₂₇, em relação ao selvagem, sendo que o último apresentou o maior valor, enquanto o mutante mor₁₀ mostrou a menor produção.

Os mutantes mor₂₂ e mor₂₇, que apresentavam

semelhança morfológica quanto a coloração e compactação, mas não quanto ao número de núcleos, também apresentaram diferenças estatisticamente não significativas quanto às atividades enzimáticas determinadas nesse estudo.

Um coeficiente de correlação altamente significativo foi verificado entre as atividades avicelase-CMCase, sugerindo que estas devem ser correguladas no referido organismo. Correlações significativas positivas ocorreram para avicelase-protease e CMCase-protease, sugerindo que algum tipo de protease neutra pode ser necessária para expressão das atividades exoglucanase e endoglucanase, podendo estar envolvida, por exemplo, no processamento pós-transcricional dessas enzimas. Correlação significativa negativa foi observada entre as atividades salicinase-protease, indicando que alguma protease neutra apresenta atividade sobre uma das formas de β -glicosidase, mas não sobre exoglucanase ou endoglucanase. HAYASHIDA e MO (1986) isolaram um mutante protease negativo de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, que exibiu alta atividade endoglucanase, e outro, que apresentou alta atividade proteolítica, mas baixa atividade endoglucanase. Os autores explicaram esses resultados, após a constatação de que, nesse último, estava ausente uma endoglucanase que apresentava adsorção sobre avicel. Contudo, deve-se salientar que os coeficientes de correlação estimados, nesse trabalho, podem apresentar desvios, uma vez que as atividades enzimá-

ticas foram determinadas no extrato bruto (Tabela 15).

Não foi experimentalmente constatada correlação entre a produção de qualquer das enzimas e o número médio de núcleos entre as linhagens estudadas. Entretanto, essa poderia ser melhor avaliada após a determinação das atividades enzimáticas dos demais mutantes morfológicos isolados.

Considerando os resultados obtidos e o fato de que esse fungo vêm despertando interesse por ser produtor de celulase, seria importante no desenvolvimento de trabalhos dessa natureza, enfatizar-se a seleção de mutantes resistentes à repressão catabólica, visando seu melhoramento.

6. CONCLUSÕES

Os estudos citogenéticos e bioquímicos realizados com o fungo celulolítico *Humicola* sp, no presente trabalho, permitiram concluir que:

- o meio completo (PONTECORVO) se apresentou adequado para o cultivo da referida linhagem, havendo, no entanto, necessidade de se utilizar redutores de crescimento, para se obter colônias individualizadas;

- o meio mínimo (PONTECORVO), suplementado com biotina e tiamina, possibilitou o crescimento desse fungo quando as culturas foram transferidas por inoculação de ponto, mas raramente ocorreu germinação quando suspensões de esporos foram semeadas nesse meio;

- a maior resistência dos esporos dessa espécie a agentes mutagênicos químicos e físicos que de outros fungos, em condições similares, se deve provavelmente a multiplicidade do número de núcleos nessas células (5 a 18 núcleos por esporo na linhagem selvagem);

- a natureza multinucleada das células conidiais e somática do referido microorganismo sugeriu que a heterocariose pode ser, pelo menos em parte, responsável pela variabilidade observada;

- os eventos de divisão mitótica em células miceliais e conidiais da linhagem em estudo se mostraram similares aos de outros fungos filamentosos, sendo que o número de cromossomos, observados no final da metáfase, deve estar entre 6 e 8;

- a ocorrência de complementação ou sintrofismo entre os mutantes morfológicos indicou que a biossíntese do pigmento nesse fungo deve ser controlada por mais de um locus gênico;

- a técnica de mutação - seleção pode ser utilizada para isolamento de mutantes com maior produção de celulas ou amilase;

- correlação positiva, altamente significativa, observada entre as atividades exoglucanase e endoglucanase, sugeriu que as mesmas devem ser correguladas nesse organismo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-HEILAH, A. N., 1985. Soil mycoflora of Saudi Arabia: 2. Some microfungi in the forest soils of Asir region. *J. Biol. Sci. Res.*, 16:1-16. Apud *Biol. Abstr.* Philadelphia, 81(2):130.
- ADAMS, P. R., 1985. Starch-metabolic growth characteristics of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *Mycopathologia*. Den Haag, 92:157-159.
- AIST, J. R. e C. L. WILSON, 1966. A study of asexual nuclear division in *Ceratocystis fagacearum* with phase-contrast microscopy. *Phytopathology*. Lancaster, 56:869.
- AIST, J. R. e C. L. WILSON, 1967a. Chromosome behavior during vegetative nuclear division in *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*. Lancaster, 57:801.

- AIST, J. R. e C. L. WILSON, 1967b. Nuclear behavior in the vegetative hyphae of *Ceratocystis fagacearum*. *Amer. J. Bot.* New York, 54:99-104.
- AIST, J. R. e P. H. WILLIAMS, 1972. Ultrastructure and time course of mitosis in the fungus *Fusarium oxysporum*. *J. Cell. Biol.* New York, 55:368-389.
- ALEXIEVA, P.; A. DZHEROVA; D. NIKOLOVA e P. SHEREMETSKA, 1980. Production of a highly active mutant-producer of acid protease by treatment with gamma-rays. *Acta Microbiol. Bulg.* Sofia, 6:59-63.
- ALEXOPOULOS, C. J. e C. W. MIMS, 1979. *Introductory micology*. 3a. ed. New York, John Wiley. 611 p.
- ALLEN, M. B., 1953. The thermophilic aerobic sporeforming bacteria. *Bacteriol. Rev.* Baltimore, 17:125-173.
- ARAÚJO, E. F.; E. G. BARROS; R. A. CALDAS e D. O. SILVA, 1983. Beta-glucosidase activity of the thermophilic and cellulolytic fungus *Humicola* sp. *Biotechnol. Lett.* Kew, 5:781-784.
- ARSDALL, J. N. V.; S. KWOK; V. L. SCHEICKART; M. B. LADNER; D. H. GELFAND e M. A. INNIS, 1987. Cloning, characterization and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of endoglucanase I from *Trichoderma reesei*. *Bio-technology*. New Jersey, 5:60-64.

- AYLMORE, R. C. e N. K. TODD, 1986. Cytology of self fusions in hyphae of *Phanerochaete velutina*. *J. Gen. Microbiol.* London, 132: 571-579.
- AZEVEDO, J. L. de, 1979. *Tópicos de Genética Microbiana e Molecular*. Piracicaba, ESALQ/Instituto de Genética. 355 p.
- AZEVEDO, J. L. de e S. O. P. COSTA, 1973. *Exercícios práticos de genética*. São Paulo, Ed. Nacional. 288 p.
- BAKER, H.; H. SOBOTKA e S. H. HUTNER, 1953. Growth requirements of some thermophilic and mesophilic bacilli. *J. Gen. Microbiol.* London, 9: 485-493.
- BAKERSPIGEL, A., 1958. The structure and mode of division of the nuclei in the vegetative spores and hyphae of *Endogone sphagnophila* Atk. *Amer. J. Bot.* New York, 45: 404-410.
- BARNETT, H. L. e B. H. HUNTER, 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3a. ed. Minneapolis, Burgess. 241. p.
- BERG, B. e L. G. PETERSSON, 1977. Location and formation of cellulases in *Trichoderma viride*. *J. Appl. Bacteriol.* Reading, 42: 65-75.
- BERGHEM, L. E. R.; L. G. PETERSSON e U. B. AXIÖ-FREDRICKSSON, 1975. The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Characterization and enzymatic properties of a β -1,4-glucan cellobiohydrolase from *Trichoderma viride*. *Eur. J. Biochem.* Berlin, 53: 55-62.

- BISARIA, V. S. e T. K. GHOSE, 1981. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme Microb. Technol.* Guildford, 3: 90-104.
- BOLKAN, H. A. e E. E. BUTLER, 1974. Studies on heterokaryosis and virulence of *Rizoctonia solani*. *Phytopathology*. Lancaster, 64: 513-522.
- BONATELLI JÚNIOR, R., 1981. Parasexualidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, ESALQ/USP, 91 p. (Tese de Doutorado).
- BORDIN, A. P. A., 1986. Estudo da variabilidade genética e patogênica de *Pyricularia* spp em arroz (*Oryza sativa* L.) e gramíneas. Piracicaba, ESALQ/USP, 116 p. (Dissertação de Mestrado).
- BRACKER, C. E., 1967. Ultrastructure of fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* Palo Alto, 5: 343-374.
- BRASELTON, J. P.; C. E. MILLER e D. G. PECHAK, 1975. The ultrastructure of cruciform nuclear division in *Sorosphaera veronicae* (Plasmodiophoromycete). *Amer. J. Bot.*, New York, 62: 349-358.
- BURNETT, J. H., 1976. *Fundamentals of Mycology*. 2a. ed. London, Edward Arnold Publishers. 673 p.
- BUXTON, E. W., 1954. Heterokaryosis and variability in *Fusarium oxysporum* F. *gladioli*. *J. Gen. Microbiol.* London, 10: 71-84.

- CHAVES, V. M. G., 1982. Características fisiológicas de um fungo termófilo isolado de compostagem e propriedades de seu complexo celulase. Viçosa, U.F.V., 60 p. (Tese M. Sc.).
- COONEY, D. G. e R. EMERSON, 1964. *Thermophilic fungi: an account of their biology, activities and classification*. San Francisco, W. H. Freeman. 188 p.
- DAY, A. W., 1972. Genetic implications of current models of somatic nuclear division in fungi. *Can. J. Bot.* Ottawa, 50: 1337-1347.
- De BERTOLDI, M., 1972. Nuclear distributions in some strains referred to the genus *Humicola*. *Ann. Bot.* Oxford, 31: 187-196.
- De BERTOLDI e C. E. CATEN, 1975. Isolation and haploidization of heterozygous diploid strains in a species of *Humicola*. *J. Gen. Microbiol.* London, 91: 63-73.
- De Bertoldi, M.; A. A. LEPIDI e M. P. NUTTI, 1972. Classification of the genus *Humicola* Traaen: I. Preliminary reports and investigations. *Mycopath. Mycol. Appl.* Den Haag, 46: 289-304.
- De BERTOLDI, M.; A. A. LEPIDI e M. P. NUTI, 1973. Significance of DNA base composition in classification of *Humicola* and related genera. *Trans. Br. Mycol. Soc.* London, 60: 77-85.

- ELLIS, D. H., 1982. Ultrastructure of thermophilic fungi. V. Conidial ontogeny in *Humicola grisea* var. *thermoidea* and *H. insolens*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* London, 78: 129-139.
- ERIKSSON, K. E., 1978. Enzyme mechanism involved in cellulose hydrolysis the rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Biotechnol. Bioeng.* New York, 20: 317-332.
- ERIKSSON, K. E., 1981. Cellulases of fungi. In: Trends in the Biology of Fermentations for fuels and chemicals. *Basic Life Sciences*, New York, 18: 19-31.
- ERIKSSON, K. E. e S. C. JOHNSRUD, 1983. Mutants of the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum* with increased cellulase and β -D-glucosidase production. *Enzyme Microbiol. Technol.* Guildford, 5: 425-429.
- FARKAS, V.; A. JALANKO e N. KOLAROVA, 1982. Characterization of cellulase complexes from *Trichoderma reesei* QM 9414 and its mutants by means of analytical isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. *Biochim. et Biophys. Acta*. Amsterdam, 706: 105-110.
- FELIX, C. R. e E. X. FERREIRA-FILHO, 1986. Enzimas conversoras de celulose: produção de β -glicosidase como modelo de indução de celulasas em fungos. Piracicaba, 24 p. (Apostila mimeografada - Curso de Fundamentos de Biotecnologia, 2).

- FENNINGTON, G.; D. LUPO e F. STUTZENBERGER, 1982. Enhanced cellulase production in mutants of *Thermomonospora curvata*. *Biotechnol. Bioeng.* New York, 24: 2487-2497.
- FENNINGTON, G.; D. NEUBAUER e F. STUTZENBERGER, 1984. Cellulase biosynthesis in a catabolite repression-resistant of *Thermomonospora curvata*. *Appl. Environ. Microbiol.* Washington, 47: 201-204.
- FERGUS, C. L., 1969. The cellulolytic activity of thermophilic fungi and actinomycetes. *Mycologia*. New York, 61: 120-129.
- FERREIRA-FILHO, E. X. e C. R. FELIX, 1986. Isolation and characterization of the intracellular and extracellular forms of beta-glucosidase of *Humicola nigricans*. *Arq. Biol. Tecnol.* Curitiba, 29: 46.
- FERREIRA-FILHO, E. X. e C. R. FELIX, 1987. Characterization of partially purified extracellular and cell-associated forms of beta-glucosidase of the cellulolytic fungus *Humicola* sp. *Arq. Biol. Tecnol.* Curitiba, 30: 120.
- FULLER, M. S., 1976. Mitosis in fungi. *Int. Rev. Cytol.* New York, 45: 113-153.
- FUNGARO, M. H. P., 1984. Caracterização genética e dados citológicos em *Aspergillus niger* van Tughem e *Aspergillus awamori* Nakazawa. Piracicaba, ESALQ/USP, 134 p. (Dissertação de Mestrado).

- GHOSE, T. K. e P. GHOSH, 1979. Cellulase production and cellulose hydrolysis. *Process Biochem.* London, 14: 20-24.
- GHOSH, V. K.; T. K. GHOSE e K. S. GOPALKRISHNAN, 1982. Improvement of *T. reesei* strain through mutation and selective screening techniques. *Biotechnol. Bioeng.* New York, 24: 241-243.
- GHOSH, A.; B. K. GHOSH; H. TRIMINO-VASQUEZ; D. E. EVELEIGH e B. S. MONTENECOURT, 1984. Cellulase secretion from a hyper-cellulolytic mutant of *Trichoderma reesei*, RUT-C30. *Arch. Microbiol.* Berlin, 140: 126-133.
- GILKES, N. R.; D. G. KILBURN; M. L. LANGSFORD; R. C. MILLER; W. W. WAKARCHUK; R. A. J. WARREN; D. J. WHITTLE e W. K. R. WONG, 1984. Isolation and characterization of *Escherichia coli* clones expressing cellulase genes from *Cellulomonas fimi*. *J. Gen. Microbiol.* London, 130: 1377-1384.
- GOKSOYR, J. e J. ERIKSEN, 1980. Cellulases. In: ROSE, H. H., Ed. *Microbial Enzymes and Bioconversions*. London, Academic Press. v.5, p. 283-330.
- GONG, C. S. e G. T. TSAO, 1979. Cellulase and biosynthesis regulation. In: PERLMAN, D. *Annual Reports on Fermentation Processes*. New York, Academic Press. v.3, p. 111-140.
- GULL, K. e R. NEWSAM, 1976. Meiosis in the basidiomycetous fungus, *Coprinus atramentarius*. *Protoplasma*. Leipzig, 90: 343-352.

- HANKIN, L. e S. L. ANAGNOSTAKIS, 1977. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect C_x cellulase activity of micro-organisms. *J. Gen. Microbiol.* London, 98: 109-115.
- HANSEN, H. S. e R. E. SMITH, 1932. The mechanism of variation in the fungi: *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. Lancaster, 22: 953-964.
- HANSEN, N. H., 1942. Heterocaryosis and variability. *Phytopathology*. Lancaster, 32: 639-640.
- HARGER, C. C.; J. B. PASSOS e D. O. SILVA, 1986. Is the constitutive intracellular β -D-glucosidase of *Humicola* sp responsible for glycosylation? *Arq. Biol. Tecnol.* Curitiba, 29: 47.
- HARGER, C. C. e D. O. SILVA, 1987. p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosidase activity of *Humicola* sp ATCC 60849 grown on glucose. *Arq. Biol. Tecnol.* Curitiba, 30: 129.
- HARVEY, I. C., 1975. Development and germination of chlamydospores in *Pleiochaete setosa*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* London, 64: 489-495.
- HAYASHIDA, S. e H. YOSHIOKA, 1980a. Production and purification of thermostable cellulases from *Humicola insolens* YH-8. *Agric. Biol. Chem.* Tokyo, 44: 1721-1728.

- HAYASHIDA, S. e H. YOSHIOKA, 1980b. The role of carbohydrate moiety on thermostability of cellulases from *Humicola insolens* YH 8. *Agric. Biol. Chem.* Tokyo, 44: 481-487.
- HAYASHIDA, S. e K. MO, 1986. Production and characteristics of avicel-disintegrating endoglucanase from a protease-negative *Humicola grisea* var. *thermoidea* mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* Whashington, 51: 1041-1046.
- HEATH, I. B., 1980a. Fungal mitoses, the significance of variations on a theme. *Mycologia*, New York, 72: 229-250.
- HEATH, I. B., 1980b. The behavior of kinetochores during mitosis in the fungus *Saprolegnia ferax*. *J. Cell Biol.* New York, 84: 531-546.
- HEATH, I. B., 1980c. Variant mitoses in lower eukaryotes: indicators of the evolution of mitosis? *Int. Rev. Cytol.* New York, 64: 1-80.
- HERMES, M. T. L., 1979. Estudos da variabilidade fenotípica, da resistência genética do milho e do estágio sexual do fungo *Helminthosporium turcicum*. Porto Alegre, UFRGS, 113 p. (Dissertação de Mestrado).
- HILU, H. M., 1964. Cultural variability, colonial production and pathogenicity of *Helminthosporium turcicum*. *Mycologia*, New York, 56: 775-777.
- HRUSHOVETZ, S. B., 1956. Cytological studies of *Helminthosporium sativum*. *Can. J. Bot.* Ottawa, 34: 321-327.

- HUANG, H. C. e R. D. TINLINE, 1974. Somatic mitosis in haploid and diploid strains of *Cochliobolus sativus*. *Can. J. Bot.* Ottawa, 52: 1561-1568.
- HUANG, H. C.; R. D. TINLINE e L. C. FOWKE, 1975. Ultrastructure of somatic mitosis in a diploid strain of the plant pathogenic fungus *Cochliobolus sativus*. *Can. J. Bot.* Ottawa, 53: 403-414.
- HUEBSCHMAN, C., 1952. A method for varying the average number of nuclei in the conidia of *Neurospora crassa*. *Mycologia*. New York, 44: 599-604.
- ICHIDA, A. A. e M. S. FULLER, 1968. Ultrastructure of mitosis in the aquatic fungus *Catenaria anguillulae*. *Mycologia*. New York, 60: 141-155.
- ISHITANI, C. e K. SAKAGUCHI, 1955. Hereditary variation and genetic recombination in koji-molds, *Aspergillus oryzae* and *A. sojae*: IV. Cytological studies. *J. Gen. Appl. Microbiol.* Tokyo, 1: 283-297.
- JAIN, M. K.; K. K. KAPOOR e M. M. MISHRA, 1979. Cellulase activity, degradation of cellulose and lignin, and humus formation by thermophilic fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* London, 73: 85-89.
- JINKS, J. L., 1952. Heterokaryosis: A system of adaptation in wild fungi. *Proc. R. Soc. B.* London, 140: 105-145.

- JINKS, J. L., 1959. The genetic basis of duality in imperfect fungi. *Heredity*. London, 13: 525-528.
- JOGLEKAR, A. V. e N. G. KARANTH, 1984. Studies on cellulase production by a mutant - *Penicillium funiculosum* UV-49. *Biotechnol. Bioeng.* New York, 26: 1079-1084.
- KAWAMORI, M.; Y. ADO e S. TAKASAWA, 1986. Preparation and application of *Trichoderma reesei* mutants with enhanced β -glucosidase. *Agric. Biol. Chem.* Tokyo, 50: 2477-2482.
- KAWAMORI, M.; Y. MORIKAWA; Y. SHINSHA; K. TAKAYAMA e S. TAKASAWA, 1985. Preparation of mutants resistant to catabolite repression of *Trichoderma reesei*. *Agric. Biol. Chem.* Tokyo, 49: 2875-2879.
- KNOX-DAVIES, P. S., 1967. Mitosis and aneuploidy in the vegetative hyphae of *Macrophomina phaseoli*. *Amer. J. Bot.* New York, 54: 1290-1295.
- KNOX-DAVIES, P. S. e J. G. DICKSON, 1960. Cytology of *Helminthosporium turcicum* and its ascigerous stage, *Trichometasphaeria turcica*. *Am. J. Bot.* New York, 47: 328-339.
- KUBICEK, C.P., 1981. Release of carboxymethyl-cellulase and β -glucosidase from cell walls of *Trichoderma reesei*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* New York, 13: 226-231.
- LABUDOVÁ, I. e V. FARKAS, 1983. Multiple enzyme forms in the cellulase system of *Trichoderma reesei* during its growth on cellulose. *Biochim. et Biophys. Acta*. Amsterdam, 744: 135-140.

- LANGSFORD, M. L.; N. R. GILKES; W. W. WAKARCHUK; D. G. KILBURN; R. C. MILLER JUNIOR e R. A. J. WARREN, 1984. The cellulase system of *Cellulomonas fimi*. *J. Gen. Microbiol.* London, 130: 1367-1376.
- LARPENT, J. P. e M. LARPENT-GOURGAUD, 1975. *Microbiologia prática*. São Paulo, Edgard Blücher. 162 p.
- LEE, C. H.; H. H. HOU e S. C. JONG, 1984. Cytology of *Helminthosporium oryzae*. *Mycopathologia*. Den Haag, 87: 23-27.
- LEE, G. M.; C. Y. CHOI; J. M. PARK e M. H. HAN, 1984. The properties of immobilized whole cell of *Humicola* spp. with rifamycin oxidase activity. *Biotechnol. Lett.* Kew, 6: 143-148.
- LEE, S. B.; H. S. SHIN; D. D. Y. RYU e M. MANDELS, 1982. Adsorption of cellulase on cellulose: effect of physicochemical properties of cellulose on adsorption and rate of hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* New York, 24: 2137-2153.
- LEE, Y. H. e L. T. FAN, 1980. Properties and mode of action of cellulase. *Adv. Biochem. Eng.* Berlin, 18: 101-129.
- LEHNINGER, A. L., 1976. *Bioquímica*. São Paulo, Edgard Blücher. v. 2, 436 p.
- LEPIDI, A. A.; M. P. NUTI, M. De BERTOLDI e M. SANTULLI, 1972. Classification of the genus *Humicola* Traaen: II. The DNA base composition of some strain within the genus. *Mycopath. Mycol. Appl.* Den Haag, 47: 153-159.

- LJUNGDAHL, L. G.; F. BRYANT, L. CARREIRA, T. SAIKI e J. WIEGEL, 1981. Some aspects of thermophilic and extreme thermophilic anaerobic microorganisms. In: HOLLAENDER, A., Ed. *Trends in the biology of fermentation for fuels and chemicals*. New York, Plenum Press. p. 397-419.
- LOWRY, O. H.; N. J. ROSEBROUGH; A. L. FARR e R. J. RANDALL, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* Baltimore, 193: 265-275.
- MACEDO, J. M. B., 1986. Avaliação do comportamento de *Humicola* sp com vistas ao melhoramento genético para produção de celulasas. Rio de Janeiro, U.F.R.J., 90 p. (Tese M. Sc.).
- MACRIS, B. J., 1984. Enhanced cellulase and β -glucosidase production by a mutant of *Alternaria alternata*. *Biotechnol. Bioeng.* New York, 26: 194-196.
- MANCZINGER, L. e L. FERENCZY, 1985. Somatic cell fusion of *Trichoderma reesei* resulting in new genetic combinations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Baltimore, 22: 72-76.
- MANDELS, M. e E. T. REESE, 1960. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J. Bacteriol.* Baltimore, 78: 816-826.
- MANDELS, M.; J. WEBER e R. PARIZEK, 1971. Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma reesei*. *Appl. Environ. Microbiol.* Washington, 2: 152-154.

- MARTIN JUNIOR, R. W. e C. E. MULLER, 1986. Ultrastructure of mitosis in the endoparasite *Olpidiopsis varians*. *Mycologia*. New York, 78: 11-21.
- MASIAS, O. R. e R. R. BERQUIST, 1974. Host-specific forms of *Trichometasphaeria turcica* in relation to homokaryons and heterokaryons in nature. *Phytopathology*. Lancaster, 64: 436-438.
- MATSUMURA, A. T. S., 1981. Aspectos da citologia e patogenicidade em uma população natural de *Trichometasphaeria turcica* Lutt. Porto Alegre, UFRGS, 80 p. (Dissertação de Mestrado).
- MAZIA, D., 1987. The chromosome cycle and the centrosome cycle in the mitotic cycle. *Int. Rev. Cytol.* New York, 100: 49-92.
- MCDONALD, C. E. e L. L. CHEN, 1965. The Lowry modification of the Folin reagent for determination of proteinase activity. *Anal. Biochem.* New York, 10: 175-177.
- McNITT, R., 1973. Mitosis in *Phlyctochytrium irregulare*. *Can. J. Bot.* Ottawa, 51: 2065-2074.
- MERIVUORI, H.; K. M. SIEGLER; J. A. SANDS e B. S. MONTENECOURT, 1985. Regulation of cellulase biosynthesis and secretion in fungi. *Biochem. Soc. Trans.* Essex, 13: 411-414.

- MILLER, G. L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* Washington, 31: 426-428.
- MISHA, S. e K. S. GOPALKRISHNAN, 1984. New method for isolation of cellulase constitutive mutants in *Trichoderma reesei* and partial characterization of one. *J. Ferment. Technol.* Osaka, 62: 495-500.
- MISHRA, M. M.; K. K. KAPOOR; M. K. JAIN e C. P. SINGH, 1981. Cellulase degradation by *Humicola lanuginosa*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* London, 76: 159-160.
- MOLONEY, A. P.; T. J. HACKETT; P. J. CONSIDINE e M. P. COUGHLAN, 1983. Isolation of mutants of *Talaromyces emersonii* CBS 814.70 with enhanced cellulase activity. *Enzyme Microbiol. Technol.* Guildford, 5: 260-264.
- MONTENECOURT, B. S. e D. E. EVELEICH, 1977a. Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. *Appl. Environ. Microbiol.* Washington, 34: 777-782.
- MONTENECOURT, B. S. e D. E. EVELEICH, 1977b. Semiquantitative plate assay for determination of cellulase production by *Trichoderma viride*. *Appl. Environ. Microbiol.* Washington, 33: 178-183.

- MONTENECOURT, B. S.; D. H. J. SCHAMHART e D. E. EVELEIGH, 1979. Mechanisms controlling the synthesis of the *Trichoderma reesei* cellulase system. In: BERKELEY, R. C. W.; G. W. GOODAY e D. C. ELLWOOD, Ed. *Microbial Polysacharides and Polysacharases*. New York, Academic Press. p. 327-337.
- MONTENECOURT, B. S.; T. J. KELLEHER, D. E. EVELEIGH e L. G. PETTERSSON, 1980. Biochemical nature of cellulases from mutants of *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* New York, 10: 15-26.
- MONTENECOURT, B. S.; S. D. NHLAPO, H. T. VASQUEZ, S. CUSKEY; D. H. J. SCHAMHART e D. E. EVELEIGH, 1981. Regulatory controls in relation to over-production of fungal cellulases. In: HOLLAENDER, A. Ed. *Trends in the biology of fermentations for fuels and chemicals*. New York, Plenum Press, p. 33-53.
- MONTI, R. e J. A. JORGE, 1986. Cellulase production in *Humicola* sp. R. P. 17. *Arq. Biol. Tecnol.* Curitiba, 29: 42.
- MONTI, R. e J. A. JORGE, 1987. Purification of a extracellular xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* R. P. 17. *Arq. Biol. Tecnol.* Curitiba, 30: 103.

- MORAES, M. L. T.; R. A. PRADE e H. F. TERENCE, 1985.
Characterization of the β -glucosidase system of the
cellulolytic fungus *Humicola* sp. *Arq. Biol. Tecnol.*
Curitiba, 28: 57.
- MORIKAWA, Y.; M. KAWAMORI; Y. ADO; Y. SHINSHA; F. ODA e S.
TAKASAWA, 1985. Improvement of cellulase production in
Trichoderma reesei. *Agric. Biol. Chem. Tokyo*, 49:
1869-1871.
- MOUBASHER, A. H.; S. I. I. ABDEL-HAFEZ, H. M. ABDEL-FATTAH e
A. M. MOHARRAM, 1982. Fungi of wheat and broad-bean straw
composts. *Mycopathologia*. Den Haag, 78: 169-176.
- MUNSELL, 1976. Book of color. Neighbouring hues edition.
Matte Finish Collection Macbeth Division of Koolmorgen
Corporation, Baltimore. n.p.
- NAKAYAMA, M.; Y. TOMITA; H. SUZUKI e K. NISIZAWA, 1976.
Partial proteolysis of some cellulase components from
Trichoderma viride and the specificity of the modified
products. *J. Biochem. Tokyo*, 79: 955-966.
- NAMAI, T. e S. YAMANAKA, 1983. A component contained in oat
meal that favours the sporulation of rice blast fungus,
Pyricularia oryzae Cavara. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*.
Tokyo, 49: 274-276.

- NANDA, M.; V. S. BISARIA e T.K. GHOSE, 1986. Effect of L(-) sorbose on cellulase activity in *Trichoderma reesei* QM 9414. *J. Gen. Microbiol.* London, 132: 3201-3207.
- NEIROTTI, E.; Y. TANAKA e J. L. AZEVEDO, 1987. Estudo do processo de obtenção de protoplastos em *Humicola* sp. In: Anais do 5º Encontro de Geneticistas Paulistas, Piracicaba, SBG/ESALQ, v.5, p. 23. (Resumo).
- NEVALAINEN, K. M. H.; E. T. PALVA e M. J. BAILEY, 1980. A high cellulase-producing mutant strain of *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microbiol. Technol.* Guildford, 2: 59-60.
- PARADELA FILHO, O. e W. J. SILVA, 1986. Variability in *Fusarium moniliforme*. *Summa Phytopathol.* Piracicaba, 12: 125-131.
- PARMETER JÚNIOR, J. R.; W. C. SNYDER e R. E. REICHLE, 1963. Heterokaryosis and variability in plant-pathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* Palo Alto: 1: 51-78.
- PERALTA, R. M. e J. A. JORGE, 1987. Glucosidase enzyme in *Humicola grisea* var. *thermoidea* R. P. 17. *Arq. Biol. Technol.* Curitiba, 30: 102.
- PIZZIRANI, A. A., 1977. Características, propriedades e estabilização de dissômicos em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 111 p. (Dissertação de Mestrado).

- POLIZELI, M. L. T. M. e H. F. TERENZI, 1986. Study of the β -glucosidase activity of the fungus *Humicola* sp. *Arq. Biol. Tecnol. Curitiba*, 29: 44.
- PONTECORVO, G.; J. A. ROPER; L. M. HEMMONS; K. D. McDONALD e A. W. J. BUFTON, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advan. Gen.* New York, 5: 141-238.
- PUHALLA, J. E., 1979. Classification of isolates of *Verticillium dahliae* based on heterokaryon incompatibility. *Phytopathology*. Lancaster, 69: 1186-1189.
- PUHALLA, J. E., 1984. A visual indicator of heterokaryosis in *Fusarium oxysporium* F. sp. *apii* from celery. *Can. J. Bot.* Ottawa, 62: 540-545.
- RAO, M.; V. DESHPANDE e C. MISHRA, 1986. Purification, characterization and synergistic action of endoglucanases from *Fusarium lini*. *Biotechnol. Bioeng.* New York, 28: 1100-1105.
- REESE, E. T.; R. G. H. SIV e H. S. LEVINSON, 1950. The biological degradation of soluble cellulase derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.* Baltimore, 59: 485-497.
- ROBINOW, C. F. e A. BAKERSPIGEL, 1965. Somatic nuclei and forms of mitosis in fungi. In: AINSWORTH, G. C. e A. S. SUSSMAN, Eds. *The Fungi: an advanced treatise*. New York, Academic Press, p. 119-142.

- ROBINOW, C. F. e C. E. CATEN, 1969. Mitosis in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell. Sci.* London, 5: 403-431.
- ROSATO, Y. B., 1973. Efeitos do etil metano sulfonato e acriflavina na instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP, 74 p. (Dissertação de Mestrado).
- ROSS, A.; K. SCHÜGERL e W. SCHEIDING, 1983. Cellulase production by *Trichoderma reesei*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* New York, 18: 29-37.
- RYAZANOVA, E. M.; Ya. V. FLYAKH e V. V. SUKHODOLETS, 1985. The formation of heterokaryons by *Trichothecium roseum* morfological mutants. *Mikrobiologiya*, 54: 930-934. Apud *Biol. Abstr.* Philadelphia, 82(3): 94.
- RYU, D. D. Y. e M. MANDELS, 1980. Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme Microbiol. Technol.* Guildford, 2: 91-102.
- RYU, D. D. Y.; C. KIM e M. MANDELS, 1984. Competitive adsorption cellulase components and its significance in a synergistic mechanism. *Biotechnol. Bioeng.* New York, 26: 488-496.
- SANFORD, G. B. e W. P. SKOROPAD, 1955. Distribution of nuclei in hyphal cells of *Rhizoctonia solani*. *Can J. Microbiol.* Ottawa, 1:412-415.

- SCHIMENTI, J.; T. GARRETT; B. S. MONTENECOURT e D. E. EVELEIGH, 1983. Selection of hypercellulolytic mutants of *Trichoderma reesei* based on resistance to nystatin. *Mycologia*. New York, 75: 876-880.
- SGUROS, P. L.; J. RODRIGUES e J. SIMMS, 1973. Role of marine fungi in the biochemistry of the oceans: V. Patterns of constitutive nutritional growth responses. *Mycologia*. New York, 65: 161-174.
- SHENOLIKAR, S. e K. J. STEVENSON, 1982. Purification and partial characterization of a thiol proteinase from the thermophilic fungus *Humicola lanuginosa*. *Biochem. J.* Cambridge, 205: 147-152.
- SHEWALE, J. G. e J. C. SADANA, 1978. Cellulase and β -glucosidase production by a basidiomycete species. *Can J. Microbiol.* Ottawa, 24: 1204-1216.
- SIDDIQI, O. H., 1962. Mutagenic action of nitrous acid on *Aspergillus nidulans*. *Gen. Res.* London, 3: 303-314.
- SIDHU, G. S., 1983. Sexual and parasexual variability in soil fungi with special reference to *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*. Lancaster, 73: 952-955.
- SOMERS, C. E.; R. P. WAGNER e T. C. HSU, 1960. Mitosis in vegetative nuclei of *Neurospora crassa*. *Genetics*. Princeton, 45: 801-810.

- SUBRAHMANYAM, A., 1980. A new thermophilic variety of *Humicola grisea* var. *indica*. *Curr. Sc.* Bangarole, 49: 30-31.
- TANAKA, Y., 1976. Karyological studies on variation of the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cav. Tokio, Univ. Nihon, 218 p. (Tese de Doutorado - Ph-D).
- TANAKA, Y., 1982. Basic study of breeding for resistance to rice blast (*Pyricularia oryzae* Cav) disease in Brasil. In: EMBRAPA/CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE ARROZ E FEIJÃO, 2. *Annual report*. Goiânia, p. 17-19.
- TANAKA, Y.; N. MURATA e 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., 1971. Isolation of thermophilic fungi from self-heated, industrial wood chip piles. *Mycologia*. New York, 63: 537-547.
- TINLINE, R. D., 1961. *Cochliobolus sativus*: IV. Drug resistant, color, and nutritionally exacting mutants. *Can. J. Botany*. Ottawa, 39: 1695-1704.
- TINLINE, R. D., 1962. *Cochliobolus sativus*: V. Heterokaryosis and parasexuality. *Can. J. Botany*. Ottawa, 40: 425-437.

- TINLINE, R. D.; J. F. STAUFFER e J. G. DICKON, 1960.
Cochliobolus sativus: III. Effect of ultraviolet radiation.
Can. J. Botany. Ottawa, 38: 274-284.
- TOYAMA, H.; K. YAMAGUCHI; A. SHINMYO e H. OKADA, 1984.
Protoplast fusion of *Trichoderma reesei*, using immature conidia. *Appl. Environ. Microbiol.* Washington, 47: 363-368.
- TURIAN, G. e E. C. CANTINO, 1960. A study of mitosis in the mold *Blastocladiella* with a ribonuclease-acetoorcein staining technique. *Cytologia*. Tokyo, 25: 101-107.
- VAHERI, M. P.; M. E. O. VAHERI e V. S. KAUPPINEN, 1979.
Formation and release of cellulolytic enzymes during growth of *Trichoderma reesei* on cellobiose and glycerol. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* New York, 8: 73-80.
- VALK, P. VAN DER e R. MARCHANT, 1978. Hyphal ultrastructure in the fruit body primordia of the basidiomycetes *Schizophyllum commune* and *Coprinus cinereus*. *Protoplasma*. Leipzig, 95: 57-72.
- VIEIRA, E. e R. A. PRADE, 1986. Production of cellulases and xylanases: effect of catabolite repression on enzyme synthesis in *Trichoderma reesei* QM 9414, *Aspergillus phoenicis* and *Humicola nigricans*. *Arq. Biol. Tecnol.* Curitiba, 29: 43.

- WALI, A. e A. K. MATTOO, 1984. Malate dehydrogenase from thermophilic *Humicola lanuginosa* and *Mucor pusillus*: purification and comparative properties of the enzymes with differing thermostabilities. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* Ottawa, 62: 559-565.
- WHITE, W. L. e M. H. DOWNING, 1953. *Humicola grisea*, a soil-inhabiting cellulolytic Hypomycete. *Mycologia*. New York, 45: 951-963.
- WILLICK, G. E. e V. L. SELIGY, 1985. Multiplicity in cellulases of *Schizophyllum commune*. *Eur. J. Biochem.* Berlin, 151: 89-96.
- WOOD, T. M., 1985. Properties of cellulolytic enzyme systems. *Biochem. Soc. Trans.* Essex, 13: 407-410.
- WOOD, T. M. e S. I. Mc CRAE, 1972. The purification and properties of the C₁ component of *Trichoderma koningii* cellulase. *Biochem. J.* Cambridge, 128: 1183-1192.
- WOOD, T. M. e S. I. Mc CRAE, 1978. The cellulase of *Trichoderma koningii*. Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase. *Biochem. J.* Cambridge, 171: 61-72.

- WOOD, T. M. e S. I. Mc CRAE, 1982. Purification and some properties of the extracellular β -D-glucosidase of the cellulolytic fungus *Trichoderma koningii*. *J. Gen. Microbiol.* London, 128: 2973-2982.
- WOOD, T. M.; S. I. Mc CRAE e C. C. MACFARLANE, 1980. The isolation, purification and properties of the cellobiohydrolase component of *Penicillium funiculosum* cellulase. *Biochem. J.* Cambridge, 189: 51-65.
- YOSHIOKA, H. e S. HAYASHIDA, 1980. Purification and properties of β -glucosidase from *Humicola insolens* YH-8. *Agric. Biol. Chem.* Tokyo, 44: 1729-1735.
- YOSHIOKA, H.; S. I. ANRAKU e S. HAYASHIDA, 1982. Production and purification of a novel type of CMCase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* YH-78. *Agric. Biol. Chem.* Tokyo, 46: 75-82.
- ZIMMERMANN, A. L. S. e J. A. JORGE, 1987. Trehalase activity in *Humicola grisea* var. *thermoidea* R. P. 17. *Arq. Biol. Tecnol.* Curitiba, 30: 102.