RECOMBINAÇÃO GENÉTICA E PRODUÇÃO DE CELULASES EM
Trichoderma pseudokoningii VAR. RIFAI

MÁRCIA CRISTINA FURLANETO

ORIENTADOR: Prof.^a Dra. Aline Ap. Pizzirani-Kleiner

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Microbiologia Agrícola.

P I R A C I C A B A
ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL
AGOSTO - 1989

Furlaneto, Márcia Cristina

F985r Recombinação genética de celulasas em *Trichoderma pseudokoningii* var. Rifai. Piracicaba, 1989.

152p.

Diss.(Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

1. Celulase - Produção microbiana 2. Enzima microbiana - Produção 3. Fungo imperfeito - Bioquímica 4. Fungo imperfeito - Recombinação genética I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 589.24

RECOMBINAÇÃO GENÉTICA E PRODUÇÃO DE CELULASES EM

Trichoderma pseudokoningii VAR. RIFAI

MÁRCIA CRISTINA FURLANETO

Aprovada em: 31/08/89

Comissão julgadora:

- Prof.^a Dra. Aline Ap. Pizzirani-Kleiner ESALQ/USP
- Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo ESALQ/USP
- Dr. Itamar Soares de Melo CNPDA/EMBRAPA

Prof.^a Dra. ALINE AP. PIZZIRANI-KLEINER
Orientador

Aos meus *país*,
Olintho Furlaneto e
Rosa Gonçalves Furlaneto,
pelo exemplo de vida e amor,

DEDICO

À minha *irmã*, *Luciana*,
As *amigas*, *Maria Cléria e*
Ângela Teresa,
por tudo que são e significam,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial:

- À *Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner*, pela orientação, amizade e confiança constantes;
- Ao *Dr. João Lúcio de Azevedo*, pelas sugestões, incentivo e amizade;
- Aos *Colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos*, pela preciosa convivência e colaboração constante;
- Aos funcionários *Sandra R. Rocha*, *Carlos A. Nolasco* e em particular ao *Sr. Antônio Rocha Campos*, pela eficiência nos serviços técnicos prestados e amizade;
- Aos *Professores, Funcionários e Amigos do Departamento de Genética*, pelo saudável convívio;
- Aos *Funcionários do Departamento de Tecnologia Rural*, em especial à *Regina Lúcia M. Lourenço*, pela excelente prestação de serviços;
- À *Bibliotecária Beatriz Helena Giongo*, pelo auxílio na revisão das referências bibliográficas;
- À *Bibliotecária Nilce T. Puga* e funcionárias *Terezinha* e *Dna. Olívia*, pela amizade e auxílio constantes;
- Ao *José Sebastião Cunha*, pela confecção das análises estatísticas e amizade;
- Ao *Cláudio Costa*, pela carinhosa amizade e versão do "Summary";

.iii.

- À Prof.^a Maria José dos Santos Fernandes, da Universidade de Pernambuco, pela identificação da linhagem utilizada no presente trabalho;
- Ao Sr. Cleusval Bissi, pelo eficiente trabalho datilográfico, ao Romeu A. Rocha, pelo desenho das Figuras e Maria Helena Redi, pela confecção das Tabelas.
- Ao Sr. Milton Caprecci e Sr. Yoge Komatsu, pelas fotografias;
- Ao Departamento de Genética e Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, por terem me propiciado o treinamento;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.
- À Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP, sub programa Biotecnologia/Energia do programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - PADCT, pelos recursos financeiros da pesquisa.

I N D I C E

	<u>Página</u>
LISTA DE FIGURAS.	xiii
LISTA DE TABELAS.	xiv
RESUMO.	xxi
SUMMARY	xxiv
1. INTRODUÇÃO.	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Aspectos biológicos do gênero <i>Trichoderma</i> . .	4
2.1.1. <i>Trichoderma pseudokoningii</i> var. Rifai . .	8
2.2. Celulases de fungos.	9
2.2.1. Enzimas celulolíticas e modo de ação	9
2.2.2. Indução e repressão.	14
2.2.3. Fatores que influem na hidrólise da celulose.	17
2.2.4. Métodos para a determinação da ati- vidade celulolítica	19
2.3. Genética e melhoramento para a produção de celulases em <i>Trichoderma</i>	22
2.3.1. Técnica de mutação-seleção.	22
2.3.2. Técnicas modernas de recombinação..	28

3. MATERIAL E MÉTODOS.	31
3.1. Espécies utilizadas.	31
3.1.1. <i>Trichoderma pseudokoningii</i> var. Rifai . .	31
3.1.2. <i>Trichoderma reesei</i> QM9414. . . , . . .	31
3.2. Meios de cultura e soluções utilizadas . .	31
3.2.1. Meio Mínimo (PONTECORVO <i>et alii</i> , 1953)	31
3.2.2. Meio Completo (PONTECORVO <i>et alii</i> , 1953, modificado por AZEVEDO & COS- TA, 1973).	32
3.2.3. Meio Mínimo Líquido (PONTECORVO <i>et</i> <i>alii</i> , 1953).	32
3.2.4. Meio Completo Líquido (PONTECORVO <i>et alii</i> , 1953), modificado por AZE- VEDO & COSTA, 1973).	32
3.2.5. Meio Mineral para celulolítico (AMA RAL <i>et alii</i> , 1967).	33
3.2.5.1. Celulose ácida	33
3.2.6. Meio Completo 2 x concentrado . . .	34
3.2.7. Meio Mínimo mais 4% de Meio Comple- to.	34
3.2.8. Solução de vitaminas.	34
3.2.9. Solução de ácido nucleico de leve- duras.	35

Página

3.2.10. Solução de caseína Hidrolisada. . .	35
3.2.11. Suplementos adicionados ao Meio Mínimo.	35
3.2.12. Solução salina (0,85% P/V).	36
3.2.13. Solução de "Tween-80" (0,1% V/V). . .	36
3.2.14. Solução de desoxicolato de Sódio (10% P/V).	36
3.2.15. Solução de albumina 5% (V/V) (ROBINOW & CATEN, 1969).	37
3.2.16. Solução de Giemsa	37
3.2.17. Solução de HCl 1N	37
3.2.18. Tampão fosfato 0,125 M pH 7,0 . . .	37
3.2.19. Tampão fosfato 0,02 M pH 5,8. . . .	38
3.2.20. Tampão fosfato pH 7,0.	38
3.2.21. Tampão acetato pH 4,4	39
3.2.22. Tampão Mc Ilvaine's pH 5,8.	39
3.2.23. Solução de nitrito de sódio	40
3.2.24. Solução de benlate (HASTIE, 1970)..	40
3.2.25. Solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,2 M.	40
3.2.26. Solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6 M.	40
3.2.27. Solução de enzimas para produção de protoplastos (HAMLYN <i>et alii</i> , 1981)	41
3.2.28. Solução de polietilenoglicol 6000 (PEG).	41

3.2.29. Reagentes utilizados para eletrofo- rese em gel de poliacrilamida (PACCO- LA-MEIRELLES <i>et alii</i> , 1988).	41
3.2.29.1. Solução estoque de acrilamida.	42
3.2.29.2. Tampão do gel separador pH 8,9.. . . .	42
3.2.29.3. Tampão do gel empilhador pH 6,8.	42
3.2.29.4. Tampão do tanque pH 8,9.	43
3.2.29.5. Gel separador a 10%.	43
3.2.29.6. Gel empilhador a 4%.	43
3.2.29.7. Tampão da amostra.	44
3.2.29.8. Soluções estoques usadas para a revelação de esterases: a) Al- fa-naftil acetato 1% P/V em Solu ção aquosa de acetona 50%; b) Be ta-naftil acetato 1% P/V em solu ção aquosa de acetona 50%.	44
3.2.29.9. Corante para a caracterização de esterases.	44
3.3. Sistema de filtro para técnica de enrique- cimento.	45
3.4. Uso de palitos para transferência de colô- nias.	45
3.5. Esterilização e incubação.	45
3.6. Verificação de crescimento em diferentes meios de cultivo.	45

3.7. Determinação de condições ótimas de crescimento.	46
3.7.1. Avaliação de crescimento em meio completo e meio mineral para celulo lítico em diferentes pHs (5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 6,8; 7,0 e 7,5) a 28°C. A inoculação foi feita no centro da placa de cultura.	46
3.8. Determinação da redução de colônia pelo em prego de desoxicolato de sódio	46
3.9. Verificação do número de núcleos por coní dios (TANAKA <i>et alii</i> , 1979).	46
3.10. Sobrevivência a mutagênicos.	47
3.10.1. Sobrevivência a luz ultravioleta..	47
3.10.2. Sobrevivência ao ácido nitroso (SIDDIQI, 1962).	48
3.11. Obtenção de mutantes morfológicos e auxo- tróficos com luz ultravioleta.	49
3.11.1. Mutantes obtidos por isolamento to tal.	49
3.11.2. Determinação do tempo de enrique- cimento por filtração para obten- ção de mutantes auxotróficos. . . .	50
3.11.3. Mutantes obtidos através de enri- quecimento por filtração.	51
3.11.4. Teste de reversão.	52

	<u>Página</u>
3.12. Análise genética.	52
3.12.1. Obtenção de heterocários	52
3.12.2. Isolamento de colônias prototrôfi- cas e outros tipos de recombinan- tes.	53
3.12.3. Avaliação de colônias prototróficas	53
3.12.4. Análise de recombinantes.	54
3.13. Teste de produção semiquantitativa de enzi- mas celulolíticas.	55
3.14. Isolamento e regeneração de protoplastos..	55
3.14.1. Obtenção de protoplastos (HAMLYN <i>et</i> <i>alii</i> , 1981).	55
3.14.2. Coloração de protoplastos (BORGES, 1987).	56
3.15. Fusão de protoplastos.	57
3.15.1. Obtenção dos produtos de fusão e análise genética	58
3.16. Teste de produção semiquantitativa de enzi- mas celulolíticas em colônias originadas de protoplastos regenerados.	58
3.17. Técnicas eletroforéticas(PACCOLA-MEIRELLES <i>et alii</i> , 1988).	59
3.17.1. Preparo de amostra	59
3.17.2. Preparo da placa de gel de acríla- mida.	59

3.17.3. Coloração para revelação de este- rases.	60
3.18. Análise estatística.	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.	61
4.1. Aspectos biológicos de <i>T. pseudokoníngii</i> var. Rifai	61
4.1.1. Determinação de condições ótimas de crescimento.	61
4.1.2. Determinação da redução de colônia pelo emprego de desoxicolato de sô- dio.	62
4.1.3. Verificação do número de núcleo por conídio	67
4.2. Sobrevivência à mutagênicos.	67
4.2.1. Sobrevivência à luz ultravioleta.	67
4.2.2. Sobrevivência ao ácido nitroso.	71
4.3. Obtenção de mutantes morfológicos e auxo- tróficos.	74
4.3.1. Mutantes morfológicos obtidos atra- vés de irradiação com luz ultravio- leta e tratamento com ácido nitroso	74
4.3.2. Mutantes auxotróficos simples obti- dos com luz ultravioleta, através de isolamento total.	76

4.3.3. Determinação do tempo de enriquecimento por filtração para obtenção de mutantes auxotróficos.	76
4.3.4. Mutantes auxotróficos duplos obtidos com luz ultravioleta através de isolamento total e enriquecimento por filtração.	80
4.4. Teste de reversão.	83
4.5. Atividade celulolítica da linhagem selvagem de <i>T. pseudokoningii</i> e mutantes. . . .	85
4.6. Técnicas genéticas.	90
4.6.1. Obtenção de heterocários.	90
4.6.2. Obtenção de colônias prototróficas e outros tipos de recombinantes . .	92
4.6.3. Análise genética.	95
4.6.3.1. Avaliação de colônias prototróficas.	95
4.6.3.2. Análise dos recombinantes.	99
4.7. Atividade celulolítica de colônias prototróficas dicarióticas e recombinantes obtidos de heterocários.	107
4.8. Protoplastos de <i>T. pseudokoningii</i>	115
4.8.1. Obtenção e regeneração.	115
4.8.2. Fusão de protoplastos	118

4.8.3. Atividade celulolítica em colônias originadas de protoplastos regenera- dos.	125
4.9. Caracterização eletroforética da linhagem selvagem e mutantes de <i>T. pseudokoningii</i> ..	130
5. CONCLUSÕES.	133
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	135

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1 - Coloração de conídios de <i>T. pseudokoningii</i> . (aumento de 1000 x).	68
2 - Curva de sobrevivência de <i>T. pseudokoningii</i> à luz ultravioleta.	70
3 - Curva de sobrevivência de <i>T. pseudokoningii</i> ao ácido nitroso.	73
4 - Percentagem relativa entre colônias auxotrô- ficas e prototróficas por tempo de cultivo em meio mínimo.	79
5 - Halos de degradação da celulose	88
6 - Setores provenientes de colônias prototróficas do heterocário TY ₅ UV ₈ rib ade ₂ + TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁ , produzindo novos setores em MC.	98
7 - Colônia prototrófica, resultante do cruzamento TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁ + TGUV ₇ nic ₃ met ₃ , via fusão de protoplasto, emitindo setor recombinante bran- co.	121
8 - Padrões de α -esterase em linhagem selvagem e mutantes de <i>T. pseudokoningii</i>	131

LISTA DE TABELAS

TabelaPágina

- 1 - Avaliação do pH ótimo para crescimento da linhagem selvagem de *Trichoderma pseudokoningii* var. Rifai à 28°C em meio completo (MC) e meio mineral para celulolítico (ÇA). 63
- 2 - Redução do diâmetro de colônias de *T. pseudokoníngii* pelo emprego de desoxicolato de sódio, crescidas em meio completo. (Os dados constituem média de 3 repetições). 64
- 3 - Redução do diâmetro de colônias de *T. pseudokoníngii* pelo emprego de desoxicolato de sódio, crescidas em meio mineral para celulolítico. (Os dados constituem média de 3 repetições). 65
- 4 - Número e percentagem relativa de conídios de *T. pseudokoníngii* sobreviventes à luz ultravioleta. (Os dados constituem média de 3 repetições). 69
- 5 - Número e percentagem relativa de conídios de *T. pseudokoníngii* sobreviventes ao ácido nitroso. (Os dados constituem média de 3 repetições). 72
- 6 - Mutantes morfológicos de *T. pseudokoníngii* obtidos através de irradiação com luz ultravioleta e tratamento com ácido nitroso.. 75

TabelaPágina

7 - Mutantes auxotróficos simples de <i>T. pseudokoningii</i> obtidos com luz ultravioleta através de isolamento total.	77
8 - Percentagem relativa do número de colônias selvagens e mutantes de <i>T. pseudokoningii</i> para os diferentes tempos de agitação após filtração. (Os dados constituem média de 2 repetições).	78
9 - Mutantes auxotróficos duplos de <i>T. pseudokoningii</i> obtidos com luz ultravioleta através de isolamento total e enriquecimento por filtração.	81
10 - Frequência de obtenção de mutantes auxotróficos duplos de <i>T. pseudokoningii</i> através de isolamento total e enriquecimento por filtração.	82
11 - Frequência de reversão em 10^6 a 10^7 conídios/ml dos mutantes auxotróficos duplos de <i>T. pseudokoningii</i>	84
12 - Diâmetro das colônias, colônias +halo e índice enzimático do mutante QM9414 de <i>T. reesei</i> , da linhagem selvagem de <i>T. pseudokoningii</i> e alguns mutantes auxotróficos simples e duplos. (Os valores dados em cm constituem média de 3 repetições).	86

TabelaPágina

13 - Análise de variância da atividade celulolítica do mutante QM9414 de <i>T. reesei</i> , da linhagem selvagem de <i>T. pseudokoningii</i> e mutantes auxotróficos simples e duplos. . . .	87
14 - Teste de Tukey, para médias de índice enzimático, do mutante QM9414 de <i>T. reesei</i> , da linhagem selvagem de <i>T. pseudokoningii</i> e mutantes auxotróficos simples e duplos. . . .	87
15 - Vigor do heterocário entre diferentes mutantes de <i>T. pseudokoningii</i>	90
16 - Frequência de colônias resultantes de heterocário entre TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁ + TGV ₇ nic ₃ met ₃ nos diferentes meios seletivos.	93
17 - Frequência de colônias resultantes do heterocário entre TGV ₇ arg ₁ rib + TY ₅ UV ₈ leu lis nos diferentes meios seletivos.	93
18 - Frequência de colônias resultantes do heterocário entre TY ₅ UV ₈ rib arg + TW ₄ UV ₇ leu tio nos diferentes meios seletivos.	94
19 - Frequência de colônias resultantes do heterocário entre TY ₅ UV ₈ rib ade ₂ + TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁ nos diferentes meios seletivos.	94
20 - Frequências de produtos recombinantes de <i>T. pseudokoningii</i> a partir de colônias prototróficas.	96

TabelaPágina

21 - Frequência de produtos recombinantes de <i>T. pseudokoningii</i> obtidos diretamente de heterocário.	99
22 - Frequência de recombinantes a partir do heterocário de TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁ + TGV ₇ nic ₃ met ₃ em diferentes meios seletivos.	100
23 - Frequência de recombinantes a partir do heterocário de TGV ₇ arg ₁ rib + TY ₅ UV ₈ leu lis em diferentes meios seletivos.	101
24 - Frequência de recombinantes a partir do heterocário de TY ₅ UV ₈ rib arg + TW ₄ UV ₇ leu tio em diferentes meios seletivos.	102
25 - Frequência de recombinantes a partir do heterocário de TY ₅ UV ₈ rib ade ₂ + TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁ em diferentes meios seletivos.	103
26 - Diâmetro das colônias, colônias + halo e índice enzimático dos recombinantes parentais e colônias dicarióticas, obtidos a partir de TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁ + TGV ₇ nic ₃ met ₃ . (Os valores dados em cm, constituem média de 3 repetições)..	107
27 - Análise de variância da atividade celulolítica dos recombinantes, parentais e colônias dicarióticas obtidos a partir de TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁ + TGV ₇ nic ₃ met ₃	108

TabelaPágina

- 28 - Teste de Tukey, para médias de índices enzimáticos dos recombinantes, parentais e colônias dicarióticas obtidos a partir de TW₄UV₇ leu₁ arg₁ + TGV₇ nic₃ met₃. 108
- 29 - Diâmetro das colônias, colônias + halo e índice enzimático dos recombinantes parentais e colônias dicarióticas, obtidos a partir de TGV₇ arg₁ rib + TY₅UV₈ leu lis. (Os valores dados em cm, constituem média de 3 repetições). 109
- 30 - Diâmetro das colônias, colônias + halo e índice enzimático dos recombinantes, parentais e colônias dicarióticas, obtidos a partir de TGV₇ arg₁ rib + TY₅UV₈ leu lis. (Os valores dados em cm, constituem média de 3 repetições). 109
- 31 - Diâmetro das colônias, colônias + halo e índice enzimático dos recombinantes, parentais e colônias dicarióticas obtidas a partir de TY₅UV₈ rib arg + TW₄UV₇ leu tio. (Os valores dados em cm, constituem média de 3 repetições). 110
- 32 - Análise de variância da atividade celulolítica dos recombinantes, parentais e colônias dicarióticas obtidos a partir de TY₅UV₈ rib arg₁ + TW₄UV₇ leu tio. 111

TabelaPágina

33 - Teste de Tukey, para médias de índices enzimáticos, dos recombinantes, parentais e colônias dicarióticas obtidos a partir de TY ₅ UV ₈ rib arg + TW ₄ UV ₇ leu tio.	111
34 - Diâmetro das colônias, colônia + halo e índice enzimático dos recombinantes, parentais e colônias dicarióticas obtidos a partir de TY ₅ UV ₈ rib ade ₂ + TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁ . (Os valores dados em cm, constituem média de 3 repetições).	112
35 - Análise de variância da atividade celulolítica dos recombinantes, parentais e colônias dicarióticas obtidos a partir de TY ₅ UV ₈ rib ade ₂ + TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁	113
36 - Teste de Tukey, para médias de índices enzimáticos, dos recombinantes, parentais e colônias dicarióticas obtidos a partir de TY ₅ UV ₈ rib ade ₂ + TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁	113
37 - Número de protoplastos obtidos e frequência de regeneração da linhagem selvagem de <i>T. pseudokoningii</i> e alguns mutantes em (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,6M.	116
38 - Frequência de número de núcleos em protoplastos da linhagem selvagem de <i>Trichoderma pseudokoningii</i> var. Rifai.	117

TabelaPágina

39 - Frequência de colônias obtidas de TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁ +TGUV ₇ nic ₃ met ₃ , via fusão de protoplastos, em diferentes meios seletivos.	118
40 - Frequência de produtos recombinantes, obtidos de TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁ +TGUV ₇ nic ₃ met ₃ , via fusão de protoplastos, a partir de colônias prototróficas.	120
41 - Frequência de produtos recombinantes, obtidos no cruzamento de TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁ +TGUV ₇ nic ₃ met ₃ , via fusão de protoplastos.	123
42 - Frequência de produtos recombinantes obtidos no cruzamento de TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁ +TGUV ₇ nic ₃ met ₃ , via fusão de protoplastos, em diferentes meios seletivos.	124
43 - Índice enzimático para atividade celulolítica de colônias originadas de conídios e de protoplastos regenerados de <i>T. pseudokoningii</i> . (Os dados constituem média de 3 repetições).	127
44 - Análise de variância para atividade celulolítica de colônias de <i>T. pseudokoningii</i> originadas de conídios e protoplastos.	128
45 - Teste de Tukey para médias de índice enzimático de colônias de <i>T. pseudokoningii</i> originadas de conídios e protoplastos.	128

RECOMBINAÇÃO GENÉTICA E PRODUÇÃO DE CELULASES EM

Trichoderma pseudokoningii VAR. RIFAI

AUTOR: MÁRCIA CRISTINA FURLANETO

ORIENTADOR: Prof.^a Dra. ALINE AP. PIZZIRANI-KLEINER

RESUMO

No presente trabalho foram realizados estudos genéticos em *Trichoderma pseudokoningii* e verificada a atividade celulolítica da linhagem selvagem, mutantes e recombinantes obtidos de heterocários.

Com o objetivo de se obter mutantes auxotróficos, testou-se dois agentes mutagênicos, a luz ultravioleta e o ácido nitroso, e dois métodos de isolamento de mutantes, o de enriquecimento por filtração e o de isolamento total. Através de irradiação com luz ultravioleta foram obtidos dezenove mutantes auxotróficos simples e dezoito com dupla deficiência, e dois mutantes morfológicos com ácido nitroso. O rendimento médio obtido através do método de enriquecimento foi de 1,64 vezes maior em relação ao isolamento total.

Sete mutantes com dupla marcas auxotróficas e morfológicas foram utilizados para a obtenção de heterocários. Colônias recombinantes foram obtidas diretamente dos heterocários em diferentes meios seletivos, sugerindo a ocorrência de parameiose nesta espécie. Colônias prototró-

ficas crescidas em MM eram binucleadas e de coloração verde, indicando um sistema não autônomo para a pigmentação de conídios. Estas colônias dicarióticas formaram setores em MC acrescido de benomyl, sugerindo a ocorrência de uma fase diplóide altamente instável. Foi descrito um método para a obtenção e fusão de protoplastos. Colônias recombinantes foram recuperadas diretamente de produtos de fusão, numa frequência aproximadamente 1000 vezes superior em relação às obtidas a partir do heterocário, indicando uma maior eficiência desta via para cruzamento. A ocorrência de paramiose foi observada também através de fusão de protoplastos.

Quanto a atividade celulolítica da linhagem selvagem e mutantes, observou-se que os valores de índices enzimáticos foram diretamente proporcionais ao maior ou menor grau de compactação das colônias. Recombinantes obtidos de dois dos heterocários analisados, apresentaram médias de índices enzimáticos superiores ou iguais aos parentais que lhes deram origem.

Colônias de linhagem selvagem originadas de protoplastos regenerados apresentaram índices de atividade celulolítica inferiores em relação às colônias originadas de conídios, indicando um efeito negativo da protoplastização sobre a atividade enzimática.

.xxiii.

Padrões eletroforéticos para esterase da linhagem selvagem e mutantes utilizados nos cruzamentos, apresentaram diferentes perfis, em número e posição de bandas. Pode-se sugerir uma relação entre padrão das bandas e colocação de conídios.

GENETIC RECOMBINATION AND CELLULASE PRODUCTION IN

Trichoderma pseudokoningii VAR. RIFAI

AUTHOR: MÁRCIA CRISTINA FURLANETO

ADVISER: Prof.^a Dra. ALINE AP. PIZZIRANI-KLEINER

SUMMARY

In this work genetic studies were carried out in *Trichoderma pseudokoningii* in order to test the cellulolytic activity in wild and mutant strains and recombinants obtained from heterokaryons.

Two mutagenic agents were tested aiming to obtain auxotrophic mutants. Ultraviolet light and nitrous acid and two methods were used to recover them, such as, filtration enrichment and total isolation. Through UV light were obtained 19 simple auxotrophic mutants and 18 double mutants and through nitrous acid two morphological mutants. The enrichment method was shown to be 1.64 times better than the total isolation one. Seven color mutants carrying two auxotrophic markers were used to get heterokaryons. Recombinant colonies were directly recovered from heterokaryons onto different selective media, indicating the occurrence of paramixis. Prototrophic colonies grown in minimal medium were binucleated and green coloured, revealing a non autonomous system for conidia

pigmentation. These dikaryotic colonies gave rise to sectors in complete medium plus benomyl suggesting the occurrence of a highly unstable diploid phase. It was described as well a method for protoplasts obtention and fusion. Recombinant colonies were directly recovered from fusion products in a frequency almost 1000 times higher than the recombinants from heterokaryons and it is shown to be a better method for crossings. Parameiosis was detected through protoplast fusion as well.

For cellulolytic activity in wild and mutant strains it was shown that the enzymatic indexes were directly proportional to the higher or smaller degree of colony compactation. Recombinants from two of the analysed heterokaryons showed enzymatic activity averages higher or similar to their parent strains.

Colonies regenerated from protoplasts of the wild strain showed worst cellulolytic activity than colonies risen from conidia. This is a negative effect of protoplastization on the cellulolytic activity.

Electrophoretic patterns for esterase of the wild and mutant strains showed different profiles according to number and band position. It might be suggested a relation between band patterns and conidia coloration.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, tem sido crescente a necessidade de se buscar fontes de energia renovável, tornando cada vez maior o interesse na utilização de recursos naturais. Entre as biomassas produzidas por sistemas vegetais, o material lignocelulolítico é o mais abundante. Produz-se no globo terrestre cerca de $4,0 \times 10^{10}$ toneladas de biomassa/ano, sendo 40% constituída por celulose.

As aplicações potenciais da degradação de materiais celulósicos são muitas. Os produtos de hidrólise podem ser utilizados em processos fermentativos para a obtenção de combustíveis líquidos, materiais alimentares e produtos químicos. O processo para sacarificação da celulose pode ser realizado por via ácida ou por enzimas, celulases, produzidas por microrganismos. A hidrólise enzimática é mais vantajosa, uma vez que a hidrólise ácida apresenta baixos rendimentos, impurezas nos xaropes e custo elevado. No entanto, não foi desenvolvido ainda um processo significativo utilizando celulases, devido principalmente ao alto custo de sua produção. Este alto custo se deve basicamente a baixa produtividade das linhagens produtoras do com

plexo celulolítico e baixa especificidade na interação enzima-substrato. A obtenção dessas enzimas, a partir de alguns fungos, constitui um fator de interesse biotecnológico. Linhagens do gênero *Trichoderma* vêm sendo bastante estudadas por apresentarem um sistema enzimático promissor e balanceado.

Programas de melhoramento genético de *Trichoderma reesei* tem sido desenvolvidos, visando a obtenção de linhagens hiperprodutoras. Estes programas envolveram inicialmente, métodos de mutação-seleção e mais recentemente técnicas modernas de recombinação, como fusão de protoplastos, transformação e clonagem gênica.

Considerando-se os pontos mencionados anteriormente, o presente trabalho visou o estudo dos aspectos biológicos e genéticos básicos da linhagem de *Trichoderma pseudokoningii* var. Rifai, como possíveis subsídios para programas de melhoramento. Assim, teve-se por objetivos:

- Obter mutantes morfológicos e auxotróficos para utilização em estudos de recombinação;
- Verificar a ocorrência de ciclo parassexual e parameiose nesta espécie;

.3.

- Determinar a produção semiquantitativa de celulases, da linhagem selvagem, mutantes e recombinantes;
- Determinar a metodologia de obtenção, regeneração e fusão de protoplastos;
- Analisar o efeito da protoplastização na atividade celulolítica da linhagem selvagem;
- Observar padrão de esterases na linhagem selvagem e mutantes de *T. pseudokoningii*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos biológicos do gênero *Trichoderma* spp

O gênero *Trichoderma* foi revisado por RIFAI em 1969 e os isolados foram agrupados em 9 (nove) espécies, diferenciadas primariamente pelo modo de ramificação de conidióforos e morfologia de conídios. Segundo este autor, o gênero *Trichoderma* foi introduzido na literatura micológica por PERSOON em 1794, embora a primeira delimitação genérica precisa tenha sido dada por HARZ em 1871, o qual enfatizou a importância das características microscópicas na delimitação do gênero. As espécies de um mesmo grupo, apresentam características sobrepostas o que torna difícil a classificação de isolados. Em cultura, as colônias crescem rapidamente, apresentando inicialmente superfície lisa e quase translúcida, tornando-se posteriormente flocosas ou compactas, com tufo. A compactação parece estar relacionada a estrutura dos conidióforos. A coloração da colônia é normalmente devida à pigmentação dos conídios, a quantidade de conídios produzidos, podendo ainda ser influenciada pelo tipo de meio de cultivo bem como ao pH. O micélio é composto por hifas hialinas, septadas, muito ramificadas e de parede

lisa. Clamidósporos estão presentes na maioria das espécies, intercalados nas hifas ou ocasionalmente terminais, são globosos ou elipsoidais, de pouca coloração e parede lisa. Os conidióforos são altamente ramificados, de formato cônico ou piramidal, soltos ou muito compactados em tufo, e geralmente são formados em distintos anéis concêntricos produzindo zonas ou estão irregularmente distribuídos na hifa aérea. O ápice de cada ramificação dos conidióforos é terminado por uma fiálide, exceto para algumas espécies. As fiálides apresentam formato de frascos ou papoulas. A estrutura e tamanho de conidióforos bem como o formato e disposição de fiálides, em isolados de *Trichoderma* são utilizados para diferenciação de espécies bem como a determinação de suas relações. Os conídios dos tipos subglobosos, ovóides, elipsóides ou elíptico-cilíndricos são produzidos em série e acumulados no ápice da fiálide formando uma estrutura globosa ou subglobosa com menos de 15 µm de diâmetro, são lisos ou ligeiramente rugosos, de coloração hialina ou variando de verde amarelado a verde escuro.

Recentemente, outros métodos, que não características morfológicas, tem sido utilizados para classificação de isolados de *Trichoderma*. BARAK & CHET (1988) relataram o uso de métodos serológicos, para distinguir isolados bem como assegurar homogeneidade. A tradicional taxono

mia do gênero *Trichoderma* foi avaliada com base na variação de alozimas, utilizando eletroforese em gel de amido. Todos os fenótipos apresentaram padrões singulares de alozimas, sugerindo que todas as amostras eram hemizigotas e haplóides (STASZ *et alii*, 1988).

A ocorrência de espécies do gênero *Trichoderma*, provenientes do solo é freqüente (MILLER & REID, 1961). RIFAI (1969) também relatou que este gênero era um dos principais componentes da microflora do solo.

Alguns aspectos relacionados com o cultivo de linhagens do gênero *Trichoderma*, principalmente no que se refere a crescimento e esporulação foram analisados. WEINMAN-GREENSHPAN & GALUN (1969) estudaram vários aspectos do sistema morfogenético fotoinduzido em *Trichoderma viride*, relatando a produção de conídios somente após a indução com luz. MILLER & REID (1961) investigaram o efeito da intensidade e comprimento de onda da luz na conidiação em *Trichoderma lignorum*. Observaram a ocorrência de zonação em luz branca e maior esporulação em luz violeta e azul ao contrário de luz amarela e vermelha as quais foram ineficientes.

Um fator físico relevante no crescimento de microrganismos é o pH do meio de cultivo, pois sabe-se que em valores extremos o crescimento cai rapidamente. BROWN & HALSTED (1975) analisaram o efeito do pH ácido na cinética

de crescimento de *T. viride* observando crescimento em valores acima de 4,0, sendo que a razão de crescimento máximo específico foi linearmente correlacionado com a concentração de íons hidrogênio. CASTRO (1982) observou a ocorrência de germinação em *Trichoderma reesei* em valores de pH acima de 5,5 após 12 horas de incubação. CARVALHO (1989) determinando condições adequadas de cultivo para *Trichoderma* sp. no que se refere a eficiência de germinação e conidiação, utilizou pH 5,5.

São poucos os trabalhos relatados sobre a citologia de espécies do gênero *Trichoderma*. No Deuteromiceto mesofílico *T. reesei* estudos citológicos têm revelado a presença de no mínimo 4 (quatro) cromossomos grandes, embora cromossomos pequenos possam ocorrer. Os conídios são haplóides e uninucleados (NEVALAINEN, 1985).

Devido ao gênero *Trichoderma* ser caracterizado pelo rápido crescimento das colônias (RIFAI, 1969; WEINMAN-GREENSPAN & GALUN, 1971; MONTENECOURT & EVELEIGH, 1977 e BISSETT, 1984) se faz necessário a adição, aos meios de cultivo, de substâncias redutoras, principalmente em estudos de domesticação, obtenção de mutantes e análises semiquantitativas da produção de exoenzimas. Algumas substâncias redutoras tem sido utilizadas com sucesso na obtenção de colônias isoladas em espécies do gênero *Trichoderma*, como deso

xicolato de sódio (WEINMAN-GREENSHPAN & GALUN, 1969; MANDELS *et alii*, 1971; HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1977; CASTRO, 1982; SCHIMENTI *et alii*, 1983; ZALDIVAR *et alii*, 1987 e CARVALHO, 1989), triton X-100 (NEVALAINEN & PALVA, 1978; NEVALAINEN *et alii*, 1980 e CARRAU *et alii*, 1988), rosa bengala (MILLER & REID, 1961 e MONTENECOURT & EVELEIGH, 1977), oxgall e fosfon D (MONTENECOURT & EVELEIGH, 1977).

2.1.1. *Trichoderma pseudokoningii* var. Rifai

Segundo BISSETT (1984), colônias de *T. pseudokoningii* var. Rifai crescem rapidamente atingindo 8 a 9 cm de diâmetro após 4 (quatro) dias de incubação a 20°C. Apresenta micélio translúcido e esparso, com pouco crescimento aéreo, composto de hifas ramificadas, septadas, parede lisa e sem cor. Os conidióforos são em tufo tornando-se pulverulentos na maturidade. Os primeiros conidióforos formam zonações, as quais tornam-se indistintas posteriormente. Os conídios são produzidos isoladamente e sucessivamente, na extremidade de cada fiálide, apresentando-se subcilíndricos ou oblongos e algumas vezes elipsóides. Quanto a coloração, mudam de branco a branco-esverdeado e verde (RIFAI, 1969).

Apesar de apresentarem características comuns,

BISSET (1984) relatou variações na espécie *T. pseudokoníngii* e agrupou esta dentro da seção de *T. longibrachiatum*.

2.2. Celulases de fungos

2.2.1. Enzimas celulolíticas e modo de ação

Segundo COUGHLAN (1985) a celulose é a mais abundante molécula orgânica existente na natureza, sendo a principal fonte de energia renovável. Aproximadamente 4×10^{10} toneladas são sintetizadas anualmente como resultado da fotossíntese.

A celulose é um polímero linear de glicose, composta de unidades de anidroglicose, associadas por ligações β -1,4-glicosídicas. As moléculas de celulose podem estar ordenadas através de pontes de hidrogênio, resultando em uma estrutura cristalina, ou em áreas menos ordenadas, apresentando estrutura amorfa (GOKSØYR & ERIKSEN, 1980).

A capacidade de utilizar a celulose como fonte de carbono e energia é ampla entre os microrganismos. No entanto, somente poucas espécies fúngicas e bacterianas são capazes de alta atividade celulolítica "in vitro" (ENARI & MARKKANEN, 1977; BISARIA & GHOSE, 1981 e COUGHLAN, 1985). Muitos produzem enzimas que degradam somente derivados de celulose ou regiões amorfas, mas poucos sintetizam o sistema

completo capaz de hidrolisar material cristalino encontrado na natureza (COUGHLAN, 1985). Tais organismos, chamados de celulolíticos verdadeiros são encontrados entre os fungos superiores (ENARI & MARKKANEN, 1977).

GHOSE & GHOSH (1979) sugerem que o sistema enzimático mais promissor para o processo de sacarificação da celulose é o de *Trichoderma*. COUGHLAN (1985) cita uma relação de microrganismos produtores de celulasas de uso comercial estabelecido ou potencial, dentre os quais seis espécies do gênero *Trichoderma*: *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. lignorum*, *T. longibrachiatum*, *T. pseudokoningii* e *T. reesei*.

A degradação da celulose cristalina é um processo complexo que requer a participação de várias enzimas. Embora existam diferenças nas propriedades das enzimas de diferentes fungos, as principais características de degradação da celulose são as mesmas (ENARI, 1983). Está bem estabelecido que há no mínimo três diferentes tipos de atividades celulolíticas (ENARI & MARKKANEN, 1977; GONG & TSAO, 1979; GOKSØYR & ERIKSEN, 1980; RYU & MANDELS, 1980 e COUGHLAN, 1985):

- 1- endo- β -1,4-glucanase ou β -1,4-glucano glucanohidrolase (EC.3.2.1.4), comumente chamada CMCase ou celulase Cx - hidrolisa as

cadeias ao acaso, atacando os polímeros internamente, resultando em uma rápida redução da cadeia ou grau de polimerização.

2- $\text{exo-}\beta\text{-1,4-glucanase}$ ou $\beta\text{-1,4-glucan celo}$ biohidrolase (EC.3.2.1.91), comumente chamada avicelase ou celulase C_1 - atua sobre a celulose, removendo unidades de glicose ou celobiose à partir de extremidades não reduzidas da cadeia.

3- $\beta\text{-1,4-glicosidase}$ (EC.3.2.1.21), comumente chamada celobiase - hidrolisa celobiose e outras celodextrinas à glicose.

Os três principais tipos de enzimas celulolíticas ocorrem em formas múltiplas, frequentemente como isoenzimas (ENARI & MARKKANEN, 1977; BISARIA & GHOSE, 1981; ENARI, 1983 e NEVALAINEN, 1985). Várias são as perguntas à respeito da natureza e origem desta multiplicidade: se cada forma é determinada geneticamente ou se sofre modificações diferenciais por proteólise ou glicosilações à partir de um precursor comum (COUGHLAN, 1985).

Segundo GONG & TSAO (1979) o número destas múltiplas formas diferem consideravelmente, em função da en

zima, do microrganismo e das condições de cultivo. Existem especialmente em *Trichoderma*, *Sporotrichum* e alguns outros fungos miceliais. Em *T. reesei* foram relatadas duas celobiohidrolases imunologicamente distintas, cinco a oito endoglucanases com diferentes especificidades de substrato e três β -glicosidasas, também diferindo em especificidades de substrato (MERIVUORI *et alii*, 1985 e NEVALAINEN, 1985). As endoglucanases poderiam ser secretadas como uma procelulase inativa e subsequentemente ativada ou apresentar síntese codificada em diferentes genes (COUGHLAN, 1985). Em *T. koningii* foram relatadas uma exoglucanase, cinco endoglucanases e duas β -glicosidasas (ENARI & MARKKENEN, 1977).

A multiplicidade de endocelulases é maior em relação a das celobiohidrolases e celobiasas. Isto pode ser devido a maior susceptibilidade da estrutura primária e configuração das endocelulases a proteólise. Esta multiplicidade dos componentes celulasas é de fundamental interesse no estudo de regulação desses componentes e de celulólise (GONG & TSAO, 1979).

O maior avanço no entendimento do mecanismo de hidrólise enzimática da celulose foi dado pela introdução do conceito C_1 - C_x por REESE *et alii* em 1950, onde C_1 seria responsável pela formação de cadeias curtas e lineares a partir de celulose cristalina. Estas cadeias poderiam en

tão ser hidrolisadas por Cx, a qual também hidrolisava derivados de celulose solúvel. Por este conceito, C₁ era considerado em fator pré-hidrolítico. Posteriormente, foi sugerido que C₁ agiria removendo pontes de hidrogênio entre cadeias de celulose adjacentes, tornando viável o ataque pela enzima Cx (GOKSØYR & ERIKSEN, 1980). De acordo com esta hipótese, os microrganismos capazes de crescer somente em derivados de celulose, sintetizam apenas o componente Cx, enquanto que microrganismos capazes de crescer em celulose cristalina produzem ambos componentes C₁ e Cx (BISARIA & GHOSE, 1981).

Muitos trabalhos que contradizem a hipótese na qual C₁ inicia o ataque enzimático sobre a celulose, tem sido encontrados na literatura (BISARIA & GHOSE, 1981). O ataque seria iniciado pela fração Cx, por quebras das primeiras cadeias glicosídicas na superfície das fibrilas (GOKSØYR & ERIKSEN, 1980). Muitos autores no entanto, mantêm a hipótese inicial, considerando C₁ como sinônimo de exoglucanase (COUGHLAN, 1985).

O conceito atual de hidrólise enzimática da celulose é de que as três enzimas, celobiohidrolase, endoglucanase e β -glicosidase estão envolvidas, e de que ocorre um sinergismo na ação hidrolítica entre celobiohidrolase e endoglucanase. No modelo atual proposto, a endoglucanase

atua sobre as regiões amorfas das fibras de celulose, abrindo novas extremidades da cadeia para o ataque da celobiohidrolase, a qual remove glicose e celobiose das extremidades não reduzidas da cadeia. Uma vez que a celobiose é um importante produto final, a atividade β -glicosidase é necessária para a obtenção de uma hidrólise enzimática máxima da celulose cristalina à glicose (ENARI, 1983 e COUGHLAN, 1985). No entanto, o mecanismo de iniciação da degradação de celulose não é ainda completamente estabelecido. É possível que um fator não hidrolítico (GRIFFIN *et alii*, 1984) e enzimas não conhecidas estejam envolvidos na degradação.

2.2.2. Indução e repressão

A biossíntese de celulasas está sujeita a controles bioquímicos e genéticos (MONTENECOURT, 1983). Todas as três enzimas do complexo celulase são indutíveis e sofrem repressão catabólica (GONG & TSAO, 1979 e MERIVUORI *et alii*, 1985).

A celulase extracelular pode ser produzida pelos organismos em resposta à presença de certos substratos no meio de crescimento. A resposta aos diferentes indutores varia dependendo da concentração e do tipo de indutor. Dentre os indutores da síntese de celulasas incluem-se

celulose, derivados de celulose, celobiose, saforose e lactose (GONG & TSAO, 1979).

A síntese de celulase, após indução, pode ser reprimida por glicose ou outros açúcares prontamente metabolizáveis (GONG & TSAO, 1979; MERIVUORI *et alii*, 1985 e NEVALAINEN, 1985). Segundo GONG & TSAO (1979); o mecanismo básico de regulação da síntese de celulase deve ser similar aos conhecidos sistemas indutíveis.

Embora a natureza do real indutor não tenha sido ainda estabelecida (NEVALAINEN, 1985), celulose, celobiose, saforose e lactose são considerados bons indutores. Presumivelmente, o indutor natural é a celulose. No entanto, não é conhecido o mecanismo pelo qual uma molécula insolúvel pode efetuar regulação da expressão gênica (MERIVUORI *et alii*, 1985). O ponto de vista mais aceito para tal explicação, embora não ensaiado experimentalmente, é o de ocorrência de uma síntese basal de celulase constitutiva (MANDELS & REESE, 1960, GONG & TSAO, 1979 e COUGHLAN, 1985) responsável pela degradação da celulose à produtos solúveis, os quais atuariam como reais indutores. Segundo GOKSØYR & ERIKSEN (1980), o melhor candidato para este tipo de indutor é a celobiose. MANDELS & REESE (1960) mostraram que a celobiose é um indutor natural da síntese de celulasas em muitos fungos, e que usualmente é o primeiro produto solúvel detectá-

vel, no entanto, é efetivo somente em altas concentrações (COUGHLAN, 1985).

A soforose (2-0- β -glicopiranosil-D-glicose) em baixas concentrações é um poderoso indutor da síntese de endo e exocelulases por *T. reesei* (COUGHLAN, 1985). Entretanto, é eficiente somente para um limitado número de fungos celololíticos (GOKSØYR & ERIKSEN, 1980 e MONTENECOURT *et alii*, 1980). Segundo GONG & TSAO (1979) a alta indutibilidade de soforose em alguns organismos é devido a ineficiente hidrólise deste indutor, resultando em um efeito glicose mínimo. ENARI & MARKKANEN (1977) e STERNBERG & MANDELS (1980) relataram que além da ação indutível, a soforose é responsável pela repressão da síntese de β -glicosidase.

Outro importante indutor da síntese de celulasas é a lactose, mas somente em baixas concentrações (GONG & TSAO, 1979; RYU & MANDELS, 1980 e COUGHLAN, 1985). A indução por lactose está sujeita a repressão catabólica por glicose e galactose. O complexo enzimático, produzido por *T. reesei* em resposta a presença de celulose ou lactose no meio de cultivo, é completo e balanceado (RYU & MANDELS, 1980).

Segundo COUGHLAN (1985) o mecanismo pelo qual a transcrição de genes de fungos é regulada não é completa-

mente conhecida. Em *Trichoderma*, a síntese de celulasas parece não ser regulada por mudanças nos níveis de AMPcíclicos, como ocorre na síntese de enzimas reprimidas catabolicamente em bactérias (MONTENECOURT *et alii*, 1980; MERIVUORI *et alii*, 1985 e NEVALAINEN, 1985). No presente, a mais provável hipótese é de que os genes que codificam para celulasas estão regulados ao nível de transcrição (NEVALAINEN, 1985).

2.2.3. Fatores que influem na hidrólise enzimática da celulose

Tanto fatores físicos quanto químicos podem influir na produção de celulasas por microrganismos celulolíticos.

As reações enzimáticas são grandemente afetadas por variações na temperatura e pH (MUKHOPADHYAY & MALIK, 1980 e MARTINS, 1983), tamanho de inóculo, fonte de carbono, presença de indutores e ou inibidores, aeração e tempo de crescimento (GOKSØYR & ERIKSEN, 1980). Segundo GONG & TSAO (1979) a localização das celulasas, livres ou ligadas, pode ser influenciada pela fonte de carbono e condições ambientais. Normalmente, os sistemas celulósicos apresentam condições ótimas de atividade em pH 4,5 - 5,0 e a temperaturas de 45 - 50°C (MARTINS, 1983). KNAPP & LEGG (1986) observaram que o efeito do substrato na atividade enzimática é de

pendente do pH do meio de cultivo.

Nutrientes do meio de cultivo podem também influenciar a produção de celulases (LINARDI & ROGANA, 1977). MENEZES *et alii* (1973) relataram que variações no conteúdo de sais minerais afeta a produção desse complexo enzimático. STERNBERG (1976) obteve duplicação na produção de celulases por *Trichoderma*, pelo aumento nas concentrações de celulose e fonte de nitrogênio. KIM *et alii* (1985) observaram que as condições de maior produção de celulases por *T. reesei*, coincidem com as condições ótimas de crescimento.

Outros fatores influem na velocidade das reações enzimáticas de degradação da celulose como multiplicidade de substrato, cristalinidade, estrutura molecular, área de superfície, grau de polimerização, acessibilidade às ligações glicosídicas e sistema de multienzimas (RYU & MANDELS, 1980; MANDELS *et alii*, 1981; SASAKI, 1982; LEE & KIM, 1983; PURI, 1984 e COUGHLAN, 1985). Dentre as características estruturais do substrato, a cristalinidade é a que mais influencia a degradação enzimática (PURI, 1984). Normalmente, para a hidrólise de celulose "in vitro" por enzimas celulolíticas, é necessário um pré-tratamento do substrato visando diminuição no grau de cristalinidade (MARTINS, 1983 e PURI, 1984).

No sistema celulase-celulose, a adsorção da

celulase é o fator que regula a razão de hidrólise enzimática (LEE *et alii*, 1982). A adsorção da enzima em sítios susceptíveis na superfície do substrato é um pré-requisito para a reação de catálise (PEITERSEN *et alii*, 1977; LEE *et alii*, 1982 e RYU *et alii*, 1984). Segundo PEITERSEN *et alii*, 1977 e RYU *et alii*, 1984, este mecanismo de adsorção pode ser influenciado por fatores ambientais como pH e temperatura.

2.2.4. Métodos para a determinação da atividade celulolítica

Segundo GOKSØYR & ERIKSEN (1980) métodos diferenciais, qualitativos ou quantitativos, podem ser empregados na determinação da atividade celulolítica.

As celulasas de diferentes origens são compostas essencialmente de endoglucanases e exoglucanases. A determinação de cada atividade no complexo celulásico não fracionado é difícil devido ao efeito sinérgico existente entre essas frações (MARTINS, 1983). As atividades celulasas podem ser expressas de acordo com o substrato utilizado (RYU & MANDELS, 1980), sendo que substratos ideais seriam os de baixo peso molecular e específicos, no entanto, somente no caso de celobiase tal substrato é viável (ENARI & MARKKANEN, 1977).

Os métodos bioquímicos são muito utilizados na determinação dos componentes individuais do complexo celulase. Estes se baseiam principalmente no decréscimo da viscosidade de soluções de derivados solúveis de celulose e no aumento dos açúcares redutores do meio reacional, utilizando-se substratos solúveis ou insolúveis (MARTINS, 1983).

Os métodos viscosimétricos são muito sensíveis e específicos para a determinação da atividade endoglucanase. Os substratos utilizados são derivados de celulose solúvel tais como carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC) (ENARI & MARKKANEN, 1977). Já os métodos baseados no aumento do poder redutor do meio reacional, medem ambas as atividades endoglucanases e exoglucanases. O uso de CMC como substrato é normalmente relacionado a atividade de endoglucanase. A atividade exoglucanase pode ser medida a partir de substratos como celulose amorfa e celo-oligosacarídeos. Substratos insolúveis como algodão, papel de filtro, Avicel e Solka Floc são utilizados na determinação da atividade celulolítica total, pois para a hidrólise desses materiais há participação efetiva de todos os componentes celulase. Os métodos baseados no aumento do poder redutor são também empregados para a determinação da atividade celobiase, a partir de substratos como celobiose, salicina e p-nitrofenil- β -glicosídeo (ENARI & MARKKANEN, 1977, MARTINS,

1983 e COUGHLAN, 1985).

A atividade celulolítica pode ainda ser determinada por métodos quantitativos, em meio sólido. RAUTELA & COWLING (1966) descreveram um método simples, baseado no princípio de que a dissolução extracelular da celulose é parte essencial da sua degradação. O método consiste da difusão de enzimas celulolíticas em ágar-celulose, sendo a atividade celulolítica determinada pela medida da profundidade de clarificação no tubo. A partir do mesmo princípio, TANSEY (1971) selecionou microrganismos celulolíticos, utilizando gel de ágar-celulose. MONTENECOURT & EVELEIGH (1977) adaptaram esta técnica para a seleção simultânea de mutantes alto produtores de celulases, numa única placa. A zona de clarificação foi melhor visualizada após incubação "overnight" das culturas à 50°C.

HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1977a) descreveram metodologia para avaliação da atividade Cx em meio sólido contendo carboximetilcelulose. NEVALAINEN *et alii* (1980) e SADDLER (1982), também relataram o uso da técnica de clarificação em ágar-celulose para determinação simples e quantitativa da atividade celulase. GOLDMAN & AZEVEDO (1987) ensaiaram a atividade celulolítica de 88 isolados de *Trichoderma* spp, através da área de degradação, estimada pela zona de clarificação no tubo.

Segundo COUGHLAN (1985) dependendo do substrato celulósico utilizado, a técnica de clarificação pode ser utilizada para selecionar mutantes hiperprodutores de endoglucanases, exoglucanases ou ambas. Vários trabalhos de obtenção de tais mutantes, foram relatados (NEVALAINEN & PALVA, 1978; BAILEY & NEVAILANEN, 1981; GHOSH *et alii*, 1982; KAWAMORI *et alii*, 1985; MORIKAWA *et alii*, 1985 e NEVALAINEN, 1985).

Mais recentemente, outros métodos tem sido desenvolvidos. A detecção de endoglucanases e exoglucanases através de eletroforese em gel de poliacrilamida, tem facilitado a purificação e caracterização desses componentes (BEGUIN, 1983 e BARTLEY *et alii*, 1984). GOLDMAN (1988) demonstrou a atividade celulolítica de *Aspergillus niger* e *T. reesei* em gel de agarose acrescido de carboximetilcelulose.

2.3. Genética e melhoramento para a produção de celulas em *Trichoderma*

2.3.1. Técnica de mutação-seleção

Segundo NEVALAINEN (1985) os estudos genéticos em *Trichoderma*, particularmente *T. reesei*, visam, quase que exclusivamente, o melhoramento da produção de celulas.

Como visto anteriormente, o mecanismo de sín-
tese e regulação de celulasas é bastante complexo. No entan-
to é possível a indução de alterações e a obtenção de
linhagens com alta produção. Segundo MONTENECOURT *et alii*,
(1979), sete linhas de pesquisa tem sido escolhidas para a
seleção de mutantes de maior produção de celulasas em *Trí-*
choderma: 1) mutantes resistentes à repressão catabólica (des-
reprimidos); 2) mutantes resistentes a antimetabólitos; 3)
mutantes cujas características permitem sua utilização prá-
tica em fermentadores; 4) linhagens alto produtoras a par-
tir de mutantes celulase-negativos; 5) mutantes resistentes
ao produto final; 6) mutantes secretórios e 7) mutantes cons-
titutivos.

As metodologias de seleção desenvolvidas pa-
ra a detecção de mutantes regulatórios em *T. reesei* tem per-
mitido o isolamento de linhagens hiperprodutoras (MONTENE-
COURT & EVELEIGH, 1977b; COSTA & UDEN, 1980; NEVALAINEN *et*
alii, 1980; SHOEMAKER *et alii*, 1980; GHOSH *et alii*, 1982;
SCHIMENTI *et alii*, 1983; KAWAMORI *et alii*, 1985; NEVALAINEN,
1985 e DURAND *et alii*, 1988). Estas metodologias se baseiam
no uso de meio sólido e estimativa quantitativa da produção
enzimática, seguida por cultivo em meio líquido para de-
tecção das atividades específicas.

Muitos mutantes de *Trichoderma* tem sido obti

dos à partir da linhagem QM6a de *T. reesei*, originalmente isolada na "U.S. Army Natick Development Center", USA (BISARIA & GHOSE, 1981). A linhagem QM6a produz pouca celulase devido a restrições na biossíntese, graças a controles genéticos e metabólicos.

MONTENECOURT & EVELEIGH (1977b) isolaram a partir da linhagem QM6a, um mutante resistente à repressão catabólica em presença de glicerol. Este mutante, denominado NG-14 apresentou 5 vezes mais atividade sobre papel de filtro e aproximadamente, 2 vezes mais atividades endo- β -glucanase e β -glicosidase, comparado ao mutante hiperprodutor QM-9414. A partir desta mesma linhagem, SCHIMENTI *et alii* (1983), através de irradiação com ultravioleta e enriquecimento com nistatina, isolaram os mutantes CM-6 e CM6G os quais apresentaram maiores atividades de papel de filtro, de endoglucanase e de β -glicosidase, em relação a linhagem selvagem. MANDELS *et alii* (1971) à partir de irradiação de conídios de *T. reesei* QM6a com acelerador linear, isolaram o mutante QM9123 capaz de secretar 2 vezes mais celulases que a linhagem parental. Segundo RYU & MANDELS (1980), à partir de QM9123, obteve-se o mutante QM9414, o qual apresentava o dobro da atividade sobre papel de filtro e β -glicosidase, em relação a linhagem QM6a.

Muitos trabalhos de obtenção de linhagens hiperprodutoras estão voltados ao isolamento de mutantes desreprimidos ou constitutivos. MORIKAWA *et alii* (1985) selecionaram a partir de QM9414, a linhagem KY746, a partir da qual, através de irradiação com ultravioleta obtiveram o mutante N-25. Este mutante tratado com nitrosoguanidina deu origem ao K-14, do qual se originou dois mutantes hipercelulolíticos denominados KDR-11 e KDR-27. Prosseguindo este programa de melhoramento, KAWAMORI *et alii* (1985) isolaram a partir de KDR-11, dois mutantes desreprimidos, KDD-10 e DGD-16. Estes mutantes produziram 1,5 vezes mais atividade de endoglucanase em meio com Avicel e glicose em relação ao meio contendo somente Avicel. NEVALAINEN *et alii* (1980) trataram conídios da linhagem *T. reesei* QM9414 com nitrosoguanidina e obtiveram um mutante desreprimido denominado VTT-D-78085. Este, embora instável, apresentou um aumento de 2 a 3 vezes na atividade celulase e aumento de 6 vezes na atividade β -glicosidase, quando comparado ao parental. Visando a obtenção de linhagens estáveis a partir de VTT-D-78085, BAILEY & NEVALAINEN (1981) isolaram dois mutantes, designados VTT-D-80132 e VTT-D-80133, ambos estáveis e com alta atividade celulolítica. GHOSH *et alii* (1982) obtiveram a partir de QM9414, uma linhagem com atividade enzimática superior, denominada M-65. Esta linhagem tratada

com nitrosoguanidina deu origem a uma série de mutantes hiperprodutores. Desta série, selecionou-se o mutante D₁, parcialmente resistente à repressão catabólica. A partir deste, foi obtido o mutante D₁-6, apresentando atividade sobre papel de filtro 3 vezes superior a da linhagem QM9414 e 27% maior em relação à outros mutantes. DURAND *et alii* (1988) isolaram após seis passos de seleção recorrente, a partir da linhagem QM9414, um mutante designado CL-847, o qual exibiu aumento de 4 vezes na produção de celulasas, resistência à repressão catabólica e atividade β -glicosidase aumentada e parcialmente constitutiva, em relação à linhagem parental.

A atividade β -glicosidase do complexo celular se extracelular de QM9414 é relativamente baixa e limita a sacarificação de celulose em sistemas de células livres. Alguns trabalhos envolvendo metodologia de mutação-seleção, tem por objetivo a obtenção de mutantes com atividade β -glicosidase aumentada. COSTA & UDEN (1980) trataram *T. reesei* QM9414 com luz ultravioleta e obtiveram dois mutantes desreprimidos, QM9414 MCG4 e QM9414 MCG5, os quais apresentavam atividade β -glicosidase 5 vezes superior a da linhagem parental. SHOEMAKER *et alii* (1981) realizaram um programa de melhoramento, visando aumento da produção de β -glicosidase em meio contendo somente glicose como fonte de carbono. A partir de QM9414, obtiveram um mutante constitutivo para

β -glicosidase, embora não apresentasse atividades endoglucanase e exoglucanase. Após tratamento mutagênico desta linhagem, selecionaram o mutante L-77 com produção aumentada de todas as enzimas do complexo celulase, em relação a de QM9414.

Mutantes incapazes de hidrolisar celulose, celulase-negativos, são de particular interesse, pois reversão desta mutação, pode resultar em mutantes potencialmente hipercelulolíticos devido a um desarranjo no controle da síntese enzimática (MONTENECOURT *et alii*, 1979). MANDELS *et alii* (1971) isolaram um mutante celulase-negativo, QM9136, a partir da linhagem QM6a. No entanto, após intensivo tratamento com mutagênicos, este não produziu revertentes. NEVALAINEN & PALVA (1978) isolaram mutantes não produtores de celulases a partir de QM9414. Nestes mutantes, as atividades mananase e xilanase também estavam ausentes. Este resultado sugere a existência de um mecanismo regulatório comum para este grupo de enzimas.

Mais recentemente, a obtenção de mutantes regulatórios para a produção de celulases, tem sido objeto de estudo em outras espécies que não *T. reesei*. MACRIS & GALIOTOU-PANAYOTOU (1986) selecionaram, através de tratamento com radiação gama, um mutante de *T. harzianum*, denominado M5, com alta atividade celulase, particularmente exocelo-

biohidrolase. ZALDIVAR *et alii* (1987) selecionaram mutantes de *T. pseudokoningii* resistentes à repressão catabólica. CARRAU *et alii* (1988) obtiveram mutantes desreprimidos, à partir da linhagem 5A de *Trichoderma* sp. CASTRO *et alii* (1987) à partir de uma linhagem de *Trichoderma* sp isolaram mutantes auxotróficos e morfológicos com atividade celulolítica, aumentada. Já CARVALHO (1989) trabalhando com esta mesma linhagem, obteve mutantes com atividade sobre papel de filtro menor que a da linhagem parental.

2.3.2. Técnicas modernas de recombinação

Além dos programas de mutação-seleção, outras técnicas como fusão de protoplastos e clonagem gênica tem sido utilizadas, visando o melhoramento genético da produção de celulasas e o melhor conhecimento do sistema celulolítico (TOYAMA *et alii*, 1984; MANCZINGER & FERENCZY, 1985; NEVALAINEN, 1985; OGAWA *et alii*, 1987; MURKOVIC *et alii*, 1987; PENTILA *et alii*, 1987 e OGAWA *et alii*, 1989). O primeiro relato de fusão intraespecífica de protoplastos em *T. reesei*, foi dado por TOYAMA *et alii* (1984). Estes autores realizaram fusão, à partir de conídios imaturos, dos mutantes QM9414, hiperprodutor, e QM9136, não produtor, e obtiveram um recombinante com o dobro da atividade endoglucanase em relação a do parental QM9414. OGAWA *et alii* (1989) utilizando esses mesmos mutantes obtiveram diplóides, através de fusão de protoplastos, apresentando atividades interme-

diárias de endoglucanase e exoglucanase em relação as dos parentais sobre papel de filtro. As atividades β -glicosidase e β -1,3-glucanase foram similares ou maiores as dos parentais. OGAWA *et alii* (1987) realizaram a fusão de protoplastos de mutantes morfológicos, para a coloração de conídios, de *T. reesei*. Os heterocários obtidos, apresentaram atividades para celulasas, xilanase e β -glicosidase similares as dos parentais. MANCZINGER & FERENCZY (1985) e MURKOVIC *et alii* (1987) também obtiveram recombinantes da linhagem QM9414, através de fusão de protoplastos, utilizando como indutores de fusão o agente químico polietilenoglicol (PEG) e a técnica de eletrofusão.

PENTILA *et alii* (1987) desenvolveram um eficiente sistema de transformação para *T. reesei*. Nesta linhagem, dois genes de *Aspergillus nidulans* foram expressados através dos promotores amdS (acetamidase) e argB (arginina) e o gene da β -galactosidase de *Escherichia coli*, expressado a partir do promotor gpd de *A. nidulans*. As características de transformação foram, em geral, similares àquelas descritas para outros fungos filamentosos.

Segundo KNOWLES *et alii* (1987), duas celobiohidrolases (CBHI e CBHII) e duas endoglucanases (EGI e EGII) de *T. reesei* já foram clonadas. Segundo NEVALAINEN (1985), o gene da celobiohidrolase I foi clonado e sequen-

ciado por SCHOEMAKER *et alii* (1983) e TEERI *et alii* (1983). Os genes da celobiohidrolase II e endoglucanase II foram isolados e caracterizados a partir de um banco genômico de *T. reesei*, tendo o fago lambda como vetor (NEVALHINEN, 1985). GOLDMAN & AZEVEDO (1989) apontam, em recente revisão, resultados aplicados da clonagem em *Saccharomyces cerevisiae*, dos genes que codificam para a produção de CBHI, CBH III, EG I e EG III de *T. reesei*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Espécies utilizadas

3.1.1. *Trichoderma pseudokoningii* var. *rifai*

Linhagem isolada da Reserva Ecológica do CPATU, Belém, pelo Biol. Aparecido Osdimir Bertolin e identificada pela Prof.^a Maria José dos Santos Fernandes, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

3.1.2. *Trichoderma reesei* QM 9414

Mutante celulolítico isolado no "U.S. Army Natick Development Center" - Natick - Estados Unidos (MANDELS *et alii*, 1971).

3.2. Meios de Cultura e Soluções Utilizadas

3.2.1. Meio Mínimo (PONTECORVO *et alii*, 1953)

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,001 g
ZnSO ₄	0,001 g

Glicose.	10,0 g
Ágar difco	15,0 g
Água destilada	1000 ml

pH ajustado para 5,5 com HCl 1N.

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

Adicionou-se ao Meio Mínimo:

Peptona.	2,0 g
Caseína hidrolisada.	1,5 g
Extrato de levedura.	0,5 g
Solução de vitaminas	1,0 ml

pH ajustado para 5,5 com HCl 1N.

3.2.3. Meio Mínimo Líquido (PONTECORVO *et alii*, 1953)

Preparado segundo o Ítem 3.2.1., não sendo adicionado o ágar.

3.2.4. Meio Completo Líquido (PONTECORVO *et alii*, 1953), modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973)

Preparado segundo o Ítem 3.2.2., não sendo adicionado o ágar.

3.2.5. Meio Mineral para Celulolítico (AMARAL *et alii*, 1967)

KH_2PO_4	7,0 g
K_2HPO_4	2,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0 g
Extrato de levedura.	0,6 g
Celulose ácida	100,0 g
Ágar difco	15,0 g
Água destilada	1000 ml

pH ajustado para 5,5 com HCl 1N.

3.2.5.1. Celulose Ácida

Adicionou-se 30 gramas de celulose (papel de filtro triturado) em 400 ml de ácido orto-fosfórico e misturou-se por 2 horas em banho de gelo. A pasta formada foi ressuspensa em 2 litros de água destilada, bateu-se no liquidificador e filtrou-se a vácuo em filtro Büchner com papel de filtro. Repetiu-se o procedimento por mais uma vez.

Ressuspendeu-se a celulose ácida em 1 litro de Na_2CO_3 2% e manteve-se por 12 horas. Após este período, lavou-se em água destilada e filtrou-se por duas vezes. A celulose ácida foi mantida em refrigerador.

3.2.6. Meio Completo 2 x concentrado

Preparado segundo o ítem 3.2.2., onde cada componente foi colocado em quantidade dobrada, exceto água.

3.2.7. Meio Mínimo mais 4% de Meio Completo

Ao Meio Mínimo (ítem 3.2.3.) foi adicionado Meio Completo (ítem 3.2.4.) numa proporção de 4% (V/V). Em seguida, foram distribuídos 2,5 ml por tubo de ensaio e este rilizados.

3.2.8. Solução de Vitaminas

Biotina.	0,20 mg
Ácido p-aminobenzóico.	10,0 mg
Tiamina.	50,0 mg
Piridoxina	50,0 mg
Ácido nicotínico	100,0 mg
Riboflavina.	100,0 mg
Água destilada esterilizada. . .	100,0 ml

A solução foi esterilizada em banho-maria por 15 minutos e guardada no refrigerador em frasco escuro, sob clorofórmio.

3.2.9. Solução de Ácido Nucleico de Leveduras

- 2 g de ácido nucleico de leveduras em 15 ml de solução 1N de HCl.
- 2 g de ácido nucleico de leveduras em 15 ml de solução 1N de NaOH.

Ambas as soluções foram aquecidas em banho-maria por 20 minutos, misturadas e o pH ajustado para 6,0 com NaOH 10% (P/V). A solução foi filtrada e completou-se o volume para 40 ml, conservando-se em refrigerador.

3.2.10. Solução de Caseína Hidrolisada

Dissolveu-se 100 mg de caseína hidrolisada em 10 ml de água destilada esterilizada. A solução foi aquecida em banho-maria por 15 minutos e conservada em refrigerador.

3.2.11. Suplementos Adicionados ao Meio Mínimo

Os estoques de suplementos, componentes das soluções de vitaminas, ácido nucleico e caseína hidrolisada (AZEVEDO & COSTA, 1973), foram preparados adicionando-se cada um deles em frascos escuros contendo 10 ml de água destilada esterilizada. Estes foram aquecidos por 15 minutos e conservados em refrigerador.

3.2.12. Solução Salina (0,85% P/V)

NaCl.	0,85 g
Água destilada	100,00 ml

A solução foi distribuída em frascos (9 ml por frasco) sendo a seguir autoclavados.

3.2.13. Solução de "Tween-80" (0,1% V/V)

"Tween-80".	0,1 ml
Água destilada	99,9 ml

A solução foi distribuída em tubos de ensaio (2,5 ml por tubo), que foram a seguir autoclavados e mantidos no refrigerador.

3.2.14. Solução de Desoxicolato de Sódio (10% P/V)

Desoxicolato de sódio.	10,0 g
Água destilada.	100,0 ml

A solução foi autoclavada e mantida em refrigerador.

3.2.15. Solução de Albumina 5% (V/V) (ROBINOW & CATEN, 1969)

A solução de albumina foi obtida adicionando-se 5% de clara de ovo, "*picotada*" até homogeneização, à água destilada. Filtrou-se e conservou-se em frasco escuro em refrigerador.

3.2.16. Solução de Giemsa

Diluiu-se uma parte de Giemsa em 66 partes de glicerina a 60°C e, após esfriamento, misturou-se 66 partes de metanol. Esta solução foi mantida a temperatura ambiente.

3.2.17. Solução de HCl 1N

HCl concentrado.	82,50 ml
Água destilada.	1000 ml

A solução foi conservada em frasco escuro, a temperatura ambiente.

3.2.18. Tampão Fosfato 0,125 M pH 7,0

KH ₂ PO ₄	5,304 g
K ₂ HPO ₄	10,614 g
Água destilada	1000 ml

A solução foi distribuída em frascos (9 ml por frasco), autoclavada e conservada em refrigerador.

3.2.19. Tampão Fosfato 0,02 M pH 5,8

Solução A

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,76 g
Água destilada	1000 ml

Solução B

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	3,56 g
Água destilada	1000 ml

Para obtenção da solução 0,02 M pH 5,8, misturou-se 920,0 ml da solução A e 80,0 ml da Solução B. O pH foi ajustado com as soluções A e B.

3.2.20. Tampão Fosfato pH 7,0

Solução A

NaH_2PO_4	27,8 g
Água destilada	1000 ml

Solução B

Na_2HPO_4	63,65 g
Água destilada	1000 ml

Misturou-se 45,0 ml da Solução A e 55,0 ml da Solução B, completando-se o volume para 1000,0 ml com água destilada.

3.2.21. Tampão Acetato pH 4,4

Solução A

Ácido acético.	1,155 ml
Água destilada	1000 ml

Solução B

Acetato de sódio	1,64 g
Água destilada	1000 ml

As soluções foram autoclavadas separadamente e no momento do uso misturou-se 12,75 ml da Solução A e 12,25 ml da Solução B em frasco esterilizado.

3.2.22. Tampão Mc Ilvaine's pH 5,8

- Solução de ácido cítrico: 21,0 g em 1000,0 ml de água destilada.
- Solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 32,0 g em 1000,0 ml de água destilada.

Para obtenção do tampão, misturou-se 184,25 ml da solução de ácido cítrico e 315,75 ml da solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

3.2.23. Solução de nitrito de sódio

Preparou-se uma solução 0,5 M de nitrito de sódio dissolvendo-se o sal em água destilada esterilizada. A solução foi preparada no momento do uso.

3.2.24. Solução de benlate (HASTIE, 1970)

Metil-1 (Buticarbamoil) 2-Benzimidazol Carbonato (Benlate). . . 50,0 mg
Água destilada esterilizada. . . 100,0 ml

O benlate foi dissolvido em 1 gota de acetona e acrescentou-se a água. Filtrou-se e esterilizou-se em banho-maria durante 15 minutos.

3.2.25. Solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,2 M

Dissolveu-se 158,4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pequeno volume do tampão Mc Ilvaine's (ítem 3.2.22.). Ajustou-se o pH para 5,8 com a solução de Na_2HPO_4 e completou-se o volume para 1000,0 ml com o referido tampão. No momento do uso, foi adicionado ao meio completo 2 x concentrado (ítem 3.2.6.) na proporção de 1:1.

3.2.26. Solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6 M

Diluiu-se na proporção de 1:1 a solução $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,2 M em tampão Mc Ilvaine's pH 5,8.

3.2.27. Solução de Enzimas para Produção de Protoplastos (HAMLYN *et alii*, 1981)

Para cada 1,0 ml de tampão $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6M pH 5,8 foram adicionados 5,0 mg de complexo lítico, sendo 2,5 mg de "*celulase CP*" (JOHN & STURGES, SELBY, YORKSHIRE, UK) e 2,5 mg de "*novozyn 234*" (NOVO INDUSTRI DENMARK).

3.2.28. Solução de Polietilenoglicol 6000 (PEG)

Solução A

CaCl.	11,0 g
Água destilada	1000 ml

Solução B

Glicina.	3,75 g
Água destilada	1000 ml

Adicionou-se 10 ml da solução A em 10 ml da solução B. O pH foi corrigido para 8,0 com NaOH 4% e adicionou-se PEG 6000 na concentração final de 30%. A solução foi autoclavada e mantida em refrigerador a 4°C.

3.2.29. Reagentes utilizados para Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PACCOLA-MEIRELLES *et alii*, 1988)

3.2.29.1. Solução Estoque de Acrilamida

Acrilamida.	75,0 g
Bis-acrilamida	2,0 g
Água destilada	250,0 ml

A solução foi filtrada e mantida em refrigerador.

3.2.29.2. Tampão do Gel Separador pH 8,9

Tris-base	45,75 g
Água destilada	60,00 ml

O pH foi ajustado para 8,9 com HCl 1N. Completou-se o volume para 100 ml com água destilada e filtrou-se. O tampão foi mantido à temperatura ambiente.

3.2.29.3. Tampão do Gel Empilhador pH 6,8

Tris-base.	7,475 g
Água destilada	60,000 ml

O pH foi ajustado para 6,8 com HCl 1N e o volume completado para 100 ml com água destilada.

3.2.29.4. Tampão do Tanque pH 8,9

Tris-base.	6,32 g
Glicina.	3,99 g
Água destilada	100,00 ml

O pH foi ajustado para 8,9 com glicina e o volume completado para 1000 ml com água destilada. O tampão foi mantido em refrigerador.

3.2.29.5. Gel Separador a 10%

Tampão do gel separador	1,5 ml
Acrilamida	5,0 ml
Água destilada.	8,4 ml
Persulfato de amônia a 10% . . .	0,113 ml
TEMED	0,005 ml

3.2.29.6. Gel Empilhador a 4%

Tampão do gel empilhador	0,75 ml
Acrilamida (Ítem 3.2.29.1) . . .	1,00 ml
Água destilada	5,70 ml
Persulfato de amônio a 10% . . .	0,056 ml
TEMED.	0,0075 ml

3.2.29.7. Tampão da Amostra

Glicerol. 5,0 ml
Tampão do gel empilhador 2,5 ml
Azul de bromofenol 2,5 mg

Completou-se o volume para 25 ml com água destilada e armazenou-se a -20°C .

3.2.29.8. Soluções Estoques usados para a Revelação de Esterases: a) Alfa-naftil Acetato 1% P/V em Solução Aquosa de Acetona 50%; b) Beta-naftil Acetato 1% P/V em Solução Aquosa de Acetona 50%

Armazenou-se a 4 graus centígrados

3.2.29.9. Corante para a Caracterização de Esterases

"Fast Blue RR" 50,00 mg
Tris-HCl 0,5 M pH 7,1. 5,00 ml
Alfa-naftil Acetato (ítem 3.2.29.8) 0,75 ml
Beta-naftil Acetato (ítem 3.2.29.8) 0,75 ml
Água destilada. 43,50 ml

Preparou-se somente no momento do uso.

3.3. Sistema de filtro para técnica de enriquecimento

No interior de funis de vidro foram fixadas 6 camadas de gaze com auxílio de fita crepe. Este conjunto foi envolto em papel alumínio e autoclavado por vinte minutos a 121°C.

3.4. Uso de palitos para transferência de colônias

Foram utilizados palitos para transferir conídios no caso de inoculação em placas.

3.5. Esterilização e incubação

Os meios de cultura e as soluções utilizadas foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121°C. A temperatura de incubação foi de 28°C.

3.6. Verificação de crescimento em diferentes meios de cultivo

Os meios de cultura utilizados foram: meio mínimo, meio completo e meio mineral. A inoculação de *T. pseudokoningii*, com agulha de platina, foi feita no centro da placa de cada meio de crescimento.

3.7. Determinação de condições ótimas de crescimento

3.7.1. Avaliação de crescimento em meio completo e meio mineral para celulolítico em diferentes pHs (5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 6,8; 7,0 e 7,5) a 28°C. A inoculação foi feita no centro da placa de cultura.

3.8. Determinação da redução de colônia pelo emprego de desoxicolato de sódio

Foi estimada a redução do diâmetro de colônias em seis concentrações diferentes de desoxicolato de sódio, em relação ao meio completo e meio mínimo para celulolítico.

3.9. Verificação do número de núcleos por conídios (TANAKA *et alii*, 1979)

O material a ser corado foi aderido a lamí-nulas, através de solução de albumina e secadas levemente sob um bico de Bunsen. O material foi fixado por 30 minu-

tos em solução de álcool etílico - ácido acético 3:1, a temperatura ambiente. A hidratação foi efetuada por tratamento sucessivo em álcool etílico 95% por 5 minutos e álcool etílico 70% por 30 minutos. Procedeu-se a hidrólise em solução de ácido clorídrico 1 N a 60°C por 12 minutos. Após este período as lamínulas foram lavadas três vezes com água destilada e colocadas numa solução de Giemsa mais tampão fosfato pH 7,0 (1:5), durante 30 minutos. O excesso do corante foi retirado por lavagem com o tampão e as lamínulas foram colocadas em lâminas e observadas em microscópio óptico.

3.10. Sobrevivência a mutagênicos

3.10.1. Sobrevivência a luz ultravioleta

Foi feita uma suspensão de conídios de *Trichoderma pseudokoningii* em solução tween e diluída em solução salina para a concentração de 10^6 conídios por ml. O volume de 10 ml dessa suspensão de conídios foi colocado numa placa de Petri, previamente esterilizada, à distância de 19 cm da fonte de luz ultravioleta da marca "Mineralight" 115 volts, da Ultra-Violet Prod. Inc. (San Gabriel - Calif., USA). O controle foi obtido retirando-se 1,0 ml do volume da placa antes do início da irradiação. A placa foi expos-

ta durante 1, 2, 4, 6, 7 e 8 minutos à fonte de luz ultravioleta. Foi retirado 1,0 ml da placa após cada período de irradiação. Diluições apropriadas de cada tempo de irradiação, assim como a do controle, foram feitas em solução salina e 0,1 ml de cada diluição foi semeada em placas com meio completo contendo 0,1% de desoxicolato de sódio (reduzidor). Toda a irradiação e as posteriores diluições foram feitas no escuro. As placas foram incubadas, envoltas em papel jornal, por mais ou menos 48 horas. A contagem de colônias isoladas foi feita após este período. Fez-se a curva de sobrevivência, tomando-se o número de colônias obtidas no tempo zero como 100% de sobrevivência.

3.10.2. Sobrevivência ao ácido nitroso (SIDDIQI, 1962)

Foi feita uma suspensão de conídios de *T. pseudokoningii* em solução tween e diluída em solução salina para a concentração de 10^6 conídios por ml. Adicionou-se a 0,50 ml da suspensão de conídios, 9,17 ml de solução de acetato pH 4,4 e 0,33 ml de solução de nitrito de sódio. O controle foi feito da mesma forma, exceto a adição de nitrito de sódio.

Após o período de incubação de 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 60 minutos, em banho-maria a 37°C , os tratamentos

foram interrompidos pela transferência de 1,0 ml da amostra para tampão fosfato 0,125 M pH 7,0. Diluições apropriadas de cada tempo de tratamento foram feitas no tampão, sendo 0,1 ml semeado em placa com meio completo mais redutor, as quais foram incubadas a 28°C por 72 horas. Fêz-se a curva de sobrevivência, tomando-se o número de colônias obtidas no tempo zero como 100% de sobrevivência.

3.11. Obtenção de mutantes morfológicos e auxotróficos com luz ultravioleta

3.11.1. Mutantes obtidos por isolamento total

Fêz-se uma suspensão de conídios de *T. pseudokoningii* em solução tween e diluiu-se em solução salina para a concentração de 10^6 conídios por ml. Esta suspensão foi exposta à luz ultravioleta por 7 minutos, a partir da mesma fonte de luz ultravioleta descrita no item 3.10.1. Após a irradiação, 0,1 ml de diluições apropriadas foram semeadas em meio completo mais 0,1% de desoxicolato de sódio e incubadas por 120 horas.

As colônias resultantes dos conídios sobreviventes foram transferidas uma a uma, com auxílio de palitos esterilizados, para placas com meio mínimo mais 0,1% de desoxicolato de sódio (26 pontos). Após 48 horas de incubação, os pontos que não cresceram foram transferidos em blocos de ágar para meio completo. Após 120 horas de incubação

ção, os conídios dessas colônias foram transferidos novamente para meio mínimo. Não havendo crescimento em meio mínimo, as colônias foram consideradas como sendo mutantes auxotróficos.

Os mutantes morfológicos foram selecionados através da observação visual da morfologia das colônias.

Para o ensaio das deficiências nutricionais dos mutantes obtidos fêz-se placas com meio mínimo sólido mais 0,1 ml de cada uma das soluções de caseína hidrolisada, de ácidos nucleicos de leveduras e de vitaminas. Os mutantes auxotróficos foram inoculados nestas placas e estas foram incubadas por 48 horas. O crescimento dos mutantes em uma das soluções indicou sua deficiência, sendo então ensaiados para cada um dos componentes da solução individualmente.

Para obtenção de duplos mutantes seguiu-se o mesmo critério acima com exceção de que o requisito nutricional referente a mutação simples foi adicionado ao meio mínimo.

3.11.2. Determinação do tempo de enriquecimento por filtração para obtenção de mutantes auxotróficos

Fêz-se uma suspensão de conídios de *T. pseud*

dokoningii e do mutante TW₄UV₇ met (coloração branca de conídios e deficiência para o aminoácido metionina) em solução tween e diluiu-se em solução salina para a concentração de 10⁶ conídios por ml. Inoculou-se juntamente 1,0 ml de cada suspensão em erlenmeyer contendo 50 ml de meio mínimo líquido. Após incubação a 28°C, com agitação rotatória, nos intervalos de tempo de 0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 horas o conteúdo de cada frasco foi filtrado no sistema de filtro para técnica de enriquecimento (ítem 3.3.) e centrifugado a aproximadamente 2.900 g/15 minutos. O precipitado foi ressuspenso em solução salina e diluições apropriadas foram semeadas em meio completo mais 0,1% de desoxicolato de sódio. Após incubação de 120 horas, as colônias foram contadas estabelecendo-se a percentagem de cada linhagem em relação ao número total de colônias para cada tempo.

3.11.3. Mutantes obtidos através de enriquecimento por filtração

Após irradiação apropriada com luz ultravioleta (ítem 3.10.1.), incubou-se 1,0 ml da suspensão de conídios em erlenmeyer com 50 ml de meio mínimo líquido por 18 horas, a 28°C com agitação rotatória. Após este período, o meio mínimo foi filtrado no sistema de filtro para técnica de enriquecimento (ítem 3.3.) num erlenmeyer esterilizado e incubado a 28°C/150 rpm. Repetiu-se este procedimento por

mais duas vezes, sendo que o volume do último filtrado foi centrifugado a aproximadamente 2.900 g/15 minutos. O precipitado foi ressuspenso em solução salina e diluições apropriadas foram semeadas em meio completo mais 0,1% de desoxicolato de sódio. Os passos que sucederam estas etapas foram iguais aos descritos no ítem 3.11.1.

3.11.4. Teste de reversão

Suspensões de conídios dos mutantes de *T. pseudokoningii* foram feitas em solução Tween 80. Concentrações em torno de 10^7 a 10^8 por ml foram obtidas, sendo 0,1 ml da suspensão de cada um dos mutantes semeado em meio mínimo. No caso de mutantes com dupla deficiência, cada um dos respectivos suplementares foi adicionado separadamente ao meio mínimo. O crescimento de colônias foi verificado após 120 horas de incubação.

3.12. Análise genética

3.12.1. Obtenção de heterocários

Conídios de mutantes duplo auxotróficos foram colocados em tubos de ensaio contendo meio mínimo líquido mais 4% de meio completo líquido. Após 5 - 6 dias de incubação à 28°C, a película desenvolvida na superfície do

meio líquido foi transferida para placas contendo meio mínimo sólido, em quatro pontos. Após 7 dias de incubação à 28°C, observou-se o crescimento das colônias heterocarióticas.

3.12.2. Isolamento de colônias prototróficas e outros tipos de recombinantes

Conídios de colônias heterocarióticas, crescidas em MM, foram ressuspensos em solução Tween 80, diluídos com solução salina e semeados em meio completo, meio mínimo e em meios seletivos para as marcas envolvidas no cruzamento (combinação duas a duas das marcas dos parentais).

As colônias prototróficas foram recuperadas em meio mínimo, enquanto que os recombinantes foram recuperados nos meios seletivos.

3.12.3. Avaliação de colônias prototróficas

Colônias provenientes de meio mínimo foram testadas quanto a estabilidade inoculando-se em meio completo e meio completo mais benomyl (0,5 µg/ml) e incubadas à 28°C por 7 dias.

Todas as colônias apresentaram setores, al-

guns dos quais foram isolados e caracterizados quanto as marcas auxotróficas.

3.12.4. Análise de recombinantes

As colônias crescidas em meio completo foram transferidas para placas mestras de meio completo (26 pontos). Após 5 dias de incubação à 28°C, estas colônias foram analisadas em meio mínimo, meio mínimo mais os requisitos de um e outro parental e meio mínimo mais todos os requisitos nutricionais envolvidos no cruzamento, exceto aquele sob análise.

Os recombinantes, produtos de parameiose, bem como os setores provenientes das colônias prototróficas, foram transferidos para placas mestras de MC e após 5 dias de crescimento foram analisados, em meio mínimo, meio completo e meio mínimo mais os requisitos envolvidos no cruzamento exceto aquele sob análise.

As avaliações de crescimento foram feitas no 2º dia de incubação evitando assim a ocorrência de sintrofismo.

A frequência de recombinantes foi obtida considerando-se o número de cada tipo recombinante e o número total de colônias analisadas para cada tipo de meio seletivo.

3.13. Teste de produção semiquantitativa de enzimas celulolíticas

A linhagem selvagem de *T. pseudokoningii*, os mutantes auxotróficos simples e duplos, a linhagem de *T. reesei* QM 9414 e os recombinantes obtidos, foram inoculados em 13 ml de meio mineral para celulolítico (item 3.2.5.) mais 0,2% de desoxicolato de sódio.

A avaliação da atividade celulolítica foi feita com 5 dias de incubação, a 28°C tendo o índice enzimático sido estimado pela razão das medidas dos diâmetros das colônias mais halo pelos diâmetros das colônias. A revelação do halo foi obtida após 18 horas de choque térmico a 50°C. O delineamento foi inteiramente casualizado, com 3 repetições por colônia.

3.14. Isolamento e regeneração de protoplastos

3.14.1. Obtenção de protoplastos (HAMLYN *et alii*, 1981)

Fêz-se uma suspensão de conídios em solução tween e dilui-se em solução salina para a concentração de 10⁶ conídios por ml.

Um ml dessa suspensão foi inoculado em erlenmeyer com 50 ml de meio completo líquido e incubado por

18 horas a 28°C com agitação rotatória (150 rpm). Após esse período, o micélio foi filtrado a vácuo, em papel de filtro, e lavado duas vezes com 3,0 ml de solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6 M. Determinou-se o peso úmido do micélio e montou-se o sistema lítico (ítem 3.2.27.).

Incubou-se por 3 horas a 28°C com agitação rotatória (150 rpm). Após este período, os protoplastos foram coletados através de centrifugação, a aproximadamente 400 g/25 segundos. Coletou-se o sobrenadante e centrifugou-se a 2.900 g/15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em 3,0 ml de solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6 M. Repetiu-se o procedimento, sendo que após a última lavagem, o precipitado foi ressuspenso em 2,0 ml da solução estabilizadora [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6 M] e feita a contagem em câmara de Neubauer. Os protoplastos foram semeados em placas com meio de regeneração [meio completo + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6M] e em placas com meio completo, e incubados por 72 horas. Após este período, a viabilidade dos protoplastos foi estimada.

3.14.2. Coloração de protoplastos (BORGES, 1987)

Para a coloração utilizou-se o precipitado obtido na primeira centrifugação (400 g/25 segundos) do

Ítem 3.13.1. Algumas gotas desse precipitado foram colocadas em lâminas limpas, as quais foram mantidas a temperatura ambiente por 15 minutos. A fixação foi feita em metanol absoluto por 5 minutos. Após, as lâminas foram parcialmente secas e imersas em solução de HCl 1 N por 6 minutos a 56°C, sendo a seguir lavadas em água corrente e água destilada. A coloração foi feita em solução corante Giemsa - tampão fosfato 0,02 M pH 5,8 (1:5) por 2 minutos. Lavou-se em água corrente e depois das lâminas estarem secas fez-se a montagem com lamínula.

3.15. Fusão de protoplastos

Protoplastos dos mutantes a serem cruzados, obtidos segundo o ítem 3.14.1., foram misturados em quantidades iguais (cerca de 10^6 protoplastos/ml) e centrifugados a 2.900 g/10 minutos.

Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 1 ml de solução de agente fusogênico (PEG) o qual foi mantido a 28°C por 10 minutos. Após este período, adicionou-se cerca de 10 ml de solução estabilizadora (ítem 3.2.26.) e centrifugou-se a 2.900 g/10 minutos.

Repetiu-se o procedimento por mais duas vezes, para retirada do PEG, sendo o precipitado finalmente

ressuspenso em 4 ml de estabilizador. Procederam-se diluições apropriadas e colocou-se 0,1 ml em placa de cultura.

3.15.1. Obtenção dos produtos de fusão e análise genética

Os produtos de fusão foram semeados em meio mínimo + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, meios seletivos para as marcas envolvidas no cruzamento (combinação duas a duas das marcas dos parentais) mais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, meio completo + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e meio completo. Após 8 dias de incubação à 28°C avaliaram-se as frequências de recombinantes e procedeu-se à análise genética segundo os itens 3.12.3. e 3.12.4.

3.16. Teste de produção semiquantitativa de enzimas celolíticas em colônias originadas de protoplastos regenerados

Colônias crescidas em meio completo + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foram transferidas, com auxílio de palitos esterilizados, para meio teste para atividade celolítica (item 3.2.5.). Após incubação por 5 dias à 28°C procedeu-se a avaliação (item 3.13.). O delineamento foi inteiramente casualizado com 3 repetições por colônia.

3.17. Técnicas eletroforéticas (PACCOLA-MEIRELLES *et alii*, 1988)

3.17.1. Preparo da amostra

Conídios das linhagens testadas foram coletados em solução Tween 80 e inoculados em frascos erlenmeyers de 250 ml com 50 ml de meio completo líquido. Após a incubação à 28°C por 5 dias, a película formada foi filtrada à vácuo em filtro de Buchner e lavada duas vezes com água destilada. O micélio foi levemente seco com papel de filtro e pesado.

Para cada 300 mg de micélio foi adicionado 1 ml de tampão do gel empilhador (ítem 3.2.29.3.). O micélio foi triturado em homogeneizador elétrico por 5 minutos e deixado em banho de gelo durante 12 horas. Em seguida o extrato foi centrifugado a 20.000 g/20 minutos.

Os extratos protéicos, sobrenadantes, foram transferidos para frascos, vedados e conservados a aproximadamente -10°C.

3.17.2. Preparo da placa de gel de acrilamida

A placa foi montada em sistema vertical e vedada com ágar-água (4%). Verteu-se o gel separador (10%) na

placa com auxílio de uma seringa de vidro. Completou-se o restante da placa com água até polimerização. Após retirada da água, verteu-se o gel empilhador (4%) também com auxílio de uma seringa e introduziu-se o pente sobre este gel. Uma vez polimerizado o gel empilhador, retirou-se o pente e o espaçador inferior da placa, fixando-a a cuba de corrida.

Misturou-se 0,5 ml do extrato proteico com 0,5 ml do tampão da amostra. Foram aplicados 50 microlitros de cada amostra nas canaletas do gel. A corrida foi feita a 100 V até o material atingir o gel empilhador, elevou-se a voltagem a 200 V mantendo-a até o final da corrida.

3.17.3. Coloração para revelação de esterases

Ao término da corrida, o gel foi retirado da placa e imerso na solução corante (ítem 3.2.29.9.) até o aparecimento das bandas. Retirou-se o gel do corante, mantendo-o em água.

3.18. Análise estatística

Os resultados obtidos foram comparados estatisticamente através do teste de Tukey, segundo os delineamentos experimentais dos ensaios (GOMES, 1985).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Aspectos biológicos de *T. pseudokoníngii* var. Rifai

4.1.1. Determinação de condições ótimas de crescimento

A linhagem de *Trichoderma pseudokoníngii* foi testada quanto ao crescimento nos meios mínimo (ítem 3.2.1.) e completo (ítem 3.2.2.), visando estudos genéticos. O crescimento foi avaliado a 28°C, 37°C e 44°C. O melhor crescimento e o melhor tempo de esporulação, foram observados à 28°C em ambos meios, embora tenha havido crescimento e esporulação nas demais temperaturas. STERNBERG (1976), CASTRO (1982) e CARVALHO (1989) também consideraram a temperatura de 28°C como ótima para o crescimento e atividade celulolítica em espécies do gênero *Trichoderma*.

O crescimento de *T. pseudokoníngii* foi testado também em meio indutível para a produção de celulasas, meio mineral para celulolítico (ítem 3.2.5.), com vistas à produção semiquantitativa, em meio sólido. Observou-se crescimento e esporulação à partir de 48 horas e 72 horas de incubação, respectivamente, à 28°C, mostrando eficiência na

utilização de celulose como fonte de carbono.

Avaliou-se o pH ótimo para crescimento de *T. pseudokoníngii* em meio completo e meio mineral para microrganismos celulolíticos. A Tabela 1 apresenta os resultados do crescimento em diferentes valores de pH. Pode-se observar que em ambos meios, embora principalmente em meio mineral para celulolítico, valores de pH de 5,0 - 6,0 foram melhores para crescimento, uma vez que crescimento e atividade enzimática variam em função de valores de pH do meio de cultivo (KNAPP & LEGG, 1986). CASTRO (1982) também determinou o pH 5,5 como ótimo para crescimento e esporulação de *Trichoderma reesei* QM9414.

4.1.2. Determinação da redução de colônia pelo emprego de desoxicolato de sódio

Nas condições de crescimento determinadas, temperatura de 28°C e pH 5,5, não foi possível a obtenção de colônias individualizadas, devido ao rápido crescimento, característico do gênero *Trichoderma*. As Tabelas 2 e 3 mostram a redução do diâmetro de colônias de *T. pseudokoníngii* por desoxicolato de sódio, em meios completo e mineral para celulolítico.

Tabela 1 - Avaliação do pH ótimo para crescimento da linhagem selvagem de *Trichoderma pseudokoningii* var. *riagai* à 28°C em meio completo (MC) e meio mineral para celulolítico (CA).

pH	Tempo (horas) ⁺							
	24		48		72		88	
	MC	CA	MC	CA	MC	CA	MC	CA
5,00	3,50	2,70	8,80	8,00	8,80	8,80	8,80	8,80
5,50	3,20	2,35	8,20	6,80	8,80	8,25	8,80	8,80
6,00	3,10	2,80	8,20	7,10	8,80	8,65	8,80	8,80
6,50	3,00	2,20	8,00	6,15	8,80	8,10	8,80	8,70
6,80	2,80	2,30	7,80	7,15	8,80	8,50	8,80	8,65
7,00	2,70	1,60	7,20	5,00	8,80	7,95	8,80	8,70
7,50	2,30	1,50	6,80	4,70	8,80	7,65	8,80	8,50

+ = Os resultados são expressos em cm.

Tabela 2 - Redução do diâmetro de colônias de *T. pseudo-koningii* pelo emprego de desoxicolato de sódio, crescidas em meio completo (Os dados constituem média de 3 repetições).

Concentração (%)	Tempo (horas) ⁺					
	24	36	48	72	96	120
0,0	1,50	4,57	6,44	9,00	9,00	9,00
0,05	0,30	0,87	1,17	1,70	2,17	2,67
0,075	0,40	0,93	1,14	1,67	2,14	2,47
0,1	0,37	0,80	1,07	1,57	2,04	2,44
0,2	0,27	0,60	0,94	1,34	1,77	2,14
0,3	0,34	0,77	1,00	1,47	1,80	2,14
0,4	0,24	0,60	0,77	1,10	1,47	1,74

+ = Os resultados são expressos em cm.

Tabela 3 - Redução do diâmetro de colônias de *T. pseudo-koningii* pelo emprego de desoxicolato de sódio, crescidas em meio mineral para celulolítico (Os dados constituem média de 3 repetições).

Concentração (%)	Tempo (horas) ⁺					
	24	36	48	72	96	120
0,0	1,54	3,84	5,47	9,00	9,00	9,00
0,05	0,22	0,60	1,00	1,80	2,64	3,10
0,075	0,20	0,60	0,90	1,67	2,37	3,00
0,1	0,20	0,57	0,80	1,57	2,30	3,07
0,2	0,20	0,60	0,84	1,34	2,04	2,67
0,3	0,30	0,50	0,70	0,95	1,15	1,60
0,4	0,20	0,40	0,55	0,75	1,10	1,33

+ = Os resultados são expressos em cm.

Em ambos os meios, o diâmetro das colônias no 5º dia de crescimento reduziu consideravelmente na presença do desoxicolato de sódio, sendo o efeito da inibição diretamente proporcional a concentração usada. Em concentrações de 0,2% em meio completo e 0,3% em meio mineral para celulolítico, obteve-se redução suficiente para individualização de colônias. Esta substância redutora tem sido utilizada com sucesso na obtenção de colônias isoladas de espécies do gênero *Trichoderma* (SCHIMENTI *et alii*, 1983; ZALDIVAR *et alii*, 1987 e CARVALHO, 1989), e outros fungos filamentosos (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1977). CARVALHO (1989) analisou o efeito de desoxicolato de sódio sobre o diâmetro das colônias e observou o desenvolvimento micelial e conidiação em *Trichoderma reesei* QM9414 e *Trichoderma* sp., determinando a utilização de 0,5% de redutor em todos os ensaios. Constatou ainda, que o desoxicolato de sódio atua à nível de metabolismo primário, retardando o desenvolvimento das hifas e a formação de conídios. Na presença do indutor, observou também a ocorrência de clamidosporos, em *Trichoderma* sp, após 72 horas de incubação.

Comparativamente, aos resultados de CARVALHO (1989), a linhagem *T. pseudokoningii* mostrou-se mais sensível ao efeito redutor do desoxicolato de sódio. Embora, em outros fungos como *Aspergillus nidulans*, concentrações meno

res, 0,08%, são suficientes para a obtenção de colônias isoladas (PIZZIRANI, 1977). Em *Humicola* sp, a concentração de 0,12% de desoxicolato de sódio, reduziu em 100% o crescimento das colônias (RODRIGUES, 1987).

4.1.3. Verificação do número de núcleo por conídio

À partir da avaliação de 1000 conídios de *T. pseudokoningii*, após coloração pelo método descrito no item 3.9., observou-se uma frequência de 100% de conídios uninucleados. O número de núcleo por conídio é um dado importante em estudos genéticos, pois a obtenção e seleção de mutantes, ocorre mais facilmente a partir de conídios uninucleados. A Figura 1 mostra a coloração dos núcleos de conídios de *T. pseudokoningii*.

4.2. Sobrevivência a mutagênicos

4.2.1. Sobrevivência a luz ultravioleta

Suspensões de conídios de *T. pseudokoningii* foram irradiadas com luz ultravioleta, como descrito no item 3.10.1. A Tabela 4 e a Figura 2 mostram os dados referentes a percentagem de sobreviventes e curva de sobrevivência, respectivamente. A percentagem de aproximadamente 5% de sobrevivência foi obtida aos 7 minutos de tratamento.

Figura 1 - Coloração de conídios de *T. pseudokoníngii*.
(aumento de 1000 x).

Tabela 4 - Número e percentagem relativa de conídios de *T. pseudokoningii* sobreviventes à luz ultravioleta. (Os dados constituem média de 3 repetições).

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml	% relativa de sobreviventes
0	$6,71 \times 10^5$	100,00
1	$6,34 \times 10^5$	94,40
2	$5,43 \times 10^5$	80,83
4	$2,44 \times 10^5$	36,34
6	$5,38 \times 10^4$	8,00
7	$3,05 \times 10^4$	4,52
8	$1,17 \times 10^4$	1,74

Figura 2 - Curva de sobrevivência de *T. pseudokoningii* à luz ultravioleta.

O tempo de tratamento obtido para *T. pseudokoningii* foi bem inferior àqueles obtidos para *Humicola* sp (1987) e *Aspergillus niger* (GOLDMAN, 1988), mas superior em relação a outros fungos como *Aspergillus* sp (PEREIRA, 1978), *Metarhizium anisopliae* (BAGALHI, 1987) e *Beauveria bassiana* (PACCOLA-MEIRELLES, 1988). Embora apresente conídios pigmentados (RIFAI, 1969), o que dificultaria a penetração da luz ultravioleta, estes são uninucleados, o que poderia explicar valores intermediários de tratamento, em relação a outros fungos. A luz ultravioleta tem sido utilizada com sucesso na obtenção de mutantes de espécies do gênero *Trichoderma* (WEINMAN-GREENSHPAN & GALUN, 1969; SCHIMENTI *et alii*, 1983; TOYAMA *et alii*, 1984; KAWAMORI *et alii*, 1985; NEVALAINEN, 1975 e CARVALHO, 1989).

4.2.2. Sobrevivência ao ácido nitroso

Os esporos de *T. pseudokoningii* foram submetidos ao tratamento com ácido nitroso, como descrito no item 3.10.2. A Tabela 5 e a Figura 3 mostram os dados referentes a percentagem de sobreviventes e curva de sobrevivência, respectivamente. A percentagem de aproximadamente 5% de sobrevivência foi obtida aos 30 minutos de tratamento. Da mesma forma que no tratamento com luz ultravioleta, a sensibilidade de *T. pseudokoningii* ao ácido nitroso apre-

sentou valores intermediários, comparativamente, aos 10 minutos de tratamento obtidos para *A. nidulans* (PIZZIRANI, 1977) e 80 minutos obtidos por GOLDMAN (1988) para o tratamento de conídios de *A. niger*.

Tabela 5 - Número e percentagem relativa de conídios de *T. pseudokoningii* sobreviventes ao ácido nitroso. (Os dados constituem média de 3 repetições).

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml	% relativa de sobreviventes
0	$4,15 \times 10^4$	100,00
5	$3,44 \times 10^4$	80,34
10	$1,92 \times 10^4$	48,75
15	$1,23 \times 10^4$	28,17
20	$5,21 \times 10^3$	12,08
25	$2,91 \times 10^3$	6,77
30	$1,46 \times 10^3$	3,33

Figura 3 - Curva de sobrevivência de *T. pseudokoníngii* ao ácido nitroso.

4.3. Obtenção de mutantes morfológicos e auxotróficos

4.3.1. Mutantes morfológicos obtidos através de irradiação com luz ultravioleta e tratamento com ácido nitroso

Os mutantes morfológicos, para cor de conídios, foram obtidos durante os ensaios realizados para o estabelecimento das curvas de sobrevivência à luz ultravioleta e ao ácido nitroso. Na Tabela 6 estão sumarizados os mutantes morfológicos obtidos. Foram isolados sete mutantes morfológicos, de coloração branca ou amarela, dos quais dois, TY₅UV₈ e TW₄UV₇, foram utilizados na obtenção de marcas auxotróficas, por apresentarem características de bom crescimento e esporulação.

GREENSHPAN & GALUN (1971), CARVALHO (1989) obtiveram mutantes de coloração branca, amarela e marrom em *T. viride* e *Trichoderma* spp, respectivamente. Ao contrário, CASTRO (1982) obteve somente mutante branco a partir de *T. reesei* QM9414.

Tabela 6 - Mutantes para coloração de conídios de *T. pseudokoningii* obtidos através de irradiação com luz ultravioleta e tratamento com ácido nitroso.

Mutantes	Fenótipo
TY ₅ UV ₈ ⁺	amarela
TY ₆ UV ₇	amarela
TW ₄ UV ₇	branca
TW ₇ UV ₈	branca
TW ₈ UV ₆	branca
TY ₅ AN ₃₀ ⁺⁺	amarela
TW ₆ AN ₅	branca

+ = Mutantes representados por UV foram obtidos através de irradiação com luz ultravioleta.

++ = Mutantes representados por AN foram obtidos através de tratamento com ácido nitroso.

Os números que seguem as siglas UV e AN representam o tempo de exposição aos respectivos mutagênicos.

GREENSHPAN & GALUN (1971), sugeriram que os genes designados W^C , Y^a , Y^b e Br apresentam um papel estrutural sequencial na biossíntese do pigmento verde em *T. viride*.

4.3.2. Mutantes auxotróficos simples obtidos com luz ultravioleta, através de isolamento total

Os mutantes auxotróficos simples, foram obtidos a partir da linhagem selvagem de *T. pseudokoningii* e dos mutantes morfológicos, TY_5UV_8 e TW_4UV_7 , como descrito no item 3.11.1. A Tabela 7 apresenta os mutantes auxotróficos com uma deficiência simples. Foram obtidos dezenove mutantes auxotróficos simples, sendo que o mutante TY_5UV_8-2 apresenta também, uma segunda marca morfológica. O símbolo TG representa coloração verde de conídios.

4.3.3. Determinação do tempo de enriquecimento por filtração para obtenção de mutantes auxotróficos

O tempo adequado para o enriquecimento por filtração foi determinado como descrito no item 3.11.2. A Tabela 8 e a Figura 4 mostram a percentagem de colônias auxotróficas (mutante TW_4UV_7-9) e prototróficas por tempo de

Tabela 7 - Mutantes auxotróficos simples de *T. pseudokoningii* obtidos com luz ultravioleta através de isolamento total.

Mutantes	Fenótipo
TY ₅ UV ₈ - 1	leu ₁
TY ₅ UV ₈ - 2	rib ⁺⁺
TY ₅ UV ₈ - 3	arg ₁
TY ₅ UV ₈ - 4	ade
TY ₅ UV ₈ - 5	lis ₁
TY ₅ UV ₈ - 6	lis ₂
TY ₅ UV ₈ - 7	arg ₂
TW ₄ UV ₇ - 8	leu ₁
TW ₄ UV ₇ - 9	met
TW ₄ UV ₇ - 10	leu ₂
TW ₄ UV ₇ - 11	nic
TGUV ₇ - 12	arg ₁
TGUV ₇ - 13	arg ₂
TGUV ₇ - 14	arg ₃
TGUV ₇ - 15	met
TGUV ₇ - 16	rib
TGUV ₇ - 17	nic ₁
TGUV ₇ - 18	nic ₂
TGUV ₇ - 19	nic ₃

+ = Os símbolos ade, arg, leu, lis, met, nic e rib representam respectivamente deficiências nutricionais para adenina, arginina, leucina, lisina, metionina, ácido nicotínico e riboflavina.

++ = Mutante com diâmetro da colônia reduzido (compacto).

Tabela 8 - Percentagem relativa do número de colônias selvagens e mutantes de *T. pseudokoningii* para os diferentes tempos de agitação após filtração. (Os dados constituem média de 2 repetições).

Tempo (hora)	LINHAGEM	
	SELVAGEM	TW ₄ UV ₇ - 9
0	47,00	53,00
3	41,20	58,80
6	36,81	63,19
9	24,92	75,08
12	9,25	90,75
18	0,00	100,00
24	9,18	90,82

Figura 4 - Percentagem relativa entre colônias auxotróficas e prototróficas por tempo de cultivo em meio mínimo.

cultivo em meio mínimo líquido. O tempo adequado para enriquecimento foi determinado como sendo de 18 horas, pois, a percentagem de colônias auxotróficas foi proporcional ao tempo de incubação até 18 horas, após o qual esta percentagem começou a diminuir, devido provavelmente à liberação, pelos conídios prototróficos, de substâncias que permitiram o crescimento de colônias auxotróficas em meio mínimo.

4.3.4. Mutantes auxotróficos duplos obtidos com luz ultravioleta através de isolamento total e enriquecimento por filtração

Os mutantes auxotróficos duplos foram obtidos como descrito nos itens 3.11.1. e 3.11.3. A Tabela 9 apresenta os mutantes auxotróficos isolados com dupla deficiência. Foram isolados 18 mutantes auxotróficos duplos.

A frequência de obtenção de mutantes auxotróficos com dupla deficiência, através de isolamento total e enriquecimento por filtração, está apresentada na Tabela 10.

O rendimento médio obtido através de isolamento total foi de 1,1%, enquanto que através de enriquecimento por filtração foi de 1,8%, sendo o aumento médio observado de 1,64 vezes.

Tabela 9 - Mutantes auxotróficos duplos de *T. pseudokoningii* obtidos com luz ultravioleta através de isolamento total e enriquecimento por filtração.

Mutantes	Fenótipo ⁺	Descendência
TGUV ₇ - 20	arg ₁ rib	TGUV ₇ - 12
TGUV ₇ - 21	arg ₁ leu	TGUV ₇ - 12
TYUV ₈ - 22	leu ₁ lis	TY ₅ UV ₈ - 1
TY ₅ UV ₈ - 23	rib ade ₁	TY ₅ UV ₈ - 2
TY ₅ UV ₈ - 24	rib ade ₂	TY ₅ UV ₈ - 2
TY ₅ UV ₈ - 25	rib lis ₁	TY ₅ UV ₈ - 2
TY ₅ UV ₈ - 26	rib lis ₂	TY ₅ UV ₈ - 2
TY ₅ UV ₈ - 27	rib lis ₃	TY ₅ UV ₈ - 2
TY ₅ UV ₈ - 28	rib arg	TY ₅ UV ₈ - 2
TW ₄ UV ₇ - 29	leu ₁ tio	TW ₄ UV ₇ - 8
TW ₄ UV ₇ - 30	leu ₁ arg ₁	TW ₄ UV ₇ - 8
TW ₄ UV ₇ - 31	leu ₁ arg ₂	TW ₄ UV ₇ - 8
TW ₄ UV ₇ - 32	leu ₁ bio	TW ₄ UV ₇ - 8
TGUV ₇ - 33	nic ₃ ade	TGUV ₇ - 19
TGUV ₇ - 34	nic ₃ arg	TGUV ₇ - 19
TGUV ₇ - 35	nic ₃ met ₁	TGUV ₇ - 19
TGUV ₇ - 36	nic ₃ met ₂	TGUV ₇ - 19
TGUV ₇ - 37	nic ₃ met ₃	TGUV ₇ - 19

+ = Os símbolos ade, arg, bio, leu, lis, met, nic, rib e tio representam respectivamente deficiências nutricionais para adenina, arginina, biotina, leucina, lisina, metionina, ácido nicotínico, riboflavina e tiosulfato.

Tabela 10 - Frequência de obtenção de mutantes auxotróficos duplos de *T. pseudokoningii* através de isolamento total e enriquecimento por filtração.

TRATAMENTO	MUTANTES UTILIZADOS	Nº DE COLÔNIAS ANALISADAS	Nº DE MUTANTES OBTIDOS	FREQUÊNCIA DE MUTANTES OBTIDOS
ISOLAMENTO TOTAL	TY ₅ UV ₈ - 1	520	2	0,0038
	TY ₅ UV ₈ - 2	754	12	0,016
	TW ₄ UV ₇ - 8	578	7	0,012
		1852	21	0,011
ENRIQUECIMENTO POR FILTRAÇÃO	TGUV ₇ - 12	416	4	0,0096
	TGUV ₇ - 19	234	8	0,034
		650	12	0,018

Comparativamente a outros fungos como *Aspergillus awamori* (FUNGARO, 1984), *Metarhizium anisopliae* (SILVEIRA & AZEVEDO, 1984 e BAGALHI, 1987) e *Aspergillus niger* (GOLDMAN, 1988), o aumento na obtenção de mutantes de *T. pseudokoningii* através de enriquecimento por filtração foi baixo, em relação ao isolamento total.

Em ambas as técnicas utilizadas, foram obtidos mutantes para aminoácidos, ácido nucleico e vitaminas, embora tenha havido predominância de mutantes para aminoácidos. Ao contrário, FUNGARO (1984) não obteve mutantes com deficiência nutricional para vitaminas através do método de enriquecimento por filtração. SILVEIRA & AZEVEDO (1984) e BAGALHI (1987) encontraram maior frequência de mutantes para aminoácidos através de enriquecimento, em relação ao isolamento total.

4.4. Teste de reversão

Os mutantes auxotróficos duplos, que apresentavam bom crescimento e esporulação, foram ensaiados quanto a reversão de suas marcas, como descrito no item 3.11.4. A frequência de reversão espontânea para as marcas está representada na Tabela 11. Os resultados demonstram estabilidade genética nos mutantes obtidos, permitindo a utilização destes em técnicas genéticas.

Tabela 11 - Frequência de reversão em 10^6 a 10^7 conídios/ml dos mutantes auxotróficos duplos de *T. pseudo-koningii*.

Mutantes	MM + 1º requisito	MM + 2º requisito
TGUV ₇ - 20	<1	<1
TGUV ₇ - 21	<1	<1
TY ₅ UV ₈ - 22	<1	<1
TY ₅ UV ₈ - 23	<1	<1
TY ₅ UV ₈ - 24	<1	<1
TY ₅ UV ₈ - 25	<1	<1
TY ₅ UV ₈ - 26	<1	<1
TY ₅ UV ₈ - 27	<1	<1
TY ₅ UV ₈ - 28	<1	<1
TW ₄ UV ₇ - 29	<1	<1
TW ₄ UV ₇ - 30	<1	<1
TW ₄ UV ₇ - 31	<1	<1
TW ₄ UV ₇ - 32	<1	<1
TGUV ₇ - 33	<1	<1
TGUV ₇ - 34	<1	<1
TGUV ₇ - 35	<1	<1
TGUV ₇ - 36	<1	<1
TGUV ₇ - 37	<1	<1

4.5. Atividade celulolítica da linhagem selvagem de *T. pseudokoníngii* e mutantes

A atividade celulolítica, expressa na forma de índice enzimático (item 2.1.3.), foi obtida a partir de colônias da linhagem selvagem de *T. pseudokoníngii*, de mutantes auxotróficos simples e duplos e do mutante QM9414 de *T. reesei*. Os resultados estão sumarizados na Tabela 12.

A análise de variância, Tabela 13, mostra que há variabilidade nas linhagens quanto à produção de celulas. A Tabela 14 apresenta o teste de comparação de médias do índice enzimático das linhagens, em meio para atividade celulolítica. O mutante TY₅UV₈-24 mostrou-se significativamente superior em relação aos demais mutantes ensaiados. Pela análise das Tabelas 12 e 13, observou-se que linhagens de menor crescimento, menor diâmetro de colônia, apresentaram valores médios de atividade celulolítica maiores, em relação as linhagens de maior crescimento. Os valores de índices enzimáticos foram proporcionais a maior ou menor compactação das linhagens. O mutante de maior grau de compactação, TY₅UV₈-24, foi significativamente diferente das demais linhagens. Na Figura 5 observa-se halos de degradação da celulose.

Tabela 12 - Diâmetro das colônias, colônias + halo e índice enzimático do mutante QM9414 de *T. reesei*, da linhagem selvagem de *T. pseudokoningii* e alguns mutantes auxotróficos simples e duplos. (Os valores dados em cm constituem média de 3 repetições).

LINHAGENS	DIÂMETRO DAS COLÔNIAS (d)	DIÂMETRO DAS COLÔNIAS + HALO (D)	ÍNDICE ENZIMÁTICO
QM 9414	6,17	6,40	1,034
Selvagem(S ₂)	5,24	5,37	1,024
TY ₅ UV ₈ - 1	2,57	3,17	1,234
TY ₅ UV ₈ - 4	4,97	5,30	1,067
TY ₅ UV ₈ - 6	3,18	3,54	1,106
TY ₅ UV ₈ - 5	4,06	4,45	1,090
TY ₅ UV ₈ - 2	1,34	2,03	1,540
TW ₄ UV ₇ - 8	1,98	2,74	1,370
TGUV ₇ - 17	5,77	6,28	1,326
TGUV ₇ - 19	5,54	5,97	1,073
TGUV ₇ - 16	2,70	3,51	1,316
TGUV ₇ - 20	5,70	6,10	1,070
TGUV ₇ - 21	2,40	3,14	1,303
TY ₅ UV ₈ - 22	3,41	3,64	1,060
TY ₅ UV ₈ - 23	1,51	2,20	1,450
TY ₅ UV ₈ - 24	0,93	1,97	2,103
TY ₅ UV ₈ - 25	2,81	3,47	1,226
TY ₅ UV ₈ - 26	1,60	2,45	1,530
TY ₅ UV ₈ - 27	1,50	2,35	1,560
TY ₅ UV ₈ - 28	2,94	3,58	1,216
TW ₄ UV ₇ - 29	5,47	5,77	1,050
TW ₄ UV ₇ - 30	2,37	3,04	1,113
TW ₄ UV ₇ - 31	2,64	3,18	1,280
TW ₄ UV ₇ - 32	5,27	5,57	1,203
TGUV ₇ - 33	4,84	5,38	1,050
TGUV ₇ - 34	5,47	5,80	1,056
TGUV ₇ - 35	5,64	5,94	1,050
TGUV ₇ - 36	5,30	5,61	1,053
TGUV ₇ - 37	5,50	5,81	1,053

Tabela 13 - Análise de variância da atividade celulolítica do mutante QM9414 de *T. reesei*, da linhagem selvagem de *T. pseudokoningii* e mutantes auxotróficos simples e duplos.

CAUSAS DA VARIÇÃO	G.L.	QM	VALOR F	C.V.
Linhagens	28	0,1659	26,7881*	6,472%
Resíduo	58	0,0061		

* = Significativo a 5%; C.V. = Coeficiente de Variação.

Observa-se que as linhagens diferem entre si a nível de 5% e 1% segundo teste de Tukey, representado na Tabela 12b.

Tabela 14 - Teste de Tukey, para médias de índice enzimático, do mutante QM9414 de *T. reesei*, da linhagem selvagem de *T. pseudokoningii* e mutantes auxotróficos simples e duplos.

LINHAGENS	MÉDIAS	5%	1%
TY ₅ UV ₈ - 24	2,103	a	A
TY ₅ UV ₈ - 27	1,560	b	B
TY ₅ UV ₈ - 2	1,540	bc	B
TY ₅ UV ₈ - 26	1,530	bcd	B
TW ₄ UV ₇ - 8	1,373	bcde	BC
TY ₅ UV ₈ - 23	1,350	bcdef	BCD
TGUV ₇ - 16	1,316	bcdefg	BCDE
TGUV ₇ - 21	1,303	cdefgh	BCDEF
TW ₄ UV ₇ - 31	1,280	defghi	BCDEF
TY ₅ UV ₈ - 1	1,233	efghij	CDEF
TY ₅ UV ₈ - 25	1,226	efghij	CDEF
TY ₅ UV ₈ - 28	1,216	efghij	CDEF
TW ₄ UV ₇ - 32	1,203	efghij	CDEF
TW ₄ UV ₇ - 30	1,113	fghij	CDEF
TY ₅ UV ₈ - 6	1,106	fghij	CDEF
TY ₅ UV ₈ - 5	1,090	ghij	CDEF
TGUV ₇ - 17	1,086	ghij	CDEF
TGUV ₇ - 19	1,073	ghij	DEF
TGUV ₇ - 20	1,070	ghij	DEF
TY ₅ UV ₈ - 4	1,066	ghij	DEF
TW ₄ UV ₇ - 29	1,060	hij	EF
TGUV ₇ - 34	1,056	hij	EF
TGUV ₇ - 37	1,053	hij	EF
TGUV ₇ - 36	1,053	hij	EF
TGUV ₇ - 35	1,050	ij	EF
TGUV ₇ - 33	1,050	ij	EF
TW ₄ UV ₇ - 29	1,050	ij	EF
QM ₉₄₁₄	1,033	ij	EF
SELVAGEM(S ₂)	1,023	j	F

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

DMS à: 1% = 0,2875.

5% = 0,2523.

Figura 5 - Halos de degradação da celulose. A) Linhagem selvagem de *T. pseudokoningii*; B) Mutante TGU_V₇-37; C) Mutante TW₄UV₇-32; D) Mutante TW₄UV₇-31; E) Mutante TGU_V₇-20; F) Mutante TY₅UV₈-28; G) Mutante TY₅UV₈-26; H) Mutante TY₅UV₈-24.

Não foi constatada nenhuma correlação entre marcas nutricionais e índices enzimáticos, pelo menos, para os mutantes ensaiados.

Em atividades enzimáticas alteradas, podem estar envolvidos mecanismos de síntese e/ou excreção. Segundo MOSCOSO (1987), colônias pequenas, porém com massa micelial densa, compactadas, poderiam apresentar maior número de núcleos por unidade de área, resultando em uma produção enzimática maior, proporcionalmente ao tamanho da colônia. Em *Neurospora crassa*, GRATZNER (1972), descreveu um mutante com alterações na parede celular, associadas com a hiperprodução de enzimas extracelulares; MORAYAMA & TSHIKAWA (1973), obtiveram mutantes com alterações simultâneas de atividades exoenzimáticas e de crescimento. Em *Aspergillus nidulans*, MOSCOSO (1987) relatou que linhagens de menor crescimento apresentaram os maiores índices enzimáticos para lipase, amilase e protease. VALADARES (1989) relatou que recombinantes de *Metarhizium anisopliae* com crescimento reduzido, apresentaram maiores médias de índice amilolítico.

Os fatores determinantes de alterações em atividades enzimáticas, são difíceis de serem delimitados, devido a natureza complexa do problema. Alguns destes fatores são bem discutidos por MOSCOSO (1987).

Análises bioquímicas do complexo celulase,

para a determinação dos componentes individuais, da linhagem selvagem e mutantes de *T. pseudokoningii*, deve ser objeto de estudo futuro.

4.6. Técnicas genéticas

4.6.1. Obtenção de heterocários

Os heterocários foram obtidos como descrito no item 3.12.1. O meio mínimo contendo 4% de meio completo foi efetivo para a formação de películas heterocarióticas. Em todos os heterocários obtidos observou-se vigor de crescimento. A Tabela 15 mostra os resultados da obtenção de heterocários nos quatro cruzamentos realizados.

Tabela 15 - Vigor do heterocário entre diferentes mutantes de *T. pseudokoningii*.

Heterocários	Nº de conídios obtidos ($\times 10^8$)
TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁ + TGUV ₇ nic ₃ met ₃	2,12
TGUV ₇ arg ₁ rib + TY ₅ UV ₈ leu lis	1,24
TY ₅ UV ₈ rib arg + TW ₄ UV ₇ leu tio	1,23
TY ₅ UV ₈ rib ade ₂ + TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁	2,00

Os heterocários TY_5UV_8 rib arg + TW_4UV_7 leu tio e TY_5UV_8 rib ade₂ + TW_4UV_7 leu₁ arg₁ apresentaram crescimentos vigorosos e coloração verde mesclada de pontos amarelos e brancos, e os heterocários $TGUV_7$ arg₁ rib + TY_5UV leu lis e TW_4UV_7 leu₁ arg₁ + $TGUV_7$ nic₃ met₃ apresentaram coloração verde, restaurando a cor da linhagem selvagem.

Os resultados observados indicam não apenas complementação das marcas auxotróficas, mas também a existência de um sistema de regulação não autônomo para a pigmentação dos conídios nesta linhagem. CARVALHO (1989) também obteve heterocários de coloração verde mesclada, a partir de mutantes de *Trichoderma* sp. Ao contrário, CASTRO (1982) obteve heterocários de coloração verde, entre mutantes de *T. reesei* QM6a.

GREENSHPAN & GALUN (1971) analisaram a relação de complementação entre mutantes para coloração de *T. viride*. Observaram a formação de conídios verdes em alguns heterocários, enquanto que em outros, não havia complementação. Segundo estes autores, em *Trichoderma*, o mesmo micélio heterocariótico produz não somente conídios verdes, mas também conídios com pigmentação dos tipos parentais, devido a uma parcial ou incompleta expressão de genes não autônomos. Este fato pode explicar a ocorrência de coloração verde mesclada observada no presente trabalho.

A existência de um sistema de regulação não autônomo foi observada também em *Aspergillus flavus* (MESSIAS, 1977), *Aspergillus* spp (PEREIRA, 1978), *Aspergillus niger* (BONATELLI JR., 1981) e *Metarhizium anisopliae* (BAGALHI, 1987 e VALADARES, 1989), ao contrário do que ocorre em outros fungos como *Aspergillus nidulans* (PONTECORVO, *et alii*, 1953), *Penicillium chrysogenum* (PONTECORVO & SERMONTI, 1954), *Penicillium expansum* (BARRON, 1962) e *Aspergillus parasiticus* (PAPA, 1978) em que os conídios uninucleados de heterocários apresentam um sistema de regulação autônomo para a coloração de esporos.

4.6.2. Obtenção de colônias prototróficas e outros tipos de recombinantes

Conídios obtidos a partir das colônias heterocarióticas foram semeados em MC, MM e MM com suplementação combinada das marcas auxotróficas envolvidas no cruzamento como descrito no item 3.12.2. As Tabelas 16, 17, 18 e 19 apresentam as frequências de colônias obtidas nos diferentes meios seletivos.

Pode-se observar que as frequências de colônias obtidas a partir do heterocário $TW_4UV_7 leu_1 arg_1 + TGUV_7 nic_3 met_3$ foram inferiores às frequências obtidas a partir dos outros heterocários analisados. Este resultado pode sugerir maior incompatibilidade desses mutantes, em relação aos demais.

Tabela 16 - Frequência de colônias resultantes do heterocário entre TW_4UV_7 leu₁ arg₁ + $TGUV_7$ nic₃ met₃ nos diferentes meios seletivos.

Meios seletivos	Frequência de colônias ($\times 10^{-4}$)
MM ¹	5,93
MM + leu + nic	4,01
MM + leu + met	5,64
MM + arg + nic	5,25
MM + arg + met	4,74

1-MM: Meio Mínimo (PONTECORVO *et alii*, 1953).

Tabela 17 - Frequência de colônias resultantes do heterocário entre $TGUV_7$ arg₁ rib + TY_5UV_8 leu lis nos diferentes meios seletivos.

Meios seletivos	Frequências de colônias ($\times 10^{-3}$)
MM ¹	2,97
MM + arg + leu	2,02
MM + arg + lis	2,19
MM + rib + leu	2,30
MM + rib + lis	2,66

1-MM: Meio Mínimo (PONTECORVO *et alii*, 1953).

Tabela 18 - Frequência de colônias resultantes do heterocário entre $TY_5^{UV_8}$ rib arg + $TW_4^{UV_7}$ leu tio nos diferentes meios seletivos.

Meios seletivos	Frequência de colônias ($\times 10^{-3}$)
MM ¹	1,50
MM + rib + leu	1,53
MM + rib + tio	1,49
MM + arg + leu	1,80
MM + arg + tio	1,53

1-MM: Meio Mínimo (PONTECORVO *et alii*, 1953).

Tabela 19 - Frequência de colônias resultantes do heterocário entre $TY_5^{UV_8}$ rib ade₂ + $TW_4^{UV_7}$ leu₁ arg₁ nos diferentes meios seletivos.

Meios seletivos	Frequência de colônias ($\times 10^{-3}$)
MM ¹	1,95
MM + rib + leu	2,07
MM + rib + arg	2,10
MM + ade + leu	2,14
MM + ade + arg	2,39

1-MM: Meio Mínimo (PONTECORVO *et alii*, 1953).

4.6.3. Análise genética

4.6.3.1. Avaliação de colônias prototróficas

Em todos os heterocários analisados se observou crescimento de colônias verdes em MM.

Após coloração de núcleo de algumas dessas colônias prototróficas, observou-se a ocorrência de conídios binucleados. Os resultados indicam que estes núcleos, coexistindo em um citoplasma comum, são geneticamente diferentes, pois houve complementação das marcas envolvidas no cruzamento.

As colônias prototróficas dicarióticas foram ensaiadas quanto a estabilidade em MC e MC acrescido de 0,5 µg de benomyl. Todas as colônias analisadas apresentaram setores em ambos os meios ou, em pelo menos, um deles.

Foram isolados 15 setores a partir de colônias prototróficas de cada heterocário. A Tabela 20 apresenta as frequências de produtos recombinantes obtidos a partir dessas colônias.

Tabela 20 - Frequências de produtos recombinantes de *T. pseudokoningii* a partir de colônias prototróficas.

HETEROCÁRIO	Nº de setores analisados	Marcas Genéticas	Número Observado	Frequência (%)
TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁	15	met	3	20,00
+		nic met	10	66,67
TGUV ₇ nic ₃ met ₃		arg nic met	1	6,67
		prototrófico	1	6,67
TGUV ₇ arg ₁ rib	15	arg rib	15	100,00
+				
TY ₅ UV ₈ leu lis				
TY ₅ UV ₈ rib arg	15	tio	1	6,67
+		leu tio	12	80,00
TW ₄ UV ₇ leu tio		prototrófico	2	13,34
TY ₅ UV ₈ rib ade ₂	15	arg	1	6,67
+		leu arg	7	46,67
TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁		prototrófico	7	46,67

Nos dicários TW_4UV_7 leu₁ arg₁ + $TGUV_7$ nic₃ met₃ $TGUV_7$ arg₁ rib + TY_5UV_8 leu lis todos os setores obtidos eram verdes. Já os dicários TY_5UV_8 rib arg + TW_4UV_7 leu tio e TY_5UV_8 rib ade₂ + TW_4UV_7 leu₁ arg₁ apresentaram setores verdes e brancos.

A partir da análise genética dos setores obtidos, pode-se observar que os setores brancos apresentaram marcas do tipo parental e todos os setores oriundos do heterocário $TGUV_7$ arg₁ rib + TY_5UV_8 leu lis eram do tipo parental. A ocorrência desses setores pode ser resultado de segregação dos núcleos nos conídios binucleados.

Nos demais heterocários analisados, obteve-se setores dos tipos parentais bem como tipos recombinantes, quanto às marcas auxotróficas. Após coloração de núcleo dos recombinantes prototróficos obtidos, observou-se 100% de conídios uninucleados, não permanecendo, portanto, o estado dicariótico. A partir desses resultados pode-se sugerir a ocorrência de fusão nuclear seguida de haploidização, sendo a fase diplóide altamente instável.

Todos os setores obtidos mostraram-se estáveis em MC, exceto os setores prototróficos do dicário TY_5UV_8 rib ade₂ + TW_4UV_7 leu₁ arg₁, que produziram novos setores (Figura 6) os quais também eram prototróficos. Estes resultados indicam a ocorrência de aneuploidia nessas colônias.

Figura 6 - Setores provenientes de colônias prototróficas do heterocário $TY_5^{UV_8}$ $rib\ ade_2 + TW_4^{UV_7}$ $leu_1\ arg_1$, produzindo novos setores em MC.

4.6.3.2. Análise dos recombinantes

Colônias originadas dos heterocários, crescidas nos diferentes meios seletivos, foram analisadas quanto as marcas auxotróficas.

A Tabela 21 sumariza os tipos e frequências de recombinantes obtidos diretamente dos heterocários. As Tabelas 22, 23, 24 e 25 apresentam as frequências de recombinantes, obtidos nos quatro cruzamentos realizados, em diferentes meios seletivos.

Tabela 21 - Frequência de produtos recombinantes de *T. pseudoninkii* obtidos diretamente de heterocário.

Heterocário	Número de colônias analisadas	Marcas genéticas	Número observado	Frequência (%)
TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁ + TGVV ₇ nic ₃ met ₃	112	met	5	4,46
		nic	2	1,78
		arg	1	0,89
		arg nic	1	0,89
		nic met	1	0,89
		arg leu met	6	5,35
		arg leu met nic	2	1,78
		prototróficos	94	83,92
TGVV ₇ arg ₁ ribo + TY ₅ UV ₈ leu lis	104	leu	1	0,96
		leu rib	1	0,96
		ribo arg	1	0,96
		leu rib arg	1	0,96
		leu lis ribo arg	100	96,15
TY ₅ UV ₈ ribo arg + TW ₄ UV ₇ leu tio	106	tio	35	33,01
		leu	5	4,71
		tio arg	1	0,94
		ribo tio	3	2,83
		leu tio	26	24,52
		ribo leu tio	5	4,71
		leu tio arg	3	2,83
		leu tio arg rib	2	1,88
TY ₅ UV ₈ ribo ade ₂ + TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁	108	prototróficos	26	24,52
		leu	9	8,33
		arg	10	9,25
		leu arg	54	50,00
		arg leu ade	2	1,85
		arg leu rib	1	0,92
		ribo ade arg	1	0,92
		ribo ade leu	1	0,92
		ribo ade leu arg	1	0,92
		prototróficos	29	26,85

Tabela 22 - Frequência de recombinantes à partir do heterocário de $TW_4^{UV_7} leu_1 arg_1 + TGUV_7 nic_3 met_3$ em diferentes meios seletivos.

MARCAS GENÉTICAS	MEIOS SELETIVOS				
	MM + leu + nic	MM + leu + met	MM + arg + nic	MM + arg + met	MC
met	3,84	15,38	-	-	-
nic	-	7,69	-	-	-
arg	-	-	3,84	-	-
arg nic	-	3,84	-	-	-
nic met	-	3,84	-	-	-
arg leu met	-	-	-	-	38,46
arg leu met nic	-	-	-	-	15,38
prototróficos	96,15	69,23	69,23	100,00	-

Tabela 23 - Frequência de recombinantes à partir do heterocário de TGV₇ arg₁ rib. + TY_{5UV}₈ leu lis em diferentes meios seletivos.

MARCAS GENÉTICAS	MEIOS SELETIVOS				
	MM + arg + leu	MM + arg + lis	MM + rib + leu	MM + rib + lis	MC
leu	3,84	-	-	-	-
leu rib	-	-	3,84	-	-
ribo arg	-	3,84	-	-	-
leu rib arg	-	-	3,84	-	-
leu lis rib arg	96,15	96,15	92,30	100,00	-

Tabela 24 - Frequência de recombinantes a partir do heterocário de TY₅UV₈ rib arg + TW₄UV₇ leu tio em diferentes meios seletivos.

MARCAS GENÉTICAS					
	MM + rib + leu	MM + rib + tio	MM + arg + leu	MM + arg + tio	MC
tio	23,07	65,38	15,38	30,76	-
leu	7,69	-	-	11,53	-
tio arg	-	-	3,84	-	-
ribo tio	-	-	11,53	-	-
leu tio	50,00	11,53	23,07	15,38	-
ribo leu tio	-	-	7,69	3,84	84,61
leu tio arg	-	-	3,84	7,69	-
leu tio arg rib	-	-	8,00	-	-
prototróficos	19,23	23,07	26,92	30,76	-

Tabela 25 - Frequência de recombinantes a partir do heterocário de TY_{5UV_8} rib $ade_2 + TW_{4UV_7}$ leu₁ arg₁ em diferentes meios seletivos.

MARCAS GENÉTICAS	MEIOS SELETIVOS				
	MM + rib + leu	MM + rib + arg	MM + ade + leu	MM + ade + arg	MC
leu	7,69	-	26,92	-	-
arg	3,84	30,76	-	3,84	-
leu arg	11,53	38,46	61,53	96,15	-
arg leu ade	-	7,69	-	-	-
arg leu rib	-	3,84	-	-	-
ribo ade arg	-	-	-	-	7,69
ribo ade leu	-	-	-	-	7,69
ribo ade leu arg	-	-	-	-	7,69
prototróficos	76,92	19,23	11,53	-	69,23

A partir de conídios dos heterocários obtidos, observou-se a ocorrência de diferentes tipos recombinantes, apresentando marcas auxotróficas distintas dos parentais.

Pela análise da Tabela 21 pode-se observar uma alta frequência de recombinantes prototróficos a partir dos heterocários TW_4UV_7 leu₁ arg₁ + $TGUV_7$ nic₃ met₃, TY_5UV_8 rib arg + TW_4UV_7 leu tio e TY_5UV_8 rib ade₂ + TW_4UV_7 leu₁ arg₁. Ao contrário, o heterocário $TGUV_7$ arg₁ rib + TY_5UV_8 leu lis apresentou alta frequência de colônias auxotróficas para todas as marcas envolvidas no cruzamento. A observação de colônias prototróficas em todos os meios seletivos (Tabelas 22, 24 e 25) e auxotróficas para todas as marcas (Tabela 23) pode sugerir que estes se originam de permuta mitótica. No entanto, é difícil distinguir se estes segregantes resultaram de haploidização, permuta mitótica ou permuta mitótica e haploidização.

No heterocário $TGUV_7$ arg₁ rib + TY_5UV_8 leu lis observou-se o crescimento de colônias somente nos meios seletivos. Nos demais heterocários, embora tenha-se obtido recombinantes em MC, a maioria foram obtidos em meios com suplementação combinada das marcas dos parentais. Da mesma forma que em *T. pseudokoníngii*, em *Metarhizium anisopliae*

também observou-se maiores frequências de recombinantes, a partir de heterocários, nos meios seletivos (BAGALHI, 1987 e VALADARES, 1989). Estes resultados demonstram a importância da utilização de meios seletivos para a obtenção de recombinantes. Segundo VALADARES (1989), a não obtenção de produtos de recombinação entre linhagens, pode estar relacionada ao uso de somente MC e MM para a recuperação de colônias a partir de heterocários.

WEINMAN-GREENSHPAN & GALUN(1969) e GREENSHPAN & GALUN (1971) obtiveram somente colônias parentais a partir de conídios provenientes de heterocários de *T. viride*, o que condiz com o observado por CARVALHO (1989) em heterocários de *Trichoderma* sp. Tais resultados podem ser decorrentes da não utilização de meios seletivos.

A alta frequência de recombinantes obtidos, indica a ocorrência de uma fase diplóide altamente instável, apresentando elevada taxa de recombinação e haploidização nas hifas heterocarióticas, fenômeno designado de parameiose por BONATELLI JR. *et alii* (1983).

A ocorrência de parameiose foi observada em alguns fungos como *Cephalosporium acremonium* (BALL & HAMLYN, 1982), *Aspergillus niger* (BONATELLI JR. *et alii*, 1983), *M. anisopliae* (BAGALHI, 1987 e VALADARES, 1989) e *Beauveria*

bassiana (PACCOLA-MEIRELLES, 1988).

Pela análise das Tabelas 22, 23, 24 e 25 pode-se observar, nos meios seletivos, tipos recombinantes diferentes do esperado. Tais tipos recombinantes podem ter sido originados de aneuploidias, como resultado de não divisão mitótica, seguida de haploidização, como ocorre em *Aspergillus nidulans* (AZEVEDO, 1976). A obtenção desses recombinantes se deu provavelmente pela transferência das colônias, a partir dos meios seletivos, para placas mestras de MC. O estado aneuplóide foi confirmado pela visualização de setores em algumas dessas colônias em MC. Resultados semelhantes foram obtidos por VALADARES (1989) em colônias recombinantes de *M. anisopliae*.

Segundo CARVALHO (1989), as etapas envolvidas na pesquisa de parassexualidade no gênero *Trichoderma*, só foram comprovadas até a formação de heterocário. A detecção de diplóides estáveis não foi ainda efetiva. Talvez estes resultados se devam a não utilização de meios seletivos, na detecção de recombinantes, uma vez que a fase diplóide parece ser altamente instável.

4.7. Atividade celulolítica de colônias prototróficas dicarióticas e recombinantes obtidos de heterocários

A atividade celulolítica, expressa na forma de índice enzimático, foi obtida a partir das linhagens parentais, e colônias prototróficas dicarióticas e recombinantes originados dos heterocários. As Tabelas 26, 29, 31 e 34 apresentam os índices enzimáticos obtidos, seguidos de suas respectivas análises estatísticas (Tabelas 27, 28, 30, 32, 33, 35 e 36).

Tabela 26 - Diâmetro das colônias, colônias + halo e índice enzimático dos recombinantes, parentais e colônias dicarióticas, obtidos a partir de TW₄UV₇ leu₁ arg₁ + TGV₇ nic₃ met₃. (Os valores dados em cm, constituem média de 3 repetições).

LINHAGENS	Diâmetro das Colônias (d)	Diâmetro das Colônias + HALO (D)	Índice Enzimático
met*	4,84	5,10	1,055
nic*	1,41	1,74	1,221
arg*	5,14	5,51	1,074
arg nic*	1,24	1,64	1,326
met nic*	1,97	2,47	1,252
arg leu met*	5,07	5,47	1,078
arg nic met*	1,71	2,28	1,331
prototrófico	5,27	5,77	1,096
leu arg (P ₁)	1,97	2,44	1,238
nic met (P ₂)	2,84	3,40	1,200
D ₂₃	5,53	5,80	1,048
D ₂₉	5,00	5,34	1,066

* = Recombinantes para as marcas auxotróficas citadas.

P₁ e P₂ = Parentais.

D₂₃ e D₂₉ = Colônias dicarióticas.

Tabela 27 - Análise de variância da atividade celulolítica dos recombinantes, parentais e colônias dicarióticas obtidos a partir de TW₄UV₇ leu₁ arg₁ + TGV₇ nic₃ met₃.

CAUSAS DA VARIÇÃO	G.L.	QM	VALOR F	C.V.
Linhagens	11	0,0346	13,7626*	4,304%
Resíduo	24	0,0025		

* = Significativo a 5%; C.V. = Coeficiente de Variação.

Tabela 28 - Teste de Tukey, para médias de índices enzimáticos dos recombinantes, parentais e colônias dicarióticas obtidos a partir de TW₄UV₇ leu₁ arg₁ + TGV₇ nic₃ met₃.

LINHAGENS	MÉDIAS	5%	1%
arg nic met*	1,331	a	A
arg nic*	1,326	a	A
met nic*	1,252	a	AE
leu arg (P ₁)	1,238	ab	ABC
nic*	1,221	abc	ABCD
nic met (P ₂)	1,200	abcd	ABCD
Prototrófico	1,096	bcde	BCD
arg leu met*	1,078	cde	BCD
arg*	1,074	cde	CD
D ₂₉	1,066	de	CD
met*	1,055	de	D
D ₂₃	1,048	e	D

* = Recombinantes para as marcas auxotróficas citadas.

P₁ e P₂ = Parentais.

D₂₃ e D₂₉ = Colônias dicarióticas.

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

DMS a 1% = 0,1769.

5% = 0,1477.

Tabela 29 - Diâmetro das colônias, colônias +halo e índice enzimático dos recombinantes parentais e colônias dicarióticas, obtidos a partir de TGV₇ arg₁ rib +TY₅UV₈ leu lis. (Os valores dados em cm, constituem média de 3 repetições).

LINHAGENS	DIÂMETRO DAS COLÔNIAS (d)	DIÂMETRO DAS COLÔNIAS + HALO (D)	ÍNDICE ENZIMÁTICO
leu*	5,00	5,47	1,091
leu rib*	5,84	6,24	1,068
leu rib arg*	5,60	5,97	1,065
rib arg*	5,94	6,50	1,092
leu lis rib arg*	5,80	6,06	1,045
arg rib (P ₁)	5,80	6,10	1,051
leu lis (P ₂)	4,38	4,64	1,060
D ₁₁	5,70	5,97	1,046
D ₁₄	5,24	5,47	1,044

* = Recombinantes para as marcas auxotróficas citadas.

P₁ e P₂ = Parentais.

D₁₁ e D₁₄ = Colônias dicarióticas.

Tabela 30 - Diâmetro das colônias, colônias +halo e índice enzimático dos recombinantes, parentais e colônias dicarióticas, obtidos a partir de TGV₇ arg₁ rib +TY₅UV₈ leu lis. (Os valores dados em cm, constituem média de 3 repetições).

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	QM	VALOR F	C.V.
Linhagens	8	0,0010	2,1007 n.s.	2,099
Resíduo	18	0,0004		

n.s. = Não Significativo.

C.V. = Coeficiente de Variação.

Tabela 31 - Diâmetro das colônias, colônias +halo e índice enzimático dos recombinantes, parentais e colônias dicarióticas obtidos a partir de TY₅UV₈ rib arg + TW₄UV₇ leu tio. (Os valores dados em cm, constituem média de 3 repetições).

LINHAGENS	Diâmetro das Colônias (d)	Diâmetro das Colônias + HALO (D)	Índice Enzimático
tio*	4,17	4,57	1,093
leu*	5,14	5,24	1,019
rib tio*	5,90	6,07	1,028
tio arg*	3,34	3,34	1,000
leu tio*	4,97	5,14	1,034
rib leu tio*	1,47	1,70	1,160
leu tio arg*	4,64	5,07	1,094
leu tio arg rib*	4,64	4,87	1,050
prototróficos	3,06	3,26	1,065
leu tio (P ₁)	4,67	5,00	1,070
rib arg (P ₂)	1,97	2,70	1,374
D ₁	3,90	4,17	1,074
D ₁₀	4,40	4,70	1,071

* = Recombinantes para as marcas auxotróficas citadas.

P₁ e P₂ = Parentais.

D₁ e D₁₀ = Colônias dicarióticas.

Tabela 32 - Análise de variância da atividade celulolítica dos recombinantes, parentais e colônias dicarióticas obtidos à partir de TY₅UV₈ rib arg₁ + TW₄UV₇ leu tio.

CAUSAS DA VARIÇÃO	G.L.	QM	VALOR F	C.V.
Linhagens	12	0,0271	30,2403*	2,755%
Resíduo	26	0,0008		

* = Significativo a 5%; C.V. = Coeficiente de Variação.

Tabela 33 - Teste de Tukey, para médias de índices enzimáticos, dos recombinantes, parentais e colônias dicarióticas obtidos à partir de TY₅UV₈ rib arg + TW₄UV₇ leu tio.

LINHAGENS	MÉDIAS	5%	1%
rib arg (P ₂)	1,373	a	A
rib leu tio*	1,160	b	B
leu tio arg*	1,094	bc	BC
tio*	1,093	bc	BC
D ₁	1,074	bcd	BC
D ₁₀	1,071	cd	BC
leu tio (P ₁)	1,070	cd	BC
prototrófico	1,065	cd	BC
leu tio arg rib*	1,050	cd	C
leu tio*	1,033	cd	C
rib tio*	1,029	cd	C
leu*	1,019	cd	C
tio arg*	1,000	d	C

* = Recombinantes para as marcas auxotróficas citadas.

P₁ e P₂ = Parentais.

D₁ e D₁₀ = Colônias dicarióticas.

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

DMS à: 1%: 0,1060.

5%: 0,089.

Tabela 34 - Diâmetro das colônias, colônia + halo e índice enzimático dos recombinantes, parentais e colônias dicarióticas obtidos a partir de TY₅UV₈ rib ade₂ + TW₄UV₇ leu₁ arg₁. (Os valores dados em cm, constituem média de 3 repetições).

LINHAGEM	DIÂMETRO DAS COLÔNIAS (d)	DIÂMETRO DAS COLÔNIAS + HALO (D)	ÍNDICE ENZIMÁTICO
leu*	3,03	3,43	1,132
arg*	3,67	3,86	1,055
arg leu ade*	4,03	4,40	1,091
arg leu rib*	4,17	4,74	1,137
rib ade arg*	0,90	1,68	1,870
rib ade leu*	1,04	1,87	1,806
rib ade leu arg*	1,00	1,83	1,835
prototrófico ₁	2,23	2,93	1,313
prototrófico ₂	2,60	3,20	1,234
leu arg (P ₁)	0,97	1,84	1,909
rib ade (P ₂)	4,37	4,84	1,106
D ₃	4,00	4,40	1,096
D ₄₄	4,74	5,00	1,055

* = Recombinantes para as marcas auxotróficas citadas.

P₁ e P₂ = Parentais.

D₃ e D₄₄ = Colônias dicarióticas.

Tabela 35 - Análise de variância da atividade celulolítica dos recombinantes, parentais e colônias dicarióticas obtidos a partir de TY₅UV₈ rib ade₂ + TW₄UV₇ leu₁ arg₁.

CAUSAS DA VARIACÃO	G.L.	QM	VALOR F	C.V.
Linhagens	12	0,3145	19,1524*	9,624%
Resíduo				

* = Significativo a 5%; C.V. = Coeficiente de Variação

Tabela 36 - Teste de Tukey, para médias de índices enzimáticos, dos recombinantes, parentais e colônias dicarióticas obtidos a partir de TY₅UV₈ rib ade₂ + TW₄UV₇ leu₁ arg₁.

LINHAGENS	MÉDIAS	5%	1%
rib ade (P ₂)	1,909	a	A
rib ade leu arg*	1,835	a	A
rib ade leu*	1,806	a	A
rib ade arg*	1,537	ab	AB
prototrófico ₂	1,313	bc	BC
leu arg (P ₁)	1,234	bc	BC
arg leu rib*	1,137	c	BC
leu*	1,132	c	BC
prototrófico ₁	1,106	c	BC
D ₃	1,096	c	BC
arg leu ade*	1,091	c	BC
arg*	1,055	c	C
D ₄₄	1,055	c	C

* = Recombinantes para as marcas auxotróficas citadas; P₁ e P₂ = Parentais; D₃ e D₄₄: Colônias dicarióticas.

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

DMS a: 1% = 0,4535

5% = 0,3807

A análise de variância, Tabela 27, mostra que há diferenças significativas entre as colônias, originadas do heterocário TW_4UV_7 leu₁ arg₁ + $TGUV_7$ nic₃ met₃. Os recombinantes arg nic met e arg nic apresentaram índices enzimáticos superiores a 1 e 5% de significância. No entanto, somente a atividade da colônia dicariótica D_{23} foi significativamente diferente a 5%, em relação às demais colônias analisadas.

Entre as colônias recombinantes obtidas do heterocário $TGUV_7$ arg₁ rib + TY_5UV_8 leu lis e os parentais não se observou diferenças quanto à atividade celulolítica. (Tabela 30).

Pela análise da Tabela 32, observou-se diferenças significativas de atividade, entre as colônias analisadas, obtidas do heterocário TY_5UV_8 rib arg + TW_4UV_7 leu tio. No entanto, pode-se observar (Tabela 33) que o parental ribo arg foi significativamente superior em relação às demais colônias.

Quanto às colônias provenientes do heterocário TY_5UV_8 rib ade₂ + TW_4UV_7 leu₁ arg₁, observou-se que também há diferenças significativas entre elas. O parental ribo ade e os recombinantes ribo ade leu arg e ribo ade leu apresentaram maiores valores médios de atividade celulolíti

ca. Estes recombinantes que apresentaram médias de índices enzimáticos iguais ao parental compacto rib ade também apresentaram crescimento reduzido. Como discutido anteriormente, a relação de tamanho de colônia e atividade enzimática parece envolver mecanismos complexos. Desta forma, um maior número de recombinantes devem ser analisados quanto à atividade celulolítica, com vistas à obtenção de colônias com produtividade enzimática aumentada. Em *Aspergillus niger* foram obtidos colônias de crescimento lento apresentando valores altos de unidade ácida, embora nenhuma correlação entre esses valores e produção ácida total foi observada (SILVA & AZEVEDO, 1978).

4.8. Protoplastos de *T. pseudokoningii*

4.8.1. Obtenção e regeneração de protoplastos

A Tabela 37 apresenta os resultados referentes a obtenção e regeneração de protoplastos da linhagem selvagem e mutantes de *T. pseudokoningii*.

Comparando-se as linhagens ensaiadas, pode-se observar uma grande variação nas percentagens de regeneração. LAURILA *et alii* (1985) também observaram diferenças na obtenção e regeneração de protoplastos entre mutantes de *T. reesei*. Os autores atribuíram estes resultados à diferenças morfológicas entre as amostras. Em *Penicillium pinophilum* (BROWN *et alii*, 1986) e em *M. anisopliae* (BAGALHI, 1987 e VALADARES, 1989) resultados semelhantes foram obtidos.

Tabela 37 - Número de protoplastos obtidos e frequência de regeneração da linhagem selvagem de *T. pseudo-koningii* e alguns mutantes, em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6M.

LINHAGEM	Número de protoplastos (ml^{-1})	Percentagem de regeneração
Selvagem (S_2)	$3,28 \times 10^7$	12,24
TGUV ₇ - 20	$9,24 \times 10^6$	0,47
TGUV ₇ - 37	$8,48 \times 10^6$	14,26
TW ₄ UV ₇ - 30	$3,44 \times 10^5$	5,81
TW ₄ UV ₇ - 29	$1,32 \times 10^7$	14,48
TY ₅ UV ₈ - 24	$2,25 \times 10^7$	4,45
TY ₅ UV ₈ - 22	$2,84 \times 10^6$	0,00
TY ₅ UV ₈ - 28	$5,36 \times 10^6$	0,00

As variações nas frequências de regeneração, devem estar relacionadas à alterações estruturais decorrentes da protoplastização.

O estabilizador osmótico $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi eficiente para a obtenção e regeneração de protoplastos de *T. pseudokoníngii*, o que condiz com o observado por MELO & HEALE (1989). Tal estabilizador também foi efetivo para *T. reesei* (BENITEZ *et alii*, 1975 e PICATAGGIO *et alii*, 1983).

Após a coloração de protoplastos da linhagem selvagem (S_2), como descrito no item 3.14.2., observou-se a ocorrência de uni, bi, tri, tetra e polinucleados, sendo a maioria uni e binucleados (Tabela 38). Resultados semelhantes foram obtidos por LAURILA *et alii* (1985) em *T. reesei*.

Tabela 38 - Frequência de número de núcleos em protoplastos da linhagem selvagem de *Trichoderma pseudokoníngii* var. Rifai.

LINHAGEM	Número de núcleos/protoplastos (%)				
	1	2	3	4	> 4
Selvagem	34	41	19	3	3

Segundo NECAS & SVOBODA (1985), a heterogeneidade no número de núcleos, em protoplastos de fungos miceliais, pode ocorrer devido a uma distribuição desigual do conteúdo citoplasmático em uma região da hifa ou resultar da liberação de protoplastos em diferentes partes da hifa.

4.8.2. Fusão de protoplastos

Protoplastos dos mutantes $TW_4^{UV_7-30}$ e $TGUV_7-37$ foram fusionados com PEG, como descrito no item 3.15. Os possíveis produtos de fusão foram semeados em MC + $(NH_4)_2SO_4$, MM + $(NH_4)_2SO_4$ e MM + $(NH_4)_2SO_4$ com complementação combinada das marcas auxotróficas dos parentais. A Tabela 39 mostra as frequências de colônias obtidas nos diferentes meios seletivos.

Tabela 39 - Frequência de colônias obtidas de $TW_4^{UV_7}$ leu₁ arg₁ + $TGUV_7$ nic₃ met₃, via fusão de protoplastos, em diferentes meios seletivos.

MEIOS SELETIVOS	FREQUÊNCIAS DE COLÔNIAS ($\times 10^{-1}$)
MM ¹	3,78
MM + leu + nic	2,78
MM + leu + met	4,63
MM + arg + nic	4,57
MM + arg + met	3,63

Estas frequências comparadas às obtidas à partir de heterocários resultantes de anastomose de hifas (Tabela 16), foram aproximadamente 1000 vezes superiores. Este resultado indica uma maior eficiência na obtenção de recombinantes, via fusão de protoplastos em relação a anastomose de hifas.

As colônias crescidas em $\text{MM} + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentaram coloração verde e conídios binucleados, da mesma forma que o observado para colônias obtidas em MM, à partir de heterocário. Estas colônias crescidas em $\text{MC} + 0,5 \mu\text{g}$ de benlate apresentaram setores, dos quais 15 foram analisados geneticamente. A Tabela 40 apresenta as frequências dos produtos recombinantes obtidos. Todos os setores recombinantes eram verdes, à exceção do setor branco leu arg met (Figura 7).

Pela análise da Tabela 40 pode-se observar uma maior frequência de colônias recombinantes em relação a colônias do tipo parental, comparativamente às frequências obtidas por anastomose de hifas (Tabela 20).

Procedendo-se a análise genética de 101 colônias, obtidas diretamente dos produtos de fusão, nos dife

Tabela 40 - Frequências de produtos recombinantes obtidos de TW₄UV₇ leu₁ arg₁ + TGV₇ nic₃ met₃, via fusão de protoplastos, a partir de colônias prototróficas.

Heterocário	Produtos Recombinantes	Frequência (%)
TW ₄ UV ₇ leu ₁ arg ₁	met	20,00
+	arg met	20,00
TGV ₇ nic ₃ met ₃	nic met	6,67
	arg nic met	40,00
	leu arg met	13,34

Figura 7 - Colônia prototrófica, resultante do cruzamento $TW_4UV_7 leu_1 arg_1 + TGUV_7 nic_3 met_3$, via fusão de protoplasto, emitindo setor recombinante branco.

rentes meios seletivos, pode-se observar uma baixa frequência de tipos parentais (Tabela 41). Tais resultados sugerem a ocorrência de alta frequência de recombinação mitótica.

A Tabela 42 apresenta as frequências de produtos recombinantes, nos meios seletivos. Comparando-se às frequências obtidas através de heterocário (Tabela 22) pode-se observar uma maior variação de tipos recombinantes nesta via de cruzamento. Talvez, a obtenção de recombinantes esteja relacionada com a metodologia utilizada, pelo menos para as marcas envolvidas. Para resultados mais conclusivos, outros cruzamentos devem ser realizados.

A maior frequência de recombinantes, a partir de colônias prototróficas e dos meios seletivos, em relação a colônias dos tipos parentais, obtida através de fusão de protoplastos, indica uma maior eficiência desta via para cruzamento, pelo menos no que se refere aos mutantes utilizados. Os resultados mostram a importância de se utilizar meios seletivos, com marcas combinadas dos parentais, para a recuperação de recombinantes, pois a instabilidade observada via heterocário, paramiose, foi verificada também via fusão de protoplastos.

Tabela 41 - Frequências de produtos recombinantes, obtidos no cruzamento de $TW_4UV_7 leu_1 arg_1 + TGUV_7 nic_3 met_3$, via fusão de protoplastos.

NÚMERO DE COLÔNIAS ANALISADAS	MARCAS GENÉTICAS	NÚMERO OBSERVADO	FREQUÊNCIA (%)
101	met	80	79,20
	arg met	2	1,98
	leu met	1	0,99
	nic met	7	6,93
	prototróficos	11	10,89

Tabela 42 - Frequência de produtos recombinantes obtidos no cruzamento de $TW_4^{UV_7} leu_1 arg_1 + TGUV_7 nic_3 met_3$, via fusão de protoplastos, em diferentes meios seletivos.

MARCAS GENÉTICAS	MEIOS SELETIVOS			
	MM + leu + nic	MM + leu + met	MM + arg + nic	MM + arg + met
met	69,23	84,61	88,46	73,91
arg met	-	3,84	3,84	-
leu met	-	-	-	4,34
nic met	-	11,53	-	17,39
prototróficos	30,76	-	7,69	4,34

Heterocários e recombinantes de *T. reesei* foram também obtidos através de fusão de protoplastos (PICATAGGIO *et alii*, 1983; TOYAMA *et alii*, 1984 e MURKOVIC *et alii*, 1987). A formação de heterocários por fusão de protoplasto foi efetiva em casos em que anastomose de hifas foi ineficiente (MANCZINGER & FERENCZY, 1985). Segundo estes autores, diplóides estáveis não foram isolados, devido a natureza transitória do estado diplóide nesta espécie, o que condiz com o observado para *T. pseudokoníngii*, em ambas vias de cruzamento. No entanto, OGAWA *et alii* (1987) e OGAWA *et alii* (1989) obtiveram diplóides heterozigotos, a partir de hibridização intraespecífica, de mutantes morfológicos, em *T. reesei*. Segundo esses autores, a presença de conídios verdes foi indicativo de formação de diplóides, os quais foram obtidos pelo tratamento do heterocáριο com cânfora, confirmando a existência do ciclo parassexual através de fusão de protoplastos.

4.8.3. Atividade celololítica em colônias originadas de protoplastos regenerados

A regeneração de protoplastos de fungos filamentosos, representa uma ferramenta para estudos citológicos, bioquímicos e genéticos nesses organismos. Segundo ISAAC (1985) um dos principais estudos realizados em ter

mos de atividade metabólica de protoplastos, é o de síntese e secreção de enzimas. No entanto, normalmente, os protoplastos são utilizados como unidades funcionais, livres de parede, e não a partir de colônias regeneradas como ensaiado no presente trabalho.

A atividade celulolítica em colônias regeneradas de protoplastos foi testada como descrito no ítem 3.16. A Tabela 43 apresenta as médias de índices enzimáticos, em colônias originadas de conídios e protoplastos regenerados de *T. pseudokoningii*.

Pode-se observar pela análise de variância, que a origem das colônias ensaiadas, conídios ou protoplastos, foi altamente significativa, e que a atividade celulolítica, entre colônias não foi significativa (Tabela 44). Teste de Tukey para médias de índice enzimático de colônias originadas de protoplastos e conídios, revelou variação de atividade, com diferença significativa a 5 e 1% (Tabela 45). Estes resultados indicam um efeito negativo da protoplastização sobre a atividade celulase, pelo menos para a linhagem ensaiada.

Vários são os fatores que podem estar envolvidos na alteração da atividade. Segundo NECAS & SVOBODA (1985), a formação de protoplastos pode resultar em alte-

Tabela 43 - Índice enzimático para atividade celulolítica de colônias originadas de conídios e de protoplastos regenerados de *T. pseudokoningii*. (Os dados constituem da média de 3 repetições).

COLÔNIAS	ÍNDICE ENZIMÁTICO	
	COLÔNIAS ORIGINADAS DE CONÍDIOS	COLÔNIAS ORIGINADAS DE PROTOPLASTOS
1	2,284	2,209
2	2,282	2,146
3	2,321	2,268
4	2,333	2,277
5	2,244	2,158
6	2,234	2,218
7	2,342	2,210
8	2,385	2,154
9	2,344	2,180
10	2,337	2,218

Tabela 44 - Análise de variância para atividade celulolítica de colônias de *T. pseudokoníngii* originadas de conídios e protoplastos.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	QM	VALOR F	C.V.
COLÔNIAS	9	0,0074	1,9335 n.s.	2,750%
ORIGEM	1	0,1734	44,9685*	
COL. x ORI.	9	0,0058	1,5061 n.s.	
RESÍDUO	40	0,0038		

*Significativo a 5%.

n.s. = não significativo.

C.V. = Coeficiente de Variação.

Tabela 45 - Teste de Tukey para médias de índice enzimático de colônias de *T. pseudokoníngii* originadas de conídios e protoplastos.

ORIGEM DAS COLÔNIAS	MÉDIAS	5%	1%
Conídios	2,3117	a	A
Protoplastos	2,2042	b	B

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

D.M.S. a: 1% = 0,0433.

5% = 0,0324.

rações estruturais ou funcionais, devido a mudanças na ultraestrutura e distribuição das organelas de membrana, na arquitetura do sistema citoesquelético ou ainda pela perda de material periplasmático. Além desses, outros fatores podem estar envolvidos, como alterações em sistemas de transporte ou mesmo de regulação, à nível de parede.

BENITEZ *et alii* (1975) observaram diferenças químicas e estruturais em paredes regeneradas de protoplastos de *T. viride*.

Alterações de atividades enzimáticas em colônias de *P. pinophilum* e *M. anisopliae* regeneradas de protoplastos foram relatadas por BROWN *et alii*, 1986 e VALADARES, 1989, respectivamente. BROWN *et alii* (1986) observaram que em *P. pinophilum*, a protoplastização não alterou a atividade celulase extracelular, embora a atividade β -glicosidase tenha sido aumentada. Já colônias de linhagens selvagens e mutantes de *M. anisopliae*, obtidas a partir de protoplastos regenerados apresentaram atividades amilolíticas e proteolítica superiores em relação a colônias provenientes de conídios (VALADARES, 1989).

Maiores estudos deveriam ser realizados na tentativa de elucidar as alterações resultantes de protoplastização em *T. pseudokoningii*, e suas relações com atividade exoenzimática.

4.9. Caracterização eletroforética da linhagem selvagem e mutantes de *T. pseudokoningii*

Segundo PACCOLA-MEIRELLES *et alii* (1988) são inúmeras as aplicações da eletroforese em genética. Esta técnica constitui o melhor instrumento para estudos sobre a variação genética e possibilita a detecção de diferenças fenotípicas causadas por substituições alélicas de um único locus.

A linhagem selvagem e mutantes utilizados nos cruzamentos, foram caracterizados eletroforeticamente quanto à esterase. Os padrões de bandas de α -esterases, das amostras ensaiadas, estão apresentadas na Figura 8.

Pode-se observar a presença de bandas comuns a todas as amostras, embora exista variação nos perfis, com diferenças no número e posição de bandas. Somente o mutante TGV₇-20 apresenta padrão de bandas igual ao da linhagem selvagem. Os mutantes TW₄UV₇-30, TY₅UV₈-22, TY₅UV₈-24 e TY₅UV₈-28 apresentaram um padrão comum.

Não parece existir uma relação entre marcas auxotróficas e padrões de esterases entre os mutantes analisados, entretanto, pode-se sugerir uma correlação entre a coloração de conídios, uma vez que os mutantes auxotróficos, sem marcas morfológicas para cor, apresentaram padrões

Figura 8 - Padrões de α -esterase em linhagem selvagem e mutantes de *T. pseudokoníngii*. 1- Linhagem selvagem; 2- Mutante TGUV₇-37; 3- Mutante TGUV₇-20; 4- Mutante TW₄UV₇-29; 5- Mutante TW₄UV₇-30; 6- Mutante TY₅UV₈-22; 7- Mutante TY₅UV₈-24 e 8- Mutante TY₅UV₈-28.

de bandas semelhantes ao da linhagem selvagem.

Utilizando-se desta técnica, PACCOLA-MEIRELLES (1988) e VALADARES (1989) observaram uma grande variação nos padrões eletroforéticos para esterase de alguns recombinantes de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, respectivamente, confirmando o estado aneuplóide destes materiais.

5. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- Colônias prototróficas, obtidas dos heterocários, mantêm um estado dicariótico, sendo que a obtenção de recombinantes a partir dessas colônias e nos meios seletivos sugere a ocorrência de parassexualidade e paramiose nesta espécie;

- A setorização de recombinantes, obtidos nos meios seletivos e de setores originados de colônias prototróficas, indica a ocorrência de aneuploidias;

- A técnica de fusão de protoplastos se mostrou eficiente na obtenção de recombinantes em relação a anastomose de hifas;

- Índices enzimáticos de atividade celulolítica foram diretamente proporcionais ao maior ou menor grau de compactação das colônias, sendo que os mutantes mono e duplo auxotróficos apresentaram atividade celulolítica superior a linhagem selvagem e ao mutante QM9414;

- Colônias da linhagem selvagem originadas de protoplastos regenerados, apresentaram médias de atividade de celulolítica inferiores à de colônias originadas de conídios, mostrando um efeito negativo da protoplastização na atividade enzimática;

- Padrões eletroforéticos para α -esterase, da linhagem selvagens e mutantes, permitiram sugerir uma relação de perfis de bandas com coloração de conídios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, D.; COSTA, S.O.P.; SCHWAB, A.; OLIVEIRA, E.N.S.; BRANCO, C.L.; CURY, A.; TRAVASSOS, L.R. *Experimentos de Microbiologia Geral*. 3.^a ed., Curitiba, MEC/Universidade Federal do Paraná, 1967. 170p.
- AZEVEDO, J.L. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 2:3-15, 1976.
- AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. *Exercícios práticos de genética*. São Paulo, EDUSP, 1973. 288p.
- BAGALHI, E. Parameiose em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1987. 123p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BAILEY, M.J. & NEVALAINEN, K.M.H. Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of solubilizing cellulase. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, 3:157-7, 1981.
- BALL, C. & HAMLYN, P.F. Genetic recombination studies with *Cephalosporium acremonium* related to the production of the industrially important antibiotic Cephalosporin C. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 5:1-13, 1982.

- BARAK, R. & CHET, I. Serological methods as a tool for characterization of *Trichoderma* isolates. In: INTERNATIONAL TRICHODERMA/GLIOCLADIUM WORKSHOP, 2º, Salford, 1988. *Resumo*. Salford, University of Salford, 1988. p.3.
- BARRON, G.L. The parasexual cycle and linkage relationship in storage rot fungus *Penicillium expansum*, *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 40:1603-13, 1962.
- BARTLEY, T.D.; MURPHY-HOLLAND, K.; EVELEIGH, D.E. A method for the detection and differentiation of cellulase components in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, New York, 140:157-61, 1984.
- BÉGUIN, P. Detection of cellulase activity in polyacrylamide gels using congo red-stained agar replicas. *Analytical Biochemistry*, New York, 131:333-6, 1983.
- BENITEZ, T.; RAMOS, S.; GARCIA ACHA, I. Protoplasts of *Trichoderma reesei* formation and regeneration. *Archives of Microbiology*, Berlin, 103:199-203, 1975.
- BISARIA, V.S. & GHOSE, T.K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, 3:90-104, 1981.
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*, section *longibrachiatum*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 62:924-31, 1984.

- BONATELLI JR., R. Parassexualidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, 1981. 91p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BONATELLI JR., R.; AZEVEDO, J.L.; VALENT, G.V. Parassexuality in a citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 6:399-405, 1983.
- BORGES, M.I. Técnicas de protoplastização e isolamento de DNA de alto peso molecular de *Aspergillus niger*. Campinas, 1987. 112p. (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).
- BROWN, D.E. & HALSTED, D.J. The effect of acid pH on the growth kinetics of *Trichoderma viride*. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 17:1199-210, 1975.
- BROWN, J.A.; OGAWA, K.; WOOD, T.M. Studies on the preparation and regeneration of protoplasts from the cellulolytic fungus *Penicillium pinophilum*. *Enzyme Microbiol. Technology*, Guildford, 9:547-52, 1986.
- CARRAU, J.L.; DILLON, A.J.P.; BERTARELLO, A.L.; DAHMER, C.E. Produção de celulases em mutantes de fungos celulolíticos. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 15, Piracicaba, 1988. *Anais*. Piracicaba, 1988. p.58.
- CARVALHO, C.M.V. Conidiação, obtenção de mutantes, heterocariose e atividade celulolítica na linhagem selvagem *Trichoderma* sp. Belo Horizonte, 1989. 141p. (Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais).

- CASTRO, U.G. Aspectos básicos da biologia e genética do *Trichoderma reesei*. Belo Horizonte, 1982. 134p.
(Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais).
- COSTA, M.B. & UDEN, N.V. Use of 2-deoxyglucose in the selective isolation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced β -glucosidase production. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 22:2429-32, 1980.
- COUGHLAN, M.P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. In: RUSSELL, G.E., ed. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. Newcastle upon Tyne, Intercept, 1985. p.39-109.
- DURAND, H.; CLANET, M.; TIRABY, G. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, 10:341-6, 1988.
- ENARI, T.M. Microbial cellulases. In: FOGARTY, W.M., ed. *Microbial enzymes and biotechnology*. Applied Science, 1983. p.183-223.
- ENARI, T.M. & MARKKANEN, P. Production of cellulolytic enzymes by fungi. *Advances Biochemistry Engineering*, Berlin, 5:1-24, 1977.

- FUNGARO, M.H.P. Caracterização genética e dados citológicos em *Aspergillus niger* van Tieghem e *Aspergillus awamori* Nakazawa. Piracicaba, 1984. 134p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- GHOSE, T.K. & GHOSH, P. Cellulase production and cellulose hydrolysis. *Process Biochemistry*, London, 14, 1979.
- GHOSH, V.K.; GHOSE, T.K.; GOPALKRISHNAN, K.S. Improvement of *T. reesei* strain through mutation and selective screening techniques. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 24:241-3, 1982.
- GOKSØYR, J. & ERIKSEN, J. Cellulases. In: ROSE, A.H. *Microbial enzymes and bioconversions*. London, Academic Press, 1980. p.283-330.
- GOLDMAN, G.H. Estudos genéticos e produção de celulasas em *Aspergillus niger*. Piracicaba, 1988. 153p. (Mestrado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- GOLDMAN, G.H. & AZEVEDO, J.L. A simple screening of the cellulolytic activity of *Trichoderma* spp isolates in comparison with *T. reesei* QM9414. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, 30:267-73, 1987.

- GOLDMAN, G.H. & AZEVEDO, J.L. Melhoramento genético de microrganismos produtores de celulase. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 41(3):229-40, 1989.
- GOMES, F.P. *Curso de Estatística Experimental*. Livraria Nobel, São Paulo, 1985. 466p.
- GONG, C.S. & TSAO, G.T. Cellulase and biosynthesis regulation. In: PERLMAN, D., ed. *Annual reports on fermentation processes*. London, Academic Press, 1979. p.111-140.
- GRATZNER, H.G. Cell wall alterations associated with the hyperproduction of extracellular enzymes in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 111:443-6, 1972.
- GREENSHPAN, D. & GALUN, E. Complementation in nonconidiating mutants of *Trichoderma*. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 99:802-6, 1969.
- GRIFFIN, H.; DINTZIS, F.R.; KRULL, L.; BAKER, F.L. A microfibril generating factor from the enzyme complex of *Trichoderma reesei*. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 26:296-300, 1984.

- HAMLYN, P.F.; BRADSHAW, R.E.; MELLON, F.M.; SANTIAGO, C.M.; WILSON, J.M.; PEBERDY, J.F. Efficient protoplast isolation from fungi using comercial enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, 3:321-25, 1981.
- HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S.L. Solid media containing carboxymethylcellulose to defect Cx cellulase activity of microorganisms. *Journal of General Microbiology*, London, 98:109-15, 1977.
- HASTIE, A.C. Benlate induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature*, London, 226:771, 1970.
- ISAAC, S. Metabolic properties of protoplasts. In: PEBERDY, J.F. & FERENCZY, L. *Fungal protoplasts; aplications in biochemistry and genetics*. New York, Marcel Dekker, 1985. v.6, cap.8, p.173-88.
- KAWAMORI, M.; MORIKAWA, Y.; SHINSHA, Y.; TAKAYAMA, K.; TAKASAWA, S. Preparation of mutants resistant to catabolic repression of *T. reesei*. *Agricultural Biological Chemistry*, Tokyo, 49:2875-9, 1985.
- KIM, J.H.; HOSOBUCHI, M.; KISHIMOTO, M.; SEKI, T.; YOSHIDA, T.; TAGUCHI, H.; RYU, D.D.Y. Cellulase production by a solid state culture system. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 27:1445-50, 1985.
- KNAPP, J.S. & LEGG, M. The effect of different cellulosic growth substrates and pH on the production of cellulolytic enzymes by *T. reesei*. *Journal of Applied Bacteriology*, Reading, 61:319-29, 1986.

- KNOWLES, J.; LEHTOVAARA, P.; TEERI, T. Cellulase families and their genes. *Trends in Biotechnology*, Amsterdam, 5:255-61, 1987.
- LAURILA, H.O.; NEVALAINEN, H.; MAKINEN, V. Production of protoplasts from the fungi *Curvularia inaequalis* and *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 21:210-12, 1985.
- LEE, S.B. & KIM, I.K. Structural properties of cellulose and cellulase reaction mechanism. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 25:33-51, 1983.
- LEE, S.B.; SHIN, H.S.; DEWEY, D.; RYU, Y. Adsorption of cellulase on cellulose: effect of physicochemical properties of cellulose on adsorption and rate of hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 24:2137-53, 1982.
- LINARDI, V.R. & ROGANA, E. Influência do meio de cultura na produção de celulase. *Revista Brasileira de Tecnologia*, Brasília, 8:223-6, 1977.
- MACRIS, B.J. & GALIOTOU-PANAYOTOU, M. Enhanced cellobiohydrolase production from *Aspergillus ustus* and *Trichoderma harzianum*. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, 8:141-4, 1986.
- MANCZINGER, L. & FERENCZY, L. Somatic cell fusion of *Trichoderma reesei* resulting in new genetic combinations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 22:72-6, 1985.

- MANDELS, M. & REESE, E.T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 73:269-78, 1957.
- MANDELS, M. & REESE, E.T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 79:816-26, 1960.
- MANDELS, M.; MEDEIROS, J.E.; ANDREOTTI, R.E.; BISSETT, E.H. Enzymatic hydrolysis of cellulose: evaluation of cellulase culture filtrates under use conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 23:2009-26, 1981.
- MANDELS, M.; PARRISH, F.W.; REESE, E.T. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 83:400-8, 1962.
- MANDELS, M.; WEBER, I.; PARIZER, R. Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride*. *Applied Microbiology*, Baltimore, 21:152-4, 1971.
- MARTINS, M.R.J. *Sacarificação enzimática de Materiais Celulósicos II*. Lorena, 1983. 34p. (mimeografado).

- MELO, I.S. & HEALE, J.B. Isolamento e regeneração de protoplastos de *Trichoderma pseudokoningii*, um agente de biocontrole de fitopatógenos. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 12. Araras, 1989. *Resumos*. Araras, 1989. 34p.
- MENEZES, H.C.; MENEZES, T.J.B.; VILAS BOAS JR., H. Fungal cultures and culture mediuns for the production of cellulase. *Biotechnology and Bioengineering*. New York, 15:1123-9, 1973.
- MERIVUORI, H.; SIEGLER, K.M.; SANDS, J.A.; MONTENECOURT, B.S. Regulation of cellulase biosynthesis and secretion in fungi. In: COUGHLAN, M.P., ed. *Cellulase: production, properties and applications*. Galway, Society Host Colloquium, 1985. p.411-14.
- MESSIAS, C.L. Parassexualidade e produção de aflatoxina em *Aspergillus flavus*, Link. Piracicaba, 1977. 75p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- MILLER, J.J. & REID, J. Stimulation by light of sporulation in *Trichoderma lignorum* (TODE) HARZ. *Canadian Journal Botany*, Ottawa, 39:259-61, 1961.
- MONTENECOURT, B.S. *Trichoderma reesei* cellulases. *Trends in Biotechnology*, Amsterdam, 1(5):156-61, 1983.
- MONTENECOURT, B.S. & EVELEIGH, D.E. Semiquantitative plate assay for determination of cellulase production by *T. viride*. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 33:178-83, 1977a.

- MONTENECOURT, B.S. & EVELEIGH, D.E. Preparation of mutants of *T. reesei* with enhanced cellulase production. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 34:777-82, 1977b.
- MONTENECOURT, B.S.; NHLAPO, S.D.; TRIMINO-VASQUEZ, H.; CUSKEY, S.; SCHAMHART, D.H.J.; EVELEIGH, D.E. Regulatory controls in relation to over-production of fungal cellulases. In: HOLLAENDER, A., ed. *Trends in the Bioology of Fermentations for Fuel and Chemicals*. New York, Plenum, 1980. p.33-53.
- MONTENECOURT, B.S.; SCHAMHART, D.H.J.; EVELEIGH, D.E. Mechanisms controlling the synthesis of the *Trichoderma reesei* cellulase system. In: BERKELEY, R.C.W.; GOODAY, G.W.; ELLWOOD, D.C., ed. *Microbial Polysaccharides and Polysaccharases*. New York, Academic Press, 1979. p.327-37.
- MORIKAWA, Y.; KAWAMORI, M.; ADO, Y.; SHINSHA, Y.; ODA, F.; TAKASAWA, S. Improvement of cellulase production in *Trichoderma reesei*. *Agricultural Biological Chemistry*, Tokyo, 49:1869-71, 1985.
- MOSCOSO, I.L. Produção de enzimas extracelulares em haplóides, heterocários e diplóides de *Aspergillus nidulans*. Campinas, 1987. 93p. (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).

- MUKHOPADHYAY, S.N. & MALIK, R.K. Increased production of cellulase of *Trichoderma* sp. by pH cycling and temperature profiling. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 22:2237-50, 1980.
- MURAYAMA, T. & ISHIKAWA, T. Mutation in *Neurospora crassa* affecting some of the extracellular enzymes and several growth characteristics. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 115:796-804, 1973.
- MURKOVIC, M.; STEINER, W.; ESTERBAUER, H. Electrofusion of *T. reesei* protoplasts. *Letters in Applied Microbiology*. Oxford, 5:107-9, 1987.
- NECAS, O. & SVOBODA, A. Cell wall regeneration and protoplast reversion. In: PEBERDY, J.F. & FERENCZY, L. *Fungal protoplasts; applications in biochemistry and genetics*. New York, Marcel Dekker, 1985. v.6, p.115-33.
- NEVALAINEN, H. Genetic improvement of enzyme production in industrially important fungal strains. Helsinki, 1985. 243p. (Doutoramento - University of Helsinki).
- NEVALAINEN, K.M.H. & PALVA, E.T. Production of extracellular enzyme in mutants isolated from *T. viride* unable of hydrolize cellulose. *Applied and Enviromental Microbiology*, Baltimore, 35:11-16, 1978.
- NEVAILANEN, K.M.H. & PALVA, E.T.; BAILEY, M.J. A high cellulase-producing mutant strain of *T. reesei*. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, 2:59-60, 1980.

- OGAWA, K.; BROWN, J.A.; WOOD, T.M. Intraspecific hybridization of *Trichoderma reesei* QM9414 by protoplast fusion using colour mutants. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, 9:229-32, 1987.
- OGAWA, K.; OHARA, H.; KOIDE, T.; TOYAMA, N. Intraspecific hybridization of *Trichoderma reesei* by protoplast fusion. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Osaka, 67:207-9, 1989.
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Variabilidade e recombinação genética no Deuteromiceto *Beauveria bassiana* (Vuill.). Piracicaba, 1988. 193p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; VALARINI, M.J.; AZEVEDO, J.L.; ALFENAS, A.C. *Manual de Técnicas Eletroforéticas em Microrganismos*. Piracicaba, FEALQ, 1988. 54p.
- PAPA, K.E. The parasexual cycle in *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia*, Lancaster, 70:766-73, 1978.
- PEITERSEN, N.; MEDEIROS, J.; MANDELS, M. Adsorption of *Trichoderma* cellulase on cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 19:1091-4, 1977.

- PENTILA, M.; NEVALAINEN, H.; RATTO, M.; SALMINEN, E.; KNOWLES, J. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *T. reesei*. *Gene*, Amsterdam, 61:155-64, 1987.
- PEREIRA, J.O. Ocorrência do ciclo parassexual em uma espécie do gênero *Aspergillus*. Piracicaba, 1978. 108p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- PICATAGGIO, S.K.; SCHAMHART, D.H.J.; MONTENECOURT, B.S.; EVELEIGH, D.E. Sphaeroplast formation and regeneration in *Trichoderma reesei*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 17:121-8, 1983.
- PIZZIRANI, A.A. Características, propriedades e estabilização de dissômicos em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, 1977. 111p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; McDONALD, K.F.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, New York, 5:141-8, 1953.
- PONTECORVO, G. & SERMONTI, G. Parasexual recombination in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of General Microbiology*, London, 11:94-104, 1954.
- PURI, V.P. Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 26:1219-22, 1984.

- RAUTELA, G.S. & COWLING, E.B. Simple cultural test for relative cellulolytic activity of fungi. *Applied Microbiology*, Baltimore, 14:892-8, 1966.
- RIFAI, M.A. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, (116):1-56, jan. 1969.
- ROBINOW, C.F. & CATEN, C.E. Mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Science*. London, 5:403-31, 1969.
- RODRIGUES, E.C. Caracterização citogenética e bioquímica do fungo celulolítico *Humicola* sp. Piracicaba, 1987. 152p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- RYU, D.D.Y.; KIM, C.; MANDELS, M. Competitive adsorption of cellulase components and its significance in a synergistic mechanism. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 24:488-96, 1984.
- RYU, D.D.Y, & MANDELS, M. Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology*. Guildford, 2:91-102, 1980.
- SASAKI, T. Enzymatic conversion of cellulosic carbohydrates. (mimeografado).

- SCHIMENTI, J.; GARRETT, T.; MONTENECOURT, B.S.; EVELEIGH, D.E. Selection of hypercellulolytic mutants of *Trichoderma reesei* based on resistance to nystatin. *Mycologia*, Lancaster, 75:876-80, 1983.
- SHOEMAKER, S.P.; RAYMOND, J.C.; BRUNER, R. Cellulases: diversity amongst improved *Trichoderma* strains. In: HOLLAENDER, A., ed. *Trends in the Biology of fermentations for fuels and chemicals*, New York, Plenum, 1981. p.89-109.
- SIDDIQI, O.H. Mutagenic action of nitrous acid on *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, London, 3:303-14, 1962.
- SILVA, J.C. & AZEVEDO, J.L. Utilization of gamma rays in the selection of *Aspergillus niger* for acid production. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 1:41-9, 1978.
- SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. Isolation of auxotrophic mutants of *Metarhizium anisopliae* by the filtration enrichment technique. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 7:1-8, 1984.

STASZ, T.E.; HARMAN, G.E.; NIXON, K.C.; WEEDEN, N.F.;

KUTER, G.A. Allozyme analysis of the genus *Trichoderma*.

In: INTERNATIONAL TRICHODERMA/GLIOCLADIUM WORKSHOP, 2.,

Salford, 1988. *Resumo*. Salford, University of Salford, 1988. p.7.

STERNBERG, D. A method for increasing cellulase' production

by *Trichoderma viride*. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 23:1751-60, 1976.

STERNBERG, D. & MANDELS, G.R. Induction of cellulolytic

enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 139:761-9, 1980.

TANAKA, Y.; MURATA, N.; KATO, K. Behavior of nuclei and

chromosomes during ascus development in the mating between either rice-strain or weeping lavedgrass-strain and ragi-strain of *Pyricularia*. *Annual Phytopathology Society Japan*, Tokyo, 45:182-91, 1979.

TANSEY, M.R. Agar-diffusion assay of cellulolytic ability

of thermophilic fungi. *Archiv. of Mikrobiologie*, Berlin, 77 1-11, 1971.

TOYAMA, H.; YAMAGUCHI, K.; SHINMYO, A.; OKADA, H. Protoplast

fusion of *Trichoderma reesei*, using immature conidia. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 47:363-8, 1984.

VALADARES, M.C.C. Genética e produção de exoenzimas em linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsh.) Sorokin. Piracicaba, 1989. 160p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

• WEINMAN-GREENSHPAN, D. & GALUN, E. Morphogenesis in *Trichoderma*: autonomous and nonautonomous pigmentation in heterokaryons of color mutants in *Trichoderma viride*. *American Journal of Botany*, New York, 58:287-91, 1971.

ZALDIVAR, M.; STEINER, J.; MUSALEM, M.; CONTRERAS, I. Aislamiento de un mutante de *Trichoderma pseudokoningii* hiperprodutor de celulasas. *Microbiologia*, Santiago, 3:33-44, 1987.