



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E PRODUÇÃO DE ENZIMAS
CELULOLÍTICAS POR *Trichoderma* spp.**

LARYSSA DA SILVA MELO

**MANAUS
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

LARYSSA DA SILVA MELO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E PRODUÇÃO DE ENZIMAS
CELULOLÍTICAS POR *Trichoderma* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Agroflorestal.

**Orientador: Dr. Rogério Eiji Hanada
Co-orientadores: Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza
Dr. José Odair Pereira**

**MANAUS
2009**

LARYSSA DA SILVA MELO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E PRODUÇÃO DE ENZIMAS
CELULOLÍTICAS POR *Trichoderma* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Agroflorestal.

Apresentada em 14 de outubro de 2009

BANCA EXAMINADORA

Dr. Rogério Eiji Hanada, Presidente
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Dra. Ágata Cristiane Huppert Giancoli, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto, Membro
Universidade Federal do Amazonas

**MANAUS
2009**

*“Tudo é do Pai,
toda honra e toda a glória...
É Dele a vitória alcançada em minha vida.”
(F. Cruz)*

AGRADECIMENTOS

A Deus, supremo criador, que me deu força, paciência e iluminou os meus caminhos durante mais esta jornada.

Aos meus pais Francisca e Orlando que sempre me apoiaram e nunca mediram esforços para que eu alcançasse meus objetivos.

Ao meu irmão Leonardo, minha irmã Lizane e minha prima Ana Karoline, pelos longos bate-papos científicos, por sempre me colocarem à prova com milhões de perguntas e por estarem ao meu lado sempre. E a minha tia Maria Luzia pela preocupação com meu bem-estar e por colaborar sempre com nossa família.

Ao querido professor Dr. José Odair Pereira, pela confiança depositada em mim, pela paciência, pelos ensinamentos e por me incentivar sempre.

Meu enorme agradecimento a Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza, a quem o professor Odair me confiou, que com grande sabedoria, paciência e carinho, me ensinou, orientou, deu bronca quando necessário e sempre esteve ao meu lado durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Rogério Eiji Hanada pelo incentivo, paciência, colaboração, revisão dos textos e por ceder algumas linhagens para este estudo.

Ao Dr. Afonso Duarte Leão de Souza, coordenador do GEMA (Grupo de Estudos de Microrganismos Amazônicos), pela amizade, apoio e pelo empréstimo dos equipamentos, vidrarias e outros materiais necessários e importantes para a concretização deste trabalho.

A Dra. Leonor Alves de Oliveira da Silva pela amizade, dedicação e especialmente por ter me “aturado” pacientemente durante os últimos meses respondendo às minhas dúvidas, ensinando e executando protocolos junto comigo e por me guiar no caminho das enzimas.

A Dra. Rozana de Medeiros Sousa Galvão pelo apoio, por ter me auxiliado sempre que precisei, pelo carinho e grande amizade.

As minhas queridas amigas Eliana Bianco e Priscila Aquino, companheiras de almoço e de bancada, pelo incentivo, risadas, vidrarias compartilhadas e principalmente pelo grande carinho e amizade em todas as horas. Eu não poderia ter amigas mais compreensivas!

Aos colegas do GEMA: Adriana Silva, Carol Lima, Cássia Cunha, Edson Marcon, Fabiana Almeida, Héctor Koolen, Mayane Pereira, Rafael Saulo Barbosa e Roberto Bianco pelo apoio constante, por compartilharem e por muitas vezes lavarem as vidrarias que deixei sujas, pela amizade, carinho e comemorações regadas à muitas guloseimas. E àqueles que já fizeram parte deste grupo e também contribuíram para a realização deste trabalho: Alessandra Doren, Auricélia Matos, Ismael Alexandre Ribeiro, Jésika Maria Aroucha e Maria do Socorro T. da Costa. Aprendi muito com todos vocês!

Aos colegas do Laboratório de Produtos Bioativos de Origem Microbiana e Laboratório de Genética de Microrganismos com os quais dividi bancada, troquei experiências e adquiri novos conhecimentos: Raquel, Liene e Vanessa (as meninas do AFLP!), Celina Silva, Francisca Holanda, Dra. Ágata Cristiane, Joyse Lima, Jacqueline Araújo, Aline Rondon, Luciana Cassa, Dr. Pedro Queiroz, Samára Ferreira, Geíza Souza, Gabriela Zanete, Adriana Dantas, Ginarajadaça e o técnico José Rufino. Obrigada, de coração!

As meninas do Laboratório de Fermentação: Flávia Paiva e Lanna Lôbo, por me auxiliarem no preparo de reagentes para os ensaios enzimáticos, pelo apoio, amizade e alegre convivência.

Aos meus colegas de turma, em especial Cecília Carvalho, Isabelle Cordeiro, Marcos Pessoa e Thiago Oliveira pelos bons momentos vividos e pela amizade.

A Dina e ao Johnson, do Laboratório de Tecnologia do DNA, pela ajuda com o sequenciamento das amostras.

As minhas amigas Amanda Shirléia Boeira, Maria Aparecida Carvalho e Eguimara Torres pelo incentivo, carinho, amizade e pela enorme ajuda e compreensão, sem as quais meu ingresso neste programa não seria tão imediato.

As secretárias do PPGBiotec Ângela Neiva (2007), Elzimar Braga, Joelma Reis e Nubiane Freitas por todo carinho e atenção com que sempre me atenderam.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que infelizmente não recordo do nome, o meu muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Aspecto macromorfológico das colônias de <i>Trichoderma</i> spp. cultivados em meio BDA a 26°C, após oito dias de crescimento.	7
Figura 02: Esquema do cluster gênico que codifica o DNA ribossômico.	8
Figura 03: Algumas reações de hidrólises catalisadas pelas hidrolases.....	11
Figura 04: Sistema celulolítico C ₁ -C _x proposto por Elwyn Reese.....	14
Figura 05: Modelo esquemático do processo de cultura monospórica que consiste em diluição sucessiva seguida de plaqueamento.	21
Figura 6: Métodos utilizados na preservação dos isolados estudados. (a) Glicerol 10% (solução de esporos); (b) Castellani e (c) Cultura submersa em óleo mineral.....	27
Figura 7: Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, da amplificação da região ITS do rDNA de 27 isolados de <i>Trichoderma</i> spp., utilizados na produção de enzimas celulolíticas.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Habitat dos isolados de <i>Trichoderma</i> utilizados neste estudo.....	16
Tabela 2: Componentes da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), suas concentrações e quantidades.....	23
Tabela 3: Identificação molecular dos isolados de <i>Trichoderma</i> por meio dos fragmentos ITS-1, 5,8S e ITS-2 do rDNA.	30
Tabela 4: Concentração de proteínas totais determinada através do método de Bradford em sobrenadante de <i>Trichoderma</i> spp.	33
Tabela 5: Valores da dosagem da atividade de CMCase (U/mL) e sua atividade específica (U/mg de proteína) encontrados nos isolados de <i>Trichoderma</i>	35
Tabela 6: Valores da dosagem da atividade de β -glucosidase (IU/mL) e sua atividade específica (U/mg de proteína) encontrados nos isolados de <i>Trichoderma</i> ..	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADNS Ácido Dinitrosalicílico

AM Amazonas

bp Pares de base

BDA Batata Dextrose Ágar (Meio de cultura)

BDL Batata Dextrose Levedura (Meio de cultura líquido)

BSA Bovine Serum Albumin (albumina de soro bovino)

CMC Carboximetilcelulose

CMCase Carboximetilcelulase

DNA Desoxirribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)

dNTP Deoxyribonucleotide triphosphate (desoxirribonucleotídeos Fosfatados)

EDTA Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilendiaminotetracético)

H₂O Água

ITS Internal Transcriber Space

IU International Unit (Unidade Internacional)

Kb Kilo base

kDa Kilodalton

Km Kilômetro

M Marcador

µg Micrograma

mg Miligrama

mM Milimolar

nm Nanômetro

°C Graus Celsius

PCR Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)

pmoles Picomoles

pNPG p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo)

rDNA Ribossomal Desoxirribonucleic Acid (ácido desoxirribonucléico ribossomal)

RNA Ribonucleic acid (ácido ribonucléico)

rpm Rotações por minuto

SP São Paulo

Taq DNA pol *Thermus aquaticus* DNA Polymerase

μ L Microlitro

RESUMO

Trichoderma são fungos anamórficos pertencentes à classe dos hifomicetos, também chamados fungos imperfeitos, assexuais ou conidiais e que têm como teleomorfo o gênero *Hypocrea*. São fungos de vida livre, distribuídos em todo o mundo e encontrados em solos de diversas temperaturas, especialmente naqueles que contêm matéria orgânica. Geralmente não são considerados importantes patógenos humanos, mas existem alguns relatos indicando patogenicidade ocasional em algumas espécies. Sua fácil manipulação e cultivo in vitro, estabilidade e viabilidade das colônias preservadas, fazem desse gênero um grande alvo para as pesquisas biotecnológicas. Por tais características, foram isolados *Trichoderma* das plantas *Victoria amazonica*, *Rollinia* sp., *Murraya paniculata* e *Strychnos cogens*; da madeira *Scleronema micranthum*, conhecida como cardeiro; de jatobá (*Hymenaea courbaril*), do solo de cultura de cubiu (*Solanum sessiliflorum*) e de terra preta de índio, com o objetivo de identificar, pela biologia molecular, em nível de espécie, tais isolados, bem como avaliar sua capacidade de produção de enzimas celulolíticas. Das 30 linhagens obtidas foram realizadas culturas monospóricas, as quais foram preservadas em óleo mineral, método Castellani e em glicerol 10%. A partir da suspensão em glicerol, de cada amostra foi inoculado 10 μ L em 20mL de BD e cultivado a 26°C, a 100 rpm por 40:00h. Em seguida foi extraído o DNA genômico, deste realizada a PCR específica para as regiões ITS-1 e ITS-2 do DNA ribossômico e posteriormente o sequenciamento. Para a produção de enzimas, os isolados foram previamente cultivados em meio indutor. Foram inoculados 10 μ L da solução de esporos (Glicerol 10%) em 50mL de solução de Manachini onde o substrato indutor utilizado foi a carboximetilcelulose. Os fungos foram incubados a 27°C, 120 rpm durante 120 horas. A dosagem de CMCase foi efetuada com base no método do Ácido Dinitrosalicílico. Para a dosagem de β -glucosidase foi utilizado o p-nitrofenil- β -D-Glucopiranosídeo (pNPG) como substrato para a enzima. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford, utilizando-se o reagente concentrado comercial da Bio-RadTM e albumina de soro bovino (ASB), como padrão. O resultado da identificação molecular das primeiras 13 amostras nos revelaram as espécies: *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. asperellum*, *T. viride*, *T. ovaslisporum*, *T. hamatum*, *T. piluliferum* e *T. koningiopsis*, com um percentual entre 96 e 99% de identidade e 100% de confiabilidade. Os resultados enzimáticos para CMCase indicaram valores baixos, inferiores a 0,100 U/mL com exceção de *T. koningii* (MPCe 10 3.2), *T. harzianum* (MPCe 2 2.2a), ambos isolados de *M. paniculata*, e o isolado 1437 identificado como *Trichoderma* sp., proveniente de terra preta de índio, que apresentaram valores um pouco mais altos de 0,112 e 0,103 e 0,105 U/mL, respectivamente. Para β -glucosidase, os resultados apresentados mostraram alta atividade na grande maioria dos isolados com destaque para *T. harzianum* MPCI 3 3.1(10,45U/mL) e *T. piluliferum* Vrc 2 3.2 (9,71 U/mL). Todos os isolados produziram proteínas em meio de cultura contendo carboximetilcelulose como substrato indutor.

ABSTRACT

Trichoderma are anamorphic fungi belonging to the class of Hifomicetos, also called imperfect fungi, or asexual conidial and whose gender *Hypocrea* teleomorph. They are free-living fungi, distributed throughout the world and found in different soil temperatures, especially those containing organic matter. Usually are not considered important human pathogens, but there are some reports indicating occasional pathogenicity of some species. Its easy handling and in vitro, stability and viability of colonies preserved this kind are a big target for biotechnology research. Because of these characteristics were isolated *Trichoderma* from plant *Victoria amazonica*, *Rollinia* sp. *Murraya paniculata* and *Strychnos cogens*; wood *Scleronema micranthum*, known as cardeiro; jatoba (*Hymenaea courbaril*), land of cubiu culture (*Solanum sessiliflorum*) and Indian black earth, in order to identify the molecular biology, the species level, such isolates and to assess their ability to produce cellulolytic enzymes. Of the 30 lines obtained were cultured spore, which were preserved in mineral oil, Castellani and method in 10% glycerol. From the suspension in glycerol, each sample was inoculated in 20ml of 10 μ L BD and cultivated 26oC, 100 rpm for 40:00 h. Next was extracted genomic DNA, performed PCR of specific regions of the ITS-1 and ITS-2 ribosomal DNA sequencing and subsequently. For the production of enzymes, the isolates were first grown in induction medium. Were inoculated 10 μ L of spore solution (glycerol 10%) in 50 mL of solution Manachini where the substratum was used to carboxymethylcellulose. The fungi were incubated at 27 ° C, 120 rpm for 120 hours. The dosage of CMCCase was performed using the method of acid Dinitrosalicílico. For the determination of β -glucosidase was used p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNPG) as substrate for the enzyme. The total protein concentration was determined by the Bradford method, using the reagent concentrate commercial Bio-RadTM and bovine serum albumin (ASB) as standard. The result of molecular identification of the first 13 samples revealed the species: *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. asperellum*, *T. viride*, *T. ovaslisporum*, *T. hamatum*, *T. piluliferum* and *T. koningiopsis*, with a percentage between 96 and 99% identity and 100% reliability. The results indicated CMCCase enzyme to low values, less than 0.100 U / mL with the exception of *T. koningii* (MPCE 10 3.2), *T. harzianum* (MPCE 2 2.2a), both isolates of *M. paniculata*, and isolate 1437 identified as *Trichoderma* sp., from Indian black earth, which showed slightly higher levels of 0.112 and 0.103 and 0.105 U / mL, respectively. For β -glucosidase, the results showed high activity in the vast majority of isolates with emphasis on *T. harzianum* MPCE 3 3.1 (10.45 U / mL) and *T. piluliferum* Vrc 2 3.2 (9.71 U / mL). All isolates produced protein in culture medium containing carboxymethylcellulose as substrate inducer.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 Geral.....	4
2.2 Específicos.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 O gênero <i>Trichoderma</i>	5
3.2 Técnicas moleculares na identificação de <i>Trichoderma</i>	8
3.3 Enzimas hidrolíticas.....	10
3.3.1 Celulases.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Obtenção dos isolados.....	16
4.2 Meios de cultura e soluções.....	16
4.2.1 Meio BDA.....	16
4.2.2 Meio BD.....	16
4.2.3 Solução de Manachini.....	17
4.2.4 CTAB 2%.....	17
4.2.5 Clorofil.....	17
4.2.6 Tampão de corrida TBE 10X.....	18
4.2.7 Tampão Tris-EDTA.....	18
4.2.8 Gel de agarose 0,8% e 1,5%.....	18
4.2.9 Tampão da amostra.....	18
4.2.10 Solução de Tween 80 0,1%.....	18
4.2.11 Solução de ADNS.....	19
4.2.12 Solução de Carboximetilcelulose 2%.....	19
4.2.13 Tampão citrato 1M.....	19
4.2.14 Tampão acetato de sódio 50 mM.....	19
4.2.15 Solução de Bicarbonato de Sódio 10%.....	20
4.2.16 Solução de pNPG.....	20
4.3 Esterilização e incubação.....	20
4.4 Cultura Monospórica.....	20
4.5 Conservação dos isolados.....	21
4.6 Extração de DNA.....	22
4.7 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR).....	23
4.8 Reação de sequenciamento e análise das sequências obtidas.....	23
4.9 Condições de cultivo para a produção de enzimas.....	24
4.10 Determinação de proteínas totais.....	24
4.11 Determinação da atividade de celulase.....	25
4.11.1 Atividade de CMCase.....	25
4.11.2 Atividade de β -glucosidase.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 Purificação e conservação dos isolados.....	27
5.2 Extração, amplificação e purificação do DNA para o sequenciamento.....	29
5.3 Análise das sequências obtidas.....	29
5.4 Determinação de proteínas totais.....	32
5.5 Determinação da atividade de CMCase.....	34
5.6 Determinação da atividade de β -glucosidase.....	36
6. CONCLUSÃO.....	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

Para os microrganismos, especialmente para os fungos, as características morfológicas muitas vezes não são suficientes para se determinar com precisão a espécie do indivíduo, ficando a sua classificação apenas ao nível de gênero. Mas com o avanço da tecnologia do DNA, regiões taxonômicas foram identificadas e, aliadas a outras tecnologias como o perfil químico dos metabólitos secundários fixos e voláteis e dos ácidos graxos da parede celular, é possível classificar com maior precisão os microrganismos.

O gênero *Trichoderma*, conhecido mundialmente por seu potencial biotecnológico, está incluído no grupo de microrganismos de difícil classificação e que geralmente é feita com base nas características morfológicas do gênero. Até o ano de 1969 os isolados do gênero *Trichoderma* eram conhecidos como *T. viride* Peerson, quando Rifai (1969) revendo a taxonomia do grupo, utilizou o conceito de espécies agregadas e classificou *Trichoderma* em nove espécies tendo como base o crescimento da colônia e a morfologia dos conidióforos.

Nos últimos anos, novas metodologias vêm sendo empregadas na identificação deste gênero tais como o seqüenciamento da região ITS do rDNA, decodificação de fatores que atuam na síntese de proteínas e caracterização eletroforética de quitinases (SCHICKLER et al., 1998; YU et al., 2007).

Apesar da dificuldade acerca de sua classificação, o gênero *Trichoderma* tem se mostrado um agente promissor nas pesquisas relacionadas à biotecnologia devido a sua fácil manipulação e cultivo *in vitro*, estabilidade e viabilidade das colônias preservadas e por ser encontrado facilmente em todo o mundo. Não são considerados patógenos

humanos, mas há alguns casos na literatura indicando uma eventual patogenicidade de algumas espécies do gênero (DE MIGUEL et al., 2005; RANQUE et al., 2008).

Espécies de *Trichoderma* são reconhecidas como agentes de controle de doenças de plantas em muitos sistemas agrícolas, promovendo seu crescimento, produtividade e proteção contra fitopatógenos realizada através de antibiose ou micoparasitismo sendo que, neste último caso, *Trichoderma* ataca o fungo alvo, enrolando-se em sua superfície e produzindo uma série de enzimas tóxicas que degradam a parede celular do patógeno (HARMAN et al., 2004).

Trichoderma harzianum Rifai é a espécie mais utilizada em controle biológico, embora outras espécies como *T. martiale* Samuels, *T. stromaticum* Samuels e Pardo-Schulthesis, *T. virens* (Miller, Giddens e Foster) Arx também estejam sendo estudadas com este propósito e já apresentaram atividade antagônica contra *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler e *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime e Phillips-Mora (Papavizas, 1985; De Marco et al., 2003; Loguercio et al., 2009; Hanada et al., 2009).

As espécies do gênero *Trichoderma* também têm sido estudadas por produzirem uma série de enzimas extracelulares, especialmente aquelas que degradam a celulose e a quitina, dois dos mais abundantes produtos renováveis da biosfera e, se tratando da celulose, uma fonte alternativa na produção de biocombustível.

A biotecnologia da celulase e hemicelulase teve seu início na década de 80, sendo utilizada na ração animal e, posteriormente, na indústria têxtil, lavanderia e indústrias de celulose e papel. Nos últimos anos, um aumento considerável na utilização dessas enzimas vem sendo notado e, hoje, elas são responsáveis por cerca de 20% do mercado mundial de enzimas, principalmente a partir dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* (Bhat, 2000). *Trichoderma* também é conhecido por ser ativo na produção

de metabólitos com atividade antimicrobiana que podem chegar a mais de 100, segundo Harman et al. (2004).

É possível notar um crescente número de pesquisas relacionadas ao gênero *Trichoderma* no contexto mundial, mas a nível nacional e principalmente regional os avanços ainda são poucos. É necessário intensificar as pesquisas relacionadas ao gênero, uma vez que este é um microrganismo muito comum e os produtos derivados do seu cultivo despertam o interesse da biotecnologia.

Grande parte dos estudos atuais está voltada para produção de enzimas e proteínas extracelulares e principalmente ao controle biológico de fitopatógenos uma vez que, em nosso país, ainda predomina o uso de agrotóxicos nas plantações. Pesquisas recentes têm utilizado *Trichoderma* no controle de doenças fitopatogênicas como a vassoura de bruxa, que atinge o cacauzeiro (*Theobroma cacao*) e o cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) e a podridão parda do fruto do cacauzeiro, culturas importantes da região Amazônica (De Marco et al., 2003; Hanada et al., 2009). Em vista disso, melhores conhecimentos a cerca de sua taxonomia, bioquímica e fisiologia se fazem necessários para um melhor aproveitamento do potencial biotecnológico deste gênero nas inúmeras áreas de interesse.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Identificar em nível de espécie, pela biologia molecular, os isolados de *Trichoderma* obtidos de amostras de solo, de madeira e endofíticos, bem como avaliar sua capacidade de produção de enzimas celulolíticas.

2.2 Específicos

Purificar, preservar e identificar as linhagens do gênero *Trichoderma*.

Formar uma coleção de linhagens de *Trichoderma* para o desenvolvimento dos estudos propostos.

Analisar as regiões ITS-1 e ITS-2 do rDNA na identificação dos isolados, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4.

Avaliar a produção de enzimas celulolíticas por meio de testes quantitativos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O gênero *Trichoderma*

Introduzido na literatura micológica pela primeira vez por Peerson, (1794, citado por Rifai, 1969) *Trichoderma* são fungos anamórficos pertencentes à classe dos hifomicetos, também chamados fungos imperfeitos, assexuais ou conidiais e que têm como teleomorfo o gênero *Hypocrea* (Alexopoulos et al., 1996; Guarro et al., 1999).

São fungos de vida livre, distribuídos em todo o mundo e encontrados em solos de diversas temperaturas, especialmente naqueles que contém matéria orgânica (Papavizas, 1985). Em solos tropicais e temperados, pode-se encontrar de 10^{-1} a 10^{-3} propágulos cultiváveis por grama (Harman et al., 2004). *Trichoderma* também pode ser encontrado na madeira em decomposição, sobre cascas caídas, na superfície das raízes de inúmeras plantas e como endofíticos, porém com menor frequência (Papavizas, 1985).

Embora sejam encontradas em todos os lugares, algumas espécies de *Trichoderma* tem ampla distribuição, enquanto outras são geograficamente limitadas, preferindo ambientes mais frios ou de clima tropical como *T. stromaticum*, encontrado somente na América tropical em associação com o cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) e sendo efetivo no combate ao fungo *M. pernicioso* (anteriormente conhecido como *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer), agente causal da vassoura de bruxa (Samuels, 2006; Loguercio et al., 2009). Samuels (2006) concluiu que algumas espécies de *Trichoderma*, dentre elas *T. harzianum* Rifai e *T. asperellum* Samuels, Liechfeldt e Nirenberg são realmente cosmopolitas.

Geralmente não são considerados importantes patógenos humanos, mas existem alguns relatos espalhados indicando uma patogenicidade ocasional em alguns deles. *T. artroviride* P. Karsten, *T. viride* e *T. longibrachiatum* Rifai, foram relatados nos últimos

anos como ocorrentes em humanos causando infecções em pacientes que já apresentavam um comprometimento do sistema imunológico causado por doenças graves ou transplantes mal sucedidos (Furukawa et al., 1998; De Miguel et al., 2005; Ranque et al. 2008) .

Algumas de suas espécies têm sido usadas no controle biológico, sendo a principal delas *T. harzianum*. Diferentes mecanismos têm sido sugeridos como responsáveis por sua capacidade biocontroladora, os quais incluem competição por espaço e nutrientes, secreção de enzimas quitinolíticas, micoparasitismo e produção de componentes inibitórios (Shalini e Kotasthane, 2007).

Vários estudos demonstraram a utilização de *T. harzianum* para controlar diversos patógenos, com destaque para *S. rolfsii*, *R. solani*, *Fusarium oxysporum* Schlecht e *Pythium spp.* (Papavizas, 1985; Datnoff et al., 1995; Mafia et al., 2002; Shalini e Kotasthane, 2007). Outras espécies (*T. koningii* Oudem; *T. viride*; *T. hamatum* (Bon.) Bain; *T. virens* e *T. pseudokoningii* Rifai) também vem sendo isoladas e analisadas com esse propósito (Papavizas, 1985).

Em estudos recentes, Loguercio et al. (2009) e Hanada et al. (2009) avaliaram o potencial de espécies de *Trichoderma* frente aos fitopatógenos que causam a vassoura de bruxa e a podridão parda do fruto do cacaueteiro, *M. pernicioso* e *P. palmivora*, respectivamente. As espécies estudadas foram *T. stromaticum* e *T. martiale*, ambas apresentaram atividade contra os fitopatógenos de interesse, tornando-os uma alternativa de controle dessas enfermidades, além de ser ambientalmente correto. *Trichoderma spp.* também são eficientes na produção de antibióticos, metabólitos secundários e enzimas de interesse biotecnológico (Blumenthal, 2004; Juhász et al., 2004; Silva, 2006; Kóvacs et al., 2009 a, b).

Espécies do gênero *Trichoderma* apresentam um crescimento rápido em meio de cultura. Suas colônias podem ser dispersas e em flocos ou compactadas com tufo; os conídios e conidióforos possuem forma e tamanho variados; seus clamidósporos são intercalares ou terminais. A pigmentação dos conídios determina a coloração das colônias que podem ser verdes, amarelas, verde-amareladas ou incolores (Figura 01). Não possuem conidióforos definidos e os conídios formam-se nas extremidades das fiálides em hifas diferenciadas. Os conídios geralmente se agrupam formando agregados de hifas que contém as fiálides. Algumas espécies de *Trichoderma* dependem da luz para esporulação (Howell, 2003).

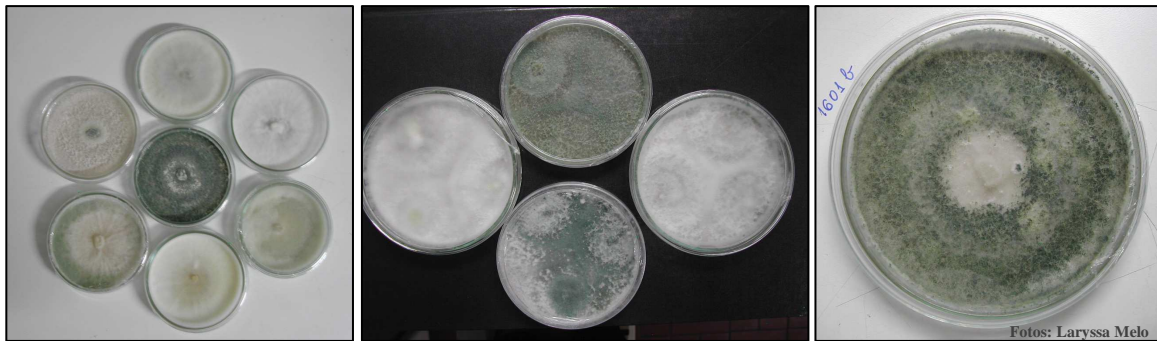


Figura 01: Aspecto macromorfológico das colônias de *Trichoderma* spp. cultivados em meio BDA a 26°C, após oito dias de crescimento.

A taxonomia e a identificação de *Trichoderma* spp. são bastante complexas e geralmente baseadas em caracteres morfológicos. Até 1969, todas as espécies estudadas eram descritas como *T. viride*. A partir de então, Rifai (1969) fazendo a revisão do gênero, descreveu nove espécies (*T. piluliferum*, *T. hamatum*, *T. polysporum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. viride*, *T. aureoviride* Rifai, *T. pseudokoningii* e *T. harzianum*) diferenciando-as pelo tipo de conídio e ramificação dos conidióforos e concluiu que algumas delas (por exemplo, *T. hamatum*) pareciam conter duas ou mais espécies morfológicamente indistinguíveis. Bisset (1991 a, b) revendo a classificação de

Rifai (1969), elevou as espécies a nível de seção e incluiu alguns anamorfos de *Hypocrea* ao gênero.

3.2 Técnicas moleculares na identificação de *Trichoderma*

Por causa da dificuldade e complexidade da classificação taxonômica de *Trichoderma*, estudos moleculares e filogenéticos relacionados ao DNA ribossômico têm se tornado cada vez mais comuns e são ferramentas de grande importância para a compreensão deste gênero.

O DNA que codifica o RNA ribossômico apresenta-se como um cluster gênico, no qual se tem os genes 18S, 5,8S e 28S (Figura 02). Estes genes são separados por regiões denominadas ITS1 e ITS2 (Internal Transcriber Space), as quais são transcritas e processadas para originarem o RNA ribossômico maduro. O fato desse cluster gênico apresentar algumas regiões altamente conservadas e outras variáveis, tem permitido a análise de variação de diferentes níveis taxonômicos. Como exemplo temos a região 18S que é a mais conservada e por isso é utilizada apenas para comparação de organismos distantemente relacionados. Já a porção 28S é mais variável e, portanto, mais apropriada para a comparação de diferentes gêneros ou, em alguns casos, de diferentes espécies (Fungaro, 2000).



Figura 02: Esquema do cluster gênico que codifica o DNA ribossômico.

As regiões ITS evoluem rapidamente e, por isso, são apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. O

fato das regiões ITS serem flanqueadas por segmentos conservados, serem relativamente curtas (500 a 800pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma permite que sejam amplificadas e seqüenciadas com facilidade (Fungaro, 2000).

Muitas pesquisas têm utilizado o rDNA na identificação de espécies fúngicas, especialmente entre o gênero *Trichoderma*. Yu et al. (2007) identificaram duas novas espécies de *Trichoderma* isoladas da rizosfera do tabaco (*Nicotiana tabacum*), na província de Yunnan, China: *T. compactum* Z. F. Yu e K. Q. Zhang e *T. yunnanense* Z. F. Yu e K. Q. Zhang. A identificação foi realizada baseada em caracteres morfológicos e análises filogenéticas de seqüências nucleotídicas do rDNA, seqüência parcial do fator de alongação da tradução 1-alfa (*tef1*) e um fragmento do gene que codifica a endoquitinase 42 (*ech42*). As análises mostraram que *T. compactum* pertence ao clado Harzianum e *T. yunnanense* pertence ao clado Hamatum.

Análises moleculares e filogenéticas também foram realizadas por Ospina-Giraldo et al. (1999) e Singh et al. (2006) através do seqüenciamento do gene 5,8S que codifica o rRNA, regiões ITS-1 e ITS-2 para identificação de espécies de *Trichoderma* associadas à doença do mofo verde que afeta cogumelos comestíveis.

Lieckfeldt et al. (2001) ao reverem a posição filogenética e caracterização de *T. aureoviride* com base em análises de RFLP do gene 28S rRNA, seqüenciamento das regiões espaçadoras ITS-1 e ITS-2 do rDNA e análises de RAPD de isolados identificados como *H. aureoviridis* Plowr e Cooke ou *T. aureoviride* e *H. vinosa* Cooke, observaram que as características moleculares e morfológicas distinguiram as espécies *H. aureoviridis* e *T. aureoviride* e mostraram que tais espécies não estão intimamente relacionadas.

Utilizando-se também de técnicas moleculares, principalmente o seqüenciamento das regiões ITS-1 e ITS-2 do rDNA, Kullnig et al. (2000) identificaram 39 isolados de *Trichoderma* distribuídos entre as espécies *T. artroviride*, *T. virens*, *T. hamatum*, *T. asperellum*, *T. koningii* e *T. oblongisporum* Bisset. Tais espécies foram isoladas na Rússia (Moscou e áreas rurais), Sibéria e montanhas do Himalaia, áreas que, segundo os autores, não existem muitas espécies de *Trichoderma* disponíveis.

Uma combinação de características fenotípicas e análises das seqüências ITS-1 e ITS-2, gene *tefl* (fator de alongação da tradução) e gene *rpb2* levaram Zhang et al. (2005) a identificar uma nova espécie de *Trichoderma*. A nova espécie foi isolada como endofítica de *Taxus mairei* Lemée e H. Lev, planta que cresce na Reserva Natural Guanshan, Província de Jiangxi, China. *Trichoderma taxi* C. L. Zhang, F. C. Lin e C. P. Kubicek, assim nomeada, é morfológicamente distinta por apresentar pequenos conídios brancos, subglobosos e seus conidióforos são agregados em pústulas compactas. Filogeneticamente, *T. taxi* forma um ramo independente em proximidade com os clados *Lutea* e *Pachybasioides*.

Com o avanço das pesquisas na biologia molecular, ficou evidente que a análise do DNA ribossômico aliada a outras técnicas, tem sido bastante utilizada em estudos micológicos e filogenéticos, apresentando ótimos resultados e esclarecendo diferentes questões, antes restringidas pela utilização da morfologia e análises bioquímicas nas relações intra e interespecíficas.

3.3 Enzimas hidrolíticas

Enzimas hidrolíticas constituem uma grande classe de enzimas responsáveis pela catálise de reações de hidrólise de inúmeros substratos como proteínas, ácidos

nucléicos, polissacarídeos, lipídeos, além de biomoléculas menores como aminoácidos, ésteres e fosfatos orgânicos. Sua produção é vital para as células, pois estão altamente ligadas ao catabolismo celular e por isso são encontradas em todos os organismos vivos (Ângelo, 2004).

Os fungos podem produzir uma grande variedade de enzimas hidrolíticas. Algumas estão presentes em todas as espécies (proteases e endonucleases), pois são essenciais para seu crescimento; outras são excretadas por determinadas espécies quando em condições ambientais favoráveis (Ângelo, 2004).

As hidrolases catalisam a clivagem hidrolítica de ligações $-C-O$, $-C-N$, $-C-C$ além de outros tipos de ligação, incluindo as ligações de anidro fosfórico (Figura 03). Em função de suas características, as hidrolases possuem um grande potencial biotecnológico, constituindo o grupo de enzimas mais explorado comercialmente (Demain, 2000; Ângelo, 2004).

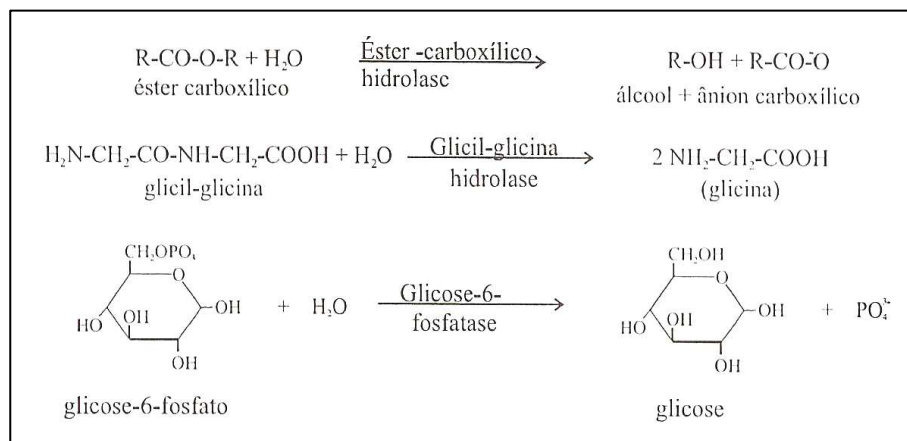


Figura 03: Algumas reações de hidrólise catalisadas pelas hidrolases.
 Fonte: Ângelo, 2004.

Proteases, celulasas, amilases, e quitinases estão entre as hidrolases mais utilizadas na biotecnologia. São utilizadas nas indústrias do couro, farmacêutica, têxtil

(celulases), de alimentos (amilases), na preparação de detergentes (proteases e celulases), como também no controle biológico de fitopatógenos por meio do micoparasitismo, processo através do qual microrganismos secretam enzimas (neste caso, a quitinase) que são capazes de degradar a parede celular de vários fungos. (Schickler et al., 1998; Pandey et al., 2000; Gokul et al., 2000; Coelho & Nascimento, 2008).

3.3.1 Celulases

O complexo enzimático celulases é formado por um conjunto de hidrolases glicosídicas, secretadas por microrganismos, plantas e alguns animais. Estas enzimas são glicoproteínas de peso molecular entre 50 e 90 kDa, capazes de romper as ligações glicosídicas do tipo β -1,4 de microfibrilas da celulose, principal polímero presente nas paredes de células vegetais, resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose (Dillon, 2004).

Entre os complexos celulolíticos secretados por bactérias e fungos, o mais conhecido é o de *T. reesei* E. G. Simons. Os métodos de separação de moléculas e os estudos sobre a ação dos componentes das celulases têm mostrado que esse complexo enzimático é constituído por um conjunto de três enzimas hidrolíticas (Busto et al., 1996; Dillon, 2004).

Primeiramente, as endo- β -1,4-glicanases (EG I, EG II, EG III e EG IV; EC 3.2.1.4), que hidrolisam as ligações glicosídicas ao acaso na fibra de celulose e, segundo Evans et al. (1992), três das principais endoglucanases secretadas por *T. reesei* (EG I, EG II e EG III) são proteínas distintas, com diferentes massas moleculares, pH e conteúdo de carboidratos (Busto et al., 1996; Dillon, 2004).

Em seguida temos as exo- β -1,4-glicanases ou celobiohidrolases (CBH I e CBH II; EC 3.2.1.91), que agem nas extremidades redutoras e não redutoras de polímeros gerados pela ação das endoglicanases, liberando celobiose; e, por fim, as β -1,4-glicosidases (BG I, BG II; EC 3.2.1.21) que hidrolisam oligossacarídeos e celobiose à glicose. Todos esses componentes agem de forma sinérgica na hidrólise da celulose (Busto et al., 1996; Dillon, 2004).

A deficiência de β -glicosidase leva a um acúmulo de celobiose, a qual inibe a ação das enzimas celulolíticas. *Trichoderma viride* também possui um dos mais conhecidos sistemas enzimáticos de celulase, que secreta grandes quantidades da enzima, porém sua β -glicosidade extracelular está presente em níveis muito baixos. O mesmo ocorre em *T. reesei* onde, a sua β -glicosidade corresponde a menos de 1% da proteína extracelular (Evans et al., 1992; Wang et al., 2009).

Desde a década de 50 as celulases vêm sendo alvo freqüente de pesquisas, quando Elwyn Reese publicou diversos trabalhos com o fungo *T. viride* que, mais tarde, foi reclassificado como *T. reesei* em sua homenagem. Atualmente, é o microrganismo padrão para estudos celulolíticos (Rabinovich et al., 2002; Bon et al., 2008;).

Reese et al. (1950) propuseram um modelo para explicar a ação das celulases conhecido como hipótese $C_1 - C_x$. De acordo com esse modelo, para ocorrer a degradação da celulose nativa, um fator denominado C_1 , presente no complexo enzimático, mas sem atividade hidrolítica, disponibilizaria substratos para a ação catalítica de um fator denominado C_x . Fungos com ausência do fator C_1 seriam capazes de apenas degradar formas derivadas de celulose solúveis, como a carboximetilcelulose. Este esquema é ilustrado na figura 04.

Assim, para que a celulose possa ser degradada, as celulases devem não só desencadear hidrólises, mas também devem reduzir as estruturas cristalinas do

polímero, por meio do rompimento de pontes de hidrogênio que ligam as microfibrilas (Dillon, 2004).

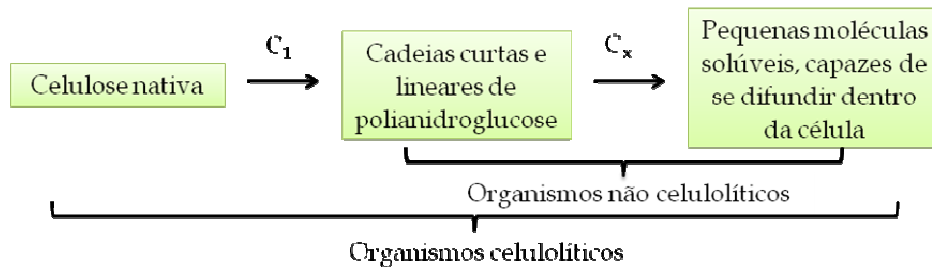


Figura 04: Sistema celulolítico C_1 - C_x proposto por Elwyn Reese. Adaptado de Reese et. al (1950).

As celulasas possuem dois centros catalíticos que são encontrados em suas extremidades: o domínio catalítico (CD) e o domínio de ligação à celulose (CBD); esses são conectados por uma região flexível e altamente glicosilada. Em fungos os CBDs, que ligam especificamente a celulose cristalina, possuem estrutura tridimensional similares. Os CBDs aumentam a ligação e a atividade da celulase em substratos insolúveis e sua deleção pode levar a um decréscimo na atividade em relação a celulose cristalina (Xiao et al., 2001; Dillon, 2004).

Din et al. (1994), revisando o modelo C_1 - C_x e analisando a endoglucanase A de *Cellulomonas fimi* (McBeth e Scales) Bergey et al., concluíram que o CD do microrganismo corresponde ao sistema hidrolítico C_x e o CBD corresponde ao sistema C_1 como proposto por Reese et al. (1950).

Atualmente as pesquisas relacionadas a celulose estão voltadas para a biotecnologia e sua produção é destinada aos microrganismos, especialmente fungos do gênero *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium* (Martins et al., 2008; Rabinovich et al., 2002).

As celulasas constituem o segundo grande grupo de carboidrases exploradas comercialmente devido ao seu potencial como aditivos na indústria de detergentes, na indústria têxtil e mais ainda na conversão de biomassa em etanol, um combustível ambientalmente adequado (Coelho e Nascimento, 2008).

Martins et al. (2008) ao comparar as atividades das celulasas de *T. reesei* e *P. echinulatum* Raper e Thom ex Fassatiova observaram que ambos complexos enzimáticos mostraram-se similares em suas atividades celulolíticas, sendo a espécie *P. echinulatum* uma alternativa para bioprocessos baseados na sacarificação da celulose. Entretanto, celulasas produzidas por actinomicetos apresentam características que, em termos biotecnológicos, superam as produzidas pelos fungos (Coelho e Nascimento, 2008).

Inúmeras pesquisas apontam o gênero *Trichoderma* como principal produtor de celulasas dentre os fungos filamentosos (Wood e McCraea, 1978; Beldman, 1985; Vlaev et al., 1997; Juhász et al., 2004), portanto a utilização de ensaios de atividade enzimática pode servir como uma ferramenta importante na triagem e seleção de isolados com alta produção de celulasas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos isolados

Para este estudo foram utilizados 30 *Trichoderma* spp. isolados de diversos ambientes conforme ilustra a tabela 01.

Tabela 3: Origem dos isolados de *Trichoderma* utilizados neste estudo.

	Origem	Local	Código do isolado	Total
Endofíticos	<i>Victoria amazonica</i>	Careiro – AM	Vrc 1 2.1; Vrc 2 1.3; Vrc 2 2.2; Vrc 2 2.2b; Vrc 2 3.2; Vrc 1 3.3b	6
	<i>Rollinia</i> sp.	Campus da UFAM	Ansp C3 1.2c; Ansp R1 2.1	2
	<i>Murraya paniculata</i>	São Carlos - SP	MPCe 10 3.2; MPCe 2 2.2a; MPCe 3 3.1; MPGe 16 1.3b; MPre 11 2.3; MPre 11 3.3; MPre 5 2.2;	7
	<i>Strychnos cogens</i>	AM 010 – AM	F80	1
	Jatobá	BR 174, Km 109	1589b	1
Madeira	<i>Scleronema micranthum</i>		INPA 6; INPA 36; INPA 37; INPA 43; INPA 44; INPA 45; INPA 49; INPA 51; 1334; 1341	10
Solo	Solo de cultura de cubiu	Ariaú	1351	1
	Terra Preta de Índio	-	1437	1
	Desconhecido	-	1343	1
	Total Geral			30

4.2 Meios de cultura e soluções

4.2.1 Meio BDA (pH 8,0)

Batata	200g
Dextrose	20g
Ágar	15g
H ₂ O	1.000mL

4.2.2 Meio BD (pH 8,0)

Batata	200g
Extrato de levedura	2g
H ₂ O	1.000mL

4.2.3 Solução de Manachini (Manachini et al., 1987)

KH ₂ PO ₄	2g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,9g
Extrato de levedura	1g
Água destilada	1.000mL
Substrato indutor	0,5%

Neste caso o substrato indutor utilizado foi Carboximetilcelulose (CMC) e o pH foi ajustado para 5,0.

4.2.4 CTAB 2%

Tris	2,42g
NaCl	8,2g
EDTA	0,74g
CTAB	2g
Água mili-Q	100 mL

4.2.5 Clorofil

Clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1

4.2.6 Tampão de corrida TBE 10X (Solução estoque)

Tris base	108g
Ácido Bórico	55g
EDTA	7,4g
Água destilada	1.000mL

As diluições foram realizadas no momento do uso.

4.2.7 Tampão Tris-EDTA

Tris-HCL 1M pH 8,0	1mL
EDTA 0,5M	0,2mL

4.2.8 Gel de agarose 0,8% e 1,5%

Agarose	0,8g (0,8%)
	1,5g (1,5%)
TBE 1X	100mL

4.2.9 Tampão da amostra

Glicerol (30%)	3mL
Azul de Bromofenol (0.25%)	25mg

Completar o volume para 10 mL com água milli-Q.

4.2.10 Solução de Tween 80 0,1%

Tween 80	0,1 mL
Água destilada	1.000 mL

Foram distribuídos 2,0 mL da solução em tubos de ensaio e posteriormente autoclavados.

4.2.11 Solução de ADNS (Ácido Dinitrosalicílico) (Ghose, 1987, com modificações)

Em banho-maria a 40 °C:

ADNS 1g

Água destilada 30mL

Dissolver o ácido dinitrosalicílico na água e depois acrescentar:

Tartarato de Sódio e Potássio 30g

Solução de NaOH 2N 20g

Completar o volume para 100 mL e armazenar em temperatura ambiente protegido da luz.

4.2.12 Solução de Carboximetilcelulose 2% (Ghose, 1987)

CMC 2g

Completar para 100 mL com Tampão Citrato de Sódio 50 mM, pH 4,8.

4.2.13 Tampão Citrato 1M pH 4,8 (Ghose, 1987)

Ácido Cítrico Monohidratado 210g

Água destilada 750mL

NaOH 50-60g

Completar para 1.000 mL e, se necessário, adicionar NaOH até que o pH esteja em 4,8.

4.2.14 Tampão Acetato de Sódio 50 mM, pH 4,8

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{Acetato}]}{[\text{Ácido acético}]}$$

pKa Ácido acético= 4,74

Acetato 2,192g

Ácido acético 1,33 mL

Completar o volume para 100 mL.

4.2.15 Solução de Bicarbonato de Sódio 10% (Kóvacs et al., 2009 b)

NaCO₃ 100g

Completar o volume para 1.000 mL.

4.2.16 Solução de pNPG (p-Nitrofenil-β-D-Glicosídeo) 0,2% (Kóvacs et al., 2009 b)

pNPG 0,2%

Completar o volume para 100 mL com tampão Acetato de Sódio 50mM pH 4,8.

4.3 Esterilização e incubação

Os meios de cultura, soluções (somente aquelas que necessitam de esterilização), placas de Petri, vidrarias em geral e todos os materiais utilizados, foram esterilizados em autoclave vertical a 121°C e 1 atmosfera de pressão por 15 minutos. Todos os isolados ficaram incubados a 26°C durante os experimentos.

4.4 Cultura monospórica

Após o crescimento e esporulação dos isolados foi realizada a cultura monospórica (Figura 5) a fim de se obter uma nova colônia a partir de um único conídio. Para tal, utilizou-se a técnica de diluição seriada seguida de plaqueamento de

acordo com o protocolo de Azevedo e Costa (1973). Após as diluições, 50 μ L das suspensões 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram plaqueados em triplicata, em meio BDA e após dois dias foi selecionada uma colônia oriunda de um único conídio. As placas contendo a cultura pura, foram armazenadas em estufa BOD a 26°C até o crescimento e esporulação da colônia para posterior conservação.

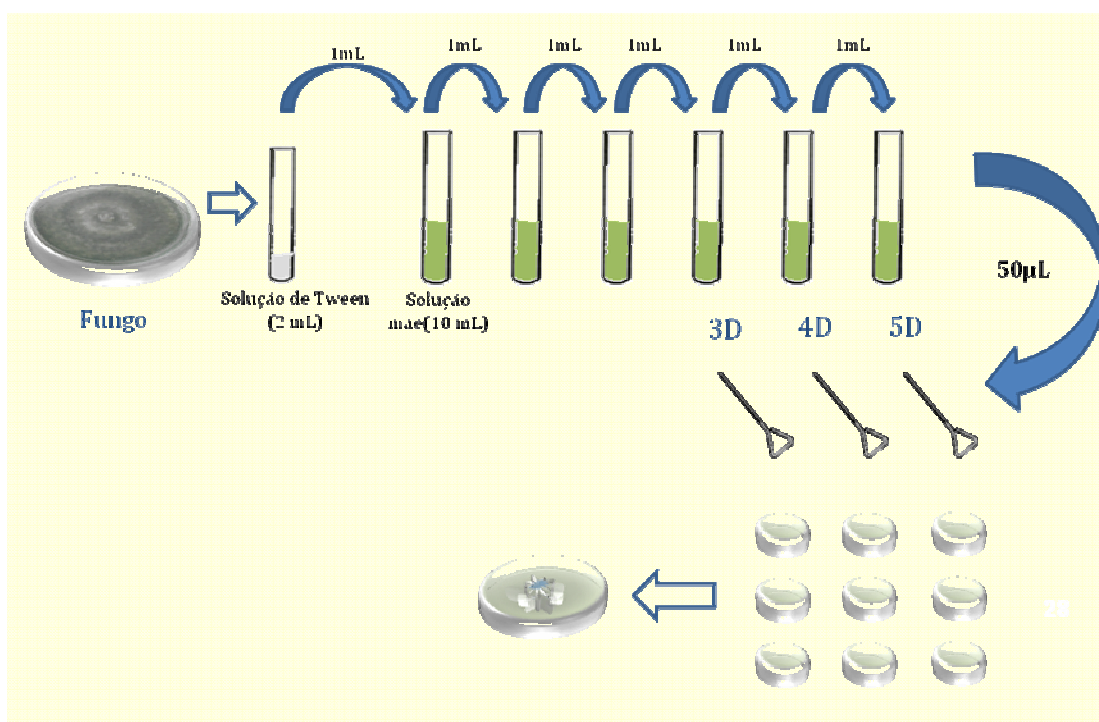


Figura 5: Modelo esquemático do processo de cultura monospórica que consiste em diluição sucessiva seguida de plaqueamento.

4.5 Conservação dos isolados

Após a esporulação da colônia, os isolados utilizados nesta pesquisa foram conservados através de três formas: (1) método Castellani (1939), onde pequenos blocos do meio de cultura contendo o fungo foram depositados em ampolas de vidro estéreis de 13 mL contendo sete mililitros de água destilada autoclavada e depois fechados hermeticamente e mantidos em temperatura ambiente; (2) glicerol 10%, que consistiu

em fazer uma suspensão de esporos, armazenada em microtubos de dois mililitros e estes foram conservados a -20°C e (3) tubos de ensaio com meio de cultura (BDA) inclinado onde, após o crescimento do fungo e sua esporulação, é acrescido óleo mineral até que toda a colônia fique submersa e estes foram mantidos em temperatura ambiente.

4.6 Extração de DNA

Para a extração de DNA fúngico foi seguido o protocolo desenvolvido por Souza (2006) com algumas modificações. Primeiramente, os isolados foram previamente cultivados em meio BDL (líquido) por 48 horas a 26°C e 121 rpm. Após a incubação foi realizada a filtração para que houvesse separação do micélio. Em seguida, triturou-se o micélio filtrado em nitrogênio líquido e colocou-se 200 mg em microtubos de 2 mL; foi adicionado 1000 μL de tampão de extração (CTAB), misturado suavemente e incubado em banho-maria a 65°C por 30 minutos; o tubo foi removido do banho-maria, esfriou no gelo; adicionou-se 200 μL de clorofil, misturou-se bem e centrifugou-se a 12.000 rpm por dois minutos. A fase aquosa foi removida e transferida para outro tubo limpo. Adicionou-se 500 μL clorofil e agitou-se suavemente. Centrifugou-se a 12.000 rpm por três minutos. Transferiu-se a fase aquosa para outro tubo limpo. Foram adicionados 600 μL de etanol (a 20°C), misturou-se bem (gentilmente), e foi precipitado no congelador até o dia seguinte. Em seguida o precipitado foi centrifugado a 12.000 rpm por três minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se ao sedimento 1 mL de etanol (70%) que agiu durante 10 minutos. Repetiu-se o procedimento mais uma vez e adicionou-se 1 mL de etanol (95%) durante três minutos. Centrifugou-se a 12.000 rpm por cinco minutos, descartou-se o sobrenadante e secou-se o sedimento invertendo-se o tubo sobre um papel autoclavado por, aproximadamente, 30 minutos. O sedimento foi

dissolvido em 50 μL de tampão TE e conservado em geladeira para posterior quantificação. A quantificação foi realizada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo e visualizado em luz ultravioleta.

4.7 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

A partir dos oligonucleotídeos descritos por White et al. (1990) para a região ITS-1 do rDNA, as reações foram realizadas, nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2,5 min; seguida de 40 ciclos de 15 seg de desnaturação a 94°C; 30 seg de anelamento a 58°C e 1,5 min de extensão a 72°C, concluindo com 10 min de extensão final a 72°C (Souza, 2006, com modificações). Os componentes da PCR e suas concentrações são mostrados na tabela 2.

O produto da PCR foi conferido por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo e visualizado em luz ultravioleta. A purificação foi realizada através do kit *Accuprep® PCR Purification Kit* (Bioneer corporation).

Tabela 4: Componentes da Reação de Polimerização em Cadeia (PCR), suas concentrações e quantidades.

Reagentes	Concentração	Quantidades
Água Mili-Q	-	10,2 μL
Tampão	10x	2,5 μL
MgCl ₂	25 mM	3,0 μL
dNTP	1,25 mM	3,0 μL
Oligonucleotídeo ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)	10 pMol	2,0 μL
Oligonucleotídeo ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC)	10 pMol	2,0 μL
Taq polimerase	5,0 U	0,3 μL
DNA	-	2,0 μL
Total	-	25 μL

4.8 Reação de seqüenciamento e análise das seqüências obtidas

As amostras foram seqüenciadas utilizando os oligonucleotídeos iniciadores das regiões ITS-1 e ITS-2 e seus complementares. Para as reações de seqüenciamento (PCR) foram realizadas reações de 10 µL, contendo 5,0 µL do produto da reação, 2,0 µL de *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for Mega BACE (Amersham Biosystems)*, e 10 pmoles de cada iniciador senso e anti-senso. Os produtos das reações de seqüenciamento foram lidos por seqüenciador automático. O seqüenciamento das amostras foi realizado nos dois sentidos de leitura para maior garantia e fidelidade da análise.

As seqüências foram comparadas com a sua fita complementar e submetidas ao programa BLAST para comparação com outras já depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para identificação das espécies conforme a similaridade genética.

4.9 Condições de cultivo para produção de enzimas

Para a produção de enzimas, os isolados foram previamente cultivados em meio indutor. Foram inoculados 10 µL da solução de esporos (Glicerol 10%) em 50 mL de solução de Manachini (Manachini et al., 1987) onde o substrato indutor utilizado foi a carboximetilcelulose. Para a produção da enzima, os fungos foram incubados a 27°C, 120 rpm durante 120 horas. O experimento foi realizado em triplicata. Após o período de incubação, as amostras foram filtradas a vácuo para a separação da massa micelial.

4.10 Determinação de proteína total

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se o reagente concentrado comercial da Bio-Rad™ e

albumina de soro bovino (ASB), como padrão. Em microtubos de 1,5 mL foram colocados 800 μ L do meio de cultura filtrado e 200 μ L do reagente de Bradford concentrado. A mistura foi incubada durante cinco minutos para que ocorresse a reação. A absorvância do produto da reação foi determinada em espectrofotômetro, no comprimento de onda ajustado para 595 nm. O experimento foi realizado em triplicata.

4.11 Determinação da atividade de celulase

4.11.1 Atividade de CMCase

Para a determinação da atividade de carboximetilcelulase (CMCase), foi utilizada a metodologia descrita por Ghose (1987). Em microtubos de 2 mL foram adicionados 50 μ L de extrato enzimático diluído em tampão citrato de sódio pH 4,8 e 50 μ L de solução de CMC (2%) preparada com o mesmo tampão. A reação foi incubada em banho-maria 50°C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 300 μ L de ADNS e incubados em banho fervente por cinco minutos. Após este tempo, foram adicionados 1,5 mL de água destilada, foi feita a homogeneização por inversão e, em seguida, a leitura foi realizada em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 540 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e definiu-se que 1 unidade de atividade enzimática era igual a 1 μ mol de glicose (açúcar redutor) liberada por minuto.

4.11.2 Atividade de β -glucosidase

Para a dosagem de β -glucosidase foi utilizada a metodologia proposta por Kóvacs et al., (2009 b), utilizando o p-Nitrofenil- β -D-Glicosídeo (pNPG) como substrato para a enzima. Foram adicionados 50 μ L do extrato enzimático diluído em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 a uma solução de pNPG (0,2%) e incubados a

50°C durante 10 minutos. Em seguida, interrompeu-se a reação adicionando 500 µL da solução de bicarbonato de sódio 10%. A mistura foi resfriada em banho de gelo, foram adicionados 2,5 mL de água destilada e posteriormente foi feita a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 410 nm. Uma unidade internacional de atividade de β-glicosidase libera 1 µmol de PNP (paranitrofenol) por minuto sob as condições de ensaio. Os ensaios foram realizados em triplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Purificação e conservação dos isolados

De todos os isolados obtidos foram feitas culturas monospóricas seguidas de conservação utilizando os métodos de água com glicerol a 10%, Castellani (Castellani, 1939) e cultura submersa em óleo mineral (Figura 6).



Figura 6: Métodos utilizados na preservação dos isolados estudados. (a) Glicerol 10% (solução de esporos); (b) Castellani e (c) Cultura submersa em óleo mineral.

Não há um método universal para a conservação de fungos e bactérias (patógenos ou não). A escolha de uma metodologia deve ser baseada na natureza do isolado, nas suas características morfológicas, de crescimento, patogênicas e principalmente, nas vantagens e desvantagens que cada método oferece (Dhingra e Sinclair, 1995).

Geralmente as culturas fúngicas são armazenadas em tubos de ensaios com meio de cultura inclinado onde repicagens sucessivas (a cada seis meses) devem ser realizadas para garantir a viabilidade das culturas. Atualmente existem outros métodos como liofilização, conservação em nitrogênio líquido, cultivo de esporos em terra, água destilada esterilizada (Castellani), congelamento, grãos de cereais, areia ou sílica gel que garantem a viabilidade e preservação das características das culturas por mais tempo (Gonçalves et al., 2007).

Vale ressaltar que cada metodologia é aplicada a grupos específicos. Neste trabalho, como já citado, optou-se preservar os fungos através do método de Castellani, óleo mineral e suspensão de esporos em glicerol 10%. A conservação pelo método de Castellani foi acondicionada em temperatura ambiente e o mesmo procedimento de estocagem foi seguido para àqueles conservados em óleo mineral.

O método de Castellani, além do seu baixo custo e praticidade, oferece para bactérias e Oomycota como *Phytophthora* spp. e *Pythium* spp. ou fungos como *Cylindrocladium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma* spp., *S. cepivorum* Berck, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Saccardo e *Verticillium* sp., uma viabilidade de, no mínimo, 1-10 anos (Figueiredo, 1967).

O armazenamento dos fungos em óleo mineral tem por objetivo diminuir o ritmo do crescimento da cultura reduzindo a disponibilidade de oxigênio. No entanto, como qualquer método, o tempo de armazenamento depende da espécie com a qual se está trabalhando, pois algumas podem sofrer alterações morfofisiológicas durante o lento crescimento, enquanto outras são sensíveis ao óleo e não resistem a este tipo de armazenamento (Dhingra e Sinclair, 1995; Gonçalves et al., 2007;).

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizada somente a suspensão de esporos, mantida congelada em glicerol 10%, devido manter alta viabilidade, facilidade e praticidade no manuseio. O método da conservação de culturas mitospóricas em água com glicerol foi adaptado a partir do padrão utilizado para a conservação de procariotos, onde a quantidade de glicerol é de 15% (Howard, 1956). Este método oferece uma maior confiabilidade ao trabalho realizado, uma vez que, para realizar fermentações, ou cultivos em larga escala, não é necessário realizar repiques em placa de Petri, bastando somente inocular alguns microlitros no meio de cultura a ser utilizado, acompanhado de um controle da pureza dos inóculos.

5.2 Extração, amplificação e purificação do DNA para o seqüenciamento

O método de extração de DNA fúngico desenvolvido por Souza (2006) mostrou-se eficaz quando aplicado aos isolados de *Trichoderma* que apresentaram entre 40 e 60 ng/ μ L de DNA genômico, considerando o tempo máximo de 48 horas de crescimento micelial.

Dos isolados utilizados neste trabalho, 27 tiveram a região ITS-1 e ITS-2 do rDNA amplificada de acordo com o programa de termociclagem descrito no item 4.7. A temperatura de anelamento variou em 3°C daquela utilizada por Souza (2006) assim como houveram variações no tempo de cada etapa da reação. Todos os isolados mostraram ótimos resultados com bandas de aproximadamente 600 pb (Fig. 7). Para a purificação da PCR foi utilizado o kit *Accuprep® PCR Purification Kit* (Bioneer corporation). Após a purificação, as 27 amostras foram enviadas ao Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM), Laboratório de Tecnologia do DNA para a realização do protocolo de seqüenciamento.

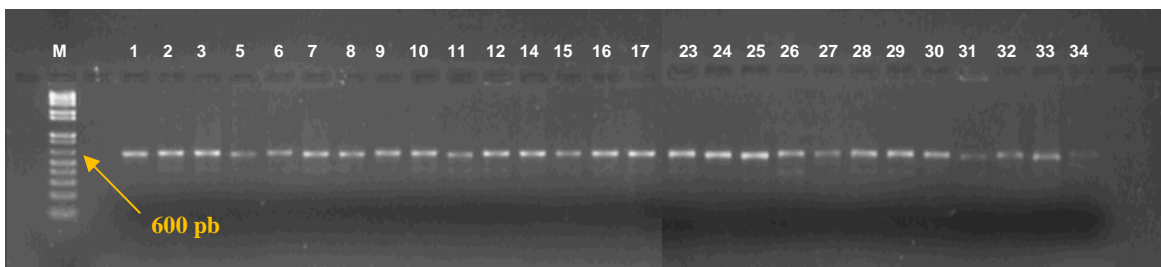


Figura 7: Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, da amplificação da região ITS do rDNA de 27 isolados de *Trichoderma* spp., utilizados na produção de enzimas celulolíticas.

5.3 Análise das seqüências obtidas

Os resultados confirmaram o gênero observado pela morfologia, indicando o maior grau de confiabilidade esperada. Foram identificadas oito espécies, conforme demonstrado na a tabela 3.

Tabela 3: Identificação molecular dos isolados de *Trichoderma* por meio dos fragmentos ITS-1, 5,8S e ITS-2 do rDNA.

Número das amostras	Código do isolado	Identificação e percentagem de identidade	Origem
1. Amostra 01	MPre 11 3.3	<i>Trichoderma koningiopsis</i> – 98%	<i>M. paniculata</i>
2. Amostra 02	MPCe 2 2.2a	<i>T. harzianum</i> – 96%	<i>M. paniculata</i>
3. Amostra 03	MPCe 10 3.2	<i>T. koningii</i> – 99%	<i>M. paniculata</i>
4. Amostra 05	F80	<i>T. koningii</i> – 99%	<i>S. cogens</i>
5. Amostra 06	MPGe 16 1.3b	<i>T. ovalisporum</i> – 99%	<i>M. paniculata</i>
6. Amostra 07	MPre 11 2.3	<i>T. viride</i> – 98%	<i>M. paniculata</i>
7. Amostra 08	MPCe 3 3.1	<i>T. harzianum</i> – 98%	<i>M. paniculata</i>
8. Amostra 09	AnspR 1 2.1	<i>T. harzianum</i> – 97%	<i>Rollinia</i> sp.
9. Amostra 10	AnspC 3 1.2c	<i>T. harzianum</i> – 98%	<i>Rollinia</i> sp.
10. Amostra 11	Vrc 2 2.2	<i>T. asperellum</i> – 97%	<i>V. amazonica</i>
11. Amostra 14	Vrc 2 3.2	<i>T. piluliferum</i> – 98%	<i>V. amazonica</i>
12. Amostra 18	MPre 5 2.2	<i>T. hamatum</i> – 97%	<i>M. paniculata</i>
13. Amostra 33	1589b	<i>T. asperellum</i> - 96%	Jatobá

Este resultado apresenta pela primeira vez espécies de *Trichoderma* isolados de *V. amazonica* (Vrc 2 2.2 e Vrc 2 3.2) e *Rollinia* sp. (AnspR1 2.1 e AnspC3 1.2c), com destaque para *T. piluliferum*, isolado de *V. amazonica*. É uma espécie pouco comum, considerada nova no hospedeiro em questão e, atualmente, está tendo seu perfil químico e o isolamento de metabólitos secundários bioativos com características antibióticas estudados, sob a coordenação do professor Dr. Afonso Duarte Leão de Souza, Coordenador do Grupo de Estudos de Microrganismos Amazônicos (GEMA/UFAM).

Recentemente, Moreira (2006) relatou esta espécie habitando folhas submersas de *Tibouchina pulchra* Cogn nos lagos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo. Os resultados obtidos pela autora corroboram com os obtidos neste trabalho, uma vez que *V. amazonica* é uma planta aquática muito comum nos lagos da Região Amazônica e o isolado Vrc 2 3.2 era proveniente do caule da planta, que fica totalmente submerso.

Embora muitas espécies de *Trichoderma* sejam utilizadas como agentes de biocontrole, pois produzem metabólitos e enzimas extracelulares capazes de quebrar a parede celular de outros fungos (Harman et al., 2004), não foram encontrados relatos de

T. piluliferum utilizados com este fim. Não se tem conhecimento de que esta espécie exerça algum papel de defesa contra outros fungos em sua hospedeira *V. amazonica*, pois não foram encontrados indícios na literatura de que ataques de fitopatógenos sejam efetuados nesta planta, já que para tal, estes deveriam ser totalmente adaptados ao ambiente aquático e à pouca disponibilidade de oxigênio.

Ao contrário de *T. piluliferum*, *T. asperellum*, também foi identificado como endófito de *V. amazonica*, no entanto isolados desta espécie, são utilizados no controle de *R. solani* agente causador do tombamento em plântulas de pepino (*Cucumis sativus*) e outras hortaliças. É considerado um fitopatógeno muito resistente devido a produção de escleródios que garantem sua sobrevivência em condições adversas, podendo viver saprofiticamente no solo e possuir diversos hospedeiros (Lucon et al., 2009).

Murraya paniculata, *S. cogens* e *Rollinia* sp., são plantas de terra firme e que podem tornar-se vulneráveis ao ataque de fitopatógenos. Os isolados identificados nestas plantas como *T. harzianum*, *T. ovalisporum*, *T. koningii* e *T. hamatum*, segundo a literatura, produzem enzimas extracelulares e também são efetivas como agentes no controle biológico dos fitopatógenos *R. solani*, *M. perniciosa* e outros patógenos do solo (De Marco e Felix, 2002; Holmes et al., 2004; Papavizas, 1985; Wood e McCraea, 1978).

Dentre as demais espécies identificadas, *T. viride* chama a atenção por ser considerado um patógeno humano causando infecção pulmonar em um paciente com leucemia aguda segundo dados de De Miguel et al. (2005). No tratamento da infecção foram utilizados Anfotericina B (0.25 µg/mL) e Voriconazol (2 µg/mL). Num segundo momento, não havendo melhora, Caspofungi foi adicionado ao tratamento e o paciente sobreviveu à infecção.

Outros casos são relatados tendo como principal agente da infecção *T. longibrachiatum*, mas outras espécies também estão envolvidas (Alanio et al., 2008; Aroca et al., 2004; Chouaki et al., 2002). Muito se fala na inofensividade das espécies de *Trichoderma*, geralmente apontadas como não causadoras de malefícios ao homem, contudo, com uma busca avançada na literatura podemos observar que há espécies que podem levar pacientes à morte. Apesar de constarem, na literatura, apenas relatos de infecções em pacientes com o sistema imunológico bastante comprometido, o cuidado no manuseio de *Trichoderma* deve ser rigorosamente seguido, assim como para qualquer microrganismo.

5.4 Determinação de proteínas totais

Os resultados relacionados à concentração de proteínas totais para os 30 *Trichoderma* spp. deste estudo são mostrados na tabela 4. Todos os isolados apresentaram bons resultados, porém os de *V. amazonica* e *S. micranthum* apresentaram uma menor concentração de proteínas, com uma média de 12,65 e 8,99 mg/mL respectivamente. Os isolados de *M. paniculata* e *Rollinia* sp. apresentaram concentrações um pouco maiores: 12,60 e 13,78 mg/mL, respectivamente.

Neste experimento foi utilizado o método de Bradford que é baseado na interação entre o corante BG-250 (Coomassie brilliant blue) e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. É mais sensível que o método de Lowry e a ligação entre o corante e as proteínas ocorre em dois minutos e dura, aproximadamente, uma hora (Bradford, 1976).

De acordo com Zaia et. al (1998), no pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica que absorve fortemente em 595 nm.

A literatura relacionada à determinação de proteínas totais através do método de Bradford em fungos mitospóricos é bastante escassa, contudo os resultados apresentados corroboram com aqueles obtidos por Hanada (2006), onde todos os *Trichoderma* spp. produziram proteínas em meio de cultura contendo carboximetilcelulose.

Tabela 4: Concentração de proteínas totais determinada através do método de Bradford em sobrenadante de *Trichoderma* spp.

Código do isolado	Identificação	Concentração de proteínas (mg/mL)
Vrc 2 2.2	<i>Trichoderma. asperellum</i>	31,88
MPCe 10 3.2	<i>T. koningii</i>	17,4
MPCe 2 2.2a	<i>T. harzianum</i>	16,6
MPCe 3 3.1	<i>T. harzianum</i>	16,45
Vrc 2 3.2	<i>T. piluliferum</i>	14,71
AnspC3 1.2c	<i>T. harzianum</i>	14,67
MPRe 11 3.3	<i>T. koningiopsis</i>	13,25
Ansp R1 2.1	<i>T. harzianum</i>	12,89
1589b	<i>T. asperellum</i>	11,61
F80	<i>T. koningii</i>	11,58
MPRe 11 2.3	<i>T. viride</i>	9,89
MPRE 5 2.2	<i>T. hamatum</i>	9,13
MPGe 16 1.3b	<i>T. ovalisporum</i>	5,54
1351	<i>Trichoderma</i> sp.*	17,59
1334	<i>Trichoderma</i> sp. *	17,59
Vrc 2 2.2b	<i>Trichoderma</i> sp. *	12,91
INPA 37	<i>Trichoderma</i> sp. *	10,68
1437	<i>Trichoderma</i> sp. *	10,06
INPA 6	<i>Trichoderma</i> sp. *	9,65
INPA 43	<i>Trichoderma</i> sp. *	8,8
INPA 49	<i>Trichoderma</i> sp. *	8,37
INPA 44	<i>Trichoderma</i> sp. *	8,13
1341	<i>Trichoderma</i> sp. *	7,83
INPA 36	<i>Trichoderma</i> sp. *	7,54
INPA 45	<i>Trichoderma</i> sp. *	6,9
Vrc 2 1.3	<i>Trichoderma</i> sp. *	5,74
1343	<i>Trichoderma</i> sp. *	5,44
Vrc 1 2.1	<i>Trichoderma</i> sp. *	5,36
Vrc 1 3.3b	<i>Trichoderma</i> sp. *	5,31
INPA 51	<i>Trichoderma</i> sp. *	4,5

* não identificados

5.5 Determinação da atividade de CMCase

Os valores obtidos para a dosagem de celulase (CMCase) bem como suas atividades específicas são mostrados na tabela 5. Todos os isolados apresentaram valores muito baixos para CMCase, inferiores a 0,100 U/mL com exceção de *T. koningii* (MPCe 10 3.2), *T. harzianum* (MPCe 2 2.2a), ambos isolados de *M. paniculata*, e o isolado 1437 identificado como *Trichoderma* sp. proveniente de terra preta de índio, que apresentaram valores um pouco mais altos 0,112, 0,103 e 0,105 U/mL, respectivamente.

Busto et al. (1996) ao comparar a atividade da carboximetilcelulase de *T. reesei* em várias fontes de carbono obteve 39,61 U/mL ao utilizar Carboximetilcelulose como substrato indutor e os valores cinéticos de K_m 1,32% e V_{max} 405,5 $\mu\text{mol}/\text{glucose}/\text{mL}/\text{h}$ foram obtidos.

A celulase comercial Celluclast (1.5L FG), industrializada a partir de *T. reesei*, apresenta uma atividade de 766,67 U/mL e atividade específica de 12,76 U/mg quando CMC é utilizada como fonte de carbono. Ao comparar esta atividade com a encontrada em *P. echinulatum* (1,53 U/mL) podemos observar um grande contraste nos valores (Martins et al., 2008). Contudo, vale ressaltar que a celulase utilizada no trabalho de Martins é industrializada, portanto, tem um alto grau de pureza. Ao contrário, a linhagem de *P. echinulatum* é uma linhagem usada em laboratório e foi obtida através de fermentação em meio mínimo.

Tabela 5: Valores da dosagem da atividade de CMCase (U/mL) e sua atividade específica (U/mg de proteína) encontrados nos isolados de *Trichoderma*.

Código do isolado	Identificação	Atividade de CMCase (U/mL)	Atividade específica (U/mg de proteína)
1589b	<i>T. asperellum</i>	0,068239647	0,005877661
Vrc 2 2.2	<i>T. asperellum</i>	0,034424951	0,001079829
MPRE 5 2.2	<i>T. hamatum</i>	0,04039225	0,004424124
AnspC3 1.2c	<i>T. harzianum</i>	0,082693241	0,006415302
AnspR1 2.1	<i>T. harzianum</i>	0,093567251	0,006378136
MPCe 2 2.2a	<i>T. harzianum</i>	0,10311493	0,006211743
MPCe 3 3.1	<i>T. harzianum</i>	0,038668099	0,002350644
F80	<i>T. koningii</i>	0,025407169	0,002194056
MPCe 10 3.2	<i>T. koningii</i>	0,112927557	0,006490089
MPre 11 3.3	<i>T. koningiopsis</i>	0,02951824	0,002227792
MPGe 16 1.3b	<i>T. ovalisporum</i>	0,035087719	0,006333523
Vrc 2 3.2	<i>T. piluliferum</i>	0,003262124	0,000221762
MPre 11 2.3	<i>T. viride</i>	0,01943987	0,001965609
1334	<i>Trichoderma</i> sp.*	0,082481601	0,004689119
1341	<i>Trichoderma</i> sp.*	0,04158571	0,005311074
1343	<i>Trichoderma</i> sp.*	0,019837689	0,003646634
1351	<i>Trichoderma</i> sp.*	0,020766201	0,001180569
1437	<i>Trichoderma</i> sp.*	0,10530294	0,010467489
INPA 36	<i>Trichoderma</i> sp.*	0,074206946	0,00984177
INPA 37	<i>Trichoderma</i> sp.*	0,082428293	0,007718005
INPA 43	<i>Trichoderma</i> sp.*	0,051531209	0,005855819
INPA 44	<i>Trichoderma</i> sp.*	0,036943947	0,004544151
INPA 45	<i>Trichoderma</i> sp.*	0,057896328	0,008390772
INPA 49	<i>Trichoderma</i> sp.*	0,078185145	0,009341117
INPA 51	<i>Trichoderma</i> sp.*	0,032038032	0,007119563
INPA 6	<i>Trichoderma</i> sp.*	0,04635955	0,004804098
Vrc 1 2.1	<i>Trichoderma</i> sp.*	0,012149421	0,000941086
Vrc 1 3.3b	<i>Trichoderma</i> sp.*	0,03110952	0,005804015
Vrc 2 1.3	<i>Trichoderma</i> sp.*	0,012809802	0,002412392
Vrc 2 2.2b	<i>Trichoderma</i> sp.*	0,097678323	0,017017129

*não identificados

Ao verificar a atividade da celulase em fungos isolados de solo, Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) obtiveram a melhor atividade CMCásica com o cultivo de *T. harzianum*: 1,64U. Contudo, os autores chamam a atenção para uma equivalência nos resultados obtidos, pois não houve variação significativa entre os valores encontrados para as demais espécies, não sendo possível indicar uma espécie com grande potencial em produzir celulases.

Apesar de a literatura apresentar valores maiores aos obtidos neste estudo, os dados aqui apresentados podem ser explicados conforme proposto por Reese et al. (1950). A baixa quantidade da atividade CMCásica pode ser justificada devido a ausência do fator C₁ nas espécies de *Trichoderma* estudadas.

De acordo com o modelo proposto por Reese et al. (1950) a atividade de C₁ estaria ligada às exoglicanases já que alguns microrganismos incapazes de sintetizar a celulose cristalina não sintetizam exoglicanases. Assim a ausência do fator C₁ possibilitaria determinados fungos de degradar somente formas derivadas de celulose como a carboximetilcelulose.

Assim, pode-se supor que as celulasas acionadas nas espécies de *Trichoderma* utilizadas neste estudo, estão ativando somente a endoglucanase e sem nenhuma ou pouca atividade de exoglicanase. Rabinovich et al. (2002) afirmaram que há pelo menos cinco diferentes endoglucanases e duas celobiohidrolases (exoglucanases) presentes no sistema de *T. reesei* e isto pode variar conforme a espécie.

Sabe-se que a degradação da celulose só ocorre de forma sinérgica entre os seus três componentes, porém esta degradação e o modo de ação de cada componente enzimático ainda não estão totalmente elucidados. Estudos detalhados de purificação, caracterização e mecanismos de degradação devem ser efetuados, a fim de elucidar este sinergismo, especialmente entre as espécies de *Trichoderma*.

5.6 Determinação da atividade de β -glucosidase

A tabela 6 apresenta os resultados obtidos para a dosagem de β -glucosidase e sua atividade específica em *Trichoderma* spp. utilizados neste estudo.

Tabela 6: Valores da dosagem da atividade de β -glucosidase (IU/mL) e sua atividade específica (U/mg de proteína) encontrados nos isolados de *Trichoderma*.

Código do isolado	Identificação	Atividade de β -glucosidase (IU/mL)	Atividade específica (U/mg de proteína)
1589b	<i>T. asperellum</i>	2,095583756	0,18049817
Vrc 2 2.2	<i>T. asperellum</i>	1,07248731	0,033641384
MPRE 5 2.2	<i>T. hamatum</i>	-0,162284264	-0,017774837
AnspC3 1.2c	<i>T. harzianum</i>	2,166142132	0,14765795
AnspR1 2.1	<i>T. harzianum</i>	3,189238579	0,247419595
MPCe 2 2.2 ^a	<i>T. harzianum</i>	5,941015228	0,357892484
MPCe 3 3.1	<i>T. harzianum</i>	10,45675127	0,63566877
F80	<i>T. koningii</i>	5,552944162	0,479528857
MPCe 10 3.2	<i>T. koningii</i>	7,810812183	0,448897252
MPRe 11 3.3	<i>T. koningiopsis</i>	8,728071066	1,575464091
MPGe 16 1.3b	<i>T. ovalisporum</i>	-0,021167513	-0,001597548
Vrc 2 3.2	<i>T. piluliferum</i>	9,715888325	0,660495467
MPRe 11 2.3	<i>T. viride</i>	-0,23284264	-0,02354324
1334	<i>Trichoderma sp.</i> *	0,119949239	0,022049492
1341	<i>Trichoderma sp.</i> *	0,825532995	0,04693195
1343	<i>Trichoderma sp.</i> *	5,694060914	0,566010031
1351	<i>Trichoderma sp.</i> *	6,540761421	0,371845447
1437	<i>Trichoderma sp.</i> *	0,57857868	0,073892552
INPA 36	<i>Trichoderma sp.</i> *	1,354720812	0,179671195
INPA 37	<i>Trichoderma sp.</i> *	1,39	0,130149813
INPA 43	<i>Trichoderma sp.</i> *	0,719695431	0,081783572
INPA 44	<i>Trichoderma sp.</i> *	0,754974619	0,092862807
INPA 45	<i>Trichoderma sp.</i> *	1,566395939	0,227013904
INPA 49	<i>Trichoderma sp.</i> *	1,70751269	0,204003906
INPA 51	<i>Trichoderma sp.</i> *	0,825532995	0,183451777
INPA 6	<i>Trichoderma sp.</i> *	1,284162437	0,133073828
Vrc 1 2.1	<i>Trichoderma sp.</i> *	0,119949239	0,022378589
Vrc 1 3.3b	<i>Trichoderma sp.</i> *	0,472741117	0,089028459
Vrc 2 1.3	<i>Trichoderma sp.</i> *	0,790253807	0,137674879
Vrc 2 2.2b	<i>Trichoderma sp.</i> *	-0,091725888	-0,007105026

* não identificados

A atividade de β -glucosidase está ligada ao complexo enzimático de degradação de materiais lignocelulósicos. A falta desta enzima compromete a ação de outras celulasas levando a um acúmulo de celobiose e inibindo a ação das celobiohidrolases (Kóvacs et al., 2009b). Geralmente a β -glucosidase de *Trichoderma* apresenta níveis muito baixos e a razão para esta baixa secreção é que a maior parte dessas enzimas

estaria fortemente ligada à parede celular do fungo durante o cultivo (Wang et al., 2009).

Os resultados apresentados mostraram atividade β -glucosidásica na grande maioria dos isolados sendo que os melhores produtores foram *T. harzianum* (10,45 IU/mL) e *T. piluliferum* (9,71 IU/mL). Kóvacs et al (2009b), utilizando a mesma metodologia obteve < 0,2 IU/mL para *T. reesei*, 4,9 IU/mL para uma linhagem selvagem e 7,1 IU/mL para uma linhagem mutante de *T. artroviride*. Os dados apresentados comprovam a eficácia da metodologia utilizada e indicam as espécies como boas produtoras de β -glucosidase.

Os relatos na literatura relacionados à produção de β -glucosidases por *Trichoderma* spp. são escassos. A grande maioria dos trabalhos está preocupada em decifrar os mecanismos de ação das celulasas de um modo geral. Atualmente, alguns autores tem seus estudos voltados para a produção desta enzima (Kóvacs et al., 2009a, b; Wang et al., 2009) uma vez que o custo e a eficiência das enzimas usadas na sacarificação de materiais lignocelulósicos são fatores críticos para o processo da conversão de biomassa em etanol.

Já é conhecido que as maiores produtoras de celulasas são as espécies de *Trichoderma*. Contudo, Macris (1984) com base em estudos voltados para a produção e caracterização de celulase e β -glucosidase, aponta o fungo *Alternaria alternata* Fr. Keissl. como potencial candidato para a produção de enzimas envolvidas na sacarificação da celulose com rendimento e propriedades que tornam o fungo passível de futuras investigações.

Kóvacs et al. (2009a) acreditam que novas enzimas, produzidas em substratos lignocelulósicos mais baratos por linhagens de *Trichoderma* com boa atividade enzimática de β -glucosidase ou preparados que contenham a β -glucosidase vinculada à

parede celular da célula, poderiam tornar os custos mais baratos na produção de bioetanol de segunda geração.

Neste trabalho, foi realizada pela primeira vez um estudo celulolítico dos fungos amazônicos, endófitos de plantas da região como *V. amazonica* e *Rollinia* sp. e ao que tudo indica, estes são promissores na produção de celulases, levando em consideração as condições de cultivos realizadas. Um estudo mais detalhado a cerca do sistema enzimático destes fungos deve ser realizado a fim de que venham a ser utilizados em escala industrial nos processos de produção de bioetanol, na hidrólise de biomassa vegetal e como agente de biocontrole de fitopatógenos.

6. CONCLUSÃO

O método de extração de DNA e o programa de termociclagem utilizados foram bastante eficazes na execução deste trabalho e, a partir de agora, servirão como padrão para futuros trabalhos com microrganismos. Dentre as espécies identificadas, destaca-se *T. piluliferum*, isolada pela primeira vez como endofítica de *V. amazônica*.

Todos os isolados estudados cresceram em foram capazes de produzir proteínas em meio contendo carboximetilcelulose. Os *Trichoderma* spp. utilizados neste estudo não foram capazes de produzir grandes quantidades de CMCase, contudo sua atividade β -glucosidásica obteve ótimo rendimento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANIO, A.; Brethon, B.; Chauvin, M. F.; Kerviler, E.; Leblaac, T.; Lacroix, C.; Baruchel, A.; Menotti, J. 2008. Invasive Pulmonary infection due to *Trichoderma longibrachiatum* mimicking invasive aspergillosis in a neutropenic patient successfully treated with voriconazole combined with caspofungin. *Clin. Infec. Dis.* 46, 116-118.

ALEXOPOULOS, C. J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. 1996. **Introductory Mycology**. 4.ed. New York: John Wiley e Sons, Inc, 869 p.

ÂNGELO, R.S. 2004. Enzimas hidrolíticas. In: Esposito, E.; Azevedo, J.L.[Orgs.] **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educ, p. 263-285.

AZEVEDO, J.L. e Costa, S.O.P. 1973. **Exercícios práticos de Genética**. São Paulo, Editora Nacional, 288p.

BELDMAN, G.; Searle-Van Leeuwen, M.F.; Rombouts, F.M.; Voragen, F.G.J. 1985. The cellulase of *Trichoderma viride*: Purification, characterization and comparison of all detectable endoglucanases, exoglucanases and P-glucosidases. **Eur. J. Biochem.** 46, 301 -308.

BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. 2000. **Biotechnol. Ad.** 18, 355-383.

BISSET J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma* II Infrageneric classification. **Can J. Bot.**, Ottawa, v-69, p.2357-2372.

BISSET J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma* III Section *Pachybasium*. **Can J. Bot.**, Ottawa, v-69, p.2373-2417.

BLUMENTHAL, C.Z. 2004. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. **Reg. Toxicol. and Pharmacol.** 39, 214-228.

BON, E.P.S.; Gírio, F.; Pereira Jr, N. 2008. Enzimas na produção de etanol. In: Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A.; Corvo, M.L. [Eds] **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda, p.241-272.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248-254.

BUSTO, M.D.; Ortega, N.; Perez-Mateos, M. 1996. Location, kinetics and stability of cellulases induced in *Trichoderma reesei* cultures. **Biores. Technol.** 57, 187-192.

CASTELLANI, 1939. A Viability of some pathogenic in fungi in distilled water. **J. Trop. Med. Hyg.** 42, 225-226.

COELHO, R.R.R. e Nascimento, R.P. 2008. Seleção de actinomicetos produtores de enzimas de interesse biotecnológico. In: Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A.; Corvo, M.L. [Eds] **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado.** Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda, p.71-94.

DATNOFF, L.E.; Nemeč, S.; Pernezny, K. 1995. Biological control of *Fusarium crown* and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. **Biol. Cont.** 5, 427-431.

DE MARCO, J.L.; Valadares-Inglis, M.C.; Felix, C.R. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom of cocoa. **Braz. J. of Microbiol.** 34: 33-38, 2003.

DE MIGUEL, D.T.; Gómez P.; González, R.; García-Suaréz, J.; Cuadros, J.A.; Bañas, M.H.; Romanyk, J.; Burgaleta C. 2005. Nonfatal pulmonary *Trichoderma viride* infection in an adult patient with acute myeloid leukemia: report of one case and review of the literature. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 53, 33-37.

DEMAIN, A.L. 2000. Microbial biotechnology. **Tibtech** 18, 26-31.

DHINGRA, O. D.; Sinclair, J. B. 1995. **Basic plant pathology methods.** 2^a ed., CRC Lewis Publishers, Boca Raton 434pp.

DILLON, A.J.P. 2004. Celulases. In: Said, S. e Pietro, R.C.L.R [Eds]. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos.** Ribeirão Preto, Editora Legis Summa, p 243-269.

DIN, N.; Damude, H.G.; Gilkes, N.R.; Miller Jr, R.C.; Warren, R.A.J.; Kilburn, D.G. 1994. C₁-C_x revisited: intramolecular synergism in a cellulose. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 91, 11383-11387.

EVANS, E.T.; Wales, D.S.; Bratt, R.P., Sagar, B.F. 1992. Investigation of an endoglucanase essential for the action of the cellulose system of *Trichoderma reesei* on crystalline cellulose. **J. Gen. Microbiol.** 138, 1639-1646.

FIGUEIREDO, M.B. 1967. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. **O Biolog.** 33.

FUNGARO, M.H.P. 2000. PCR na Micologia. **Biotechnol. Cien. e Desenv.** 3, 12-16.

FURUKAWA, H.; Kusne, S.; Sutton, D. A.; Manez, R.; Carrau, R.; Nichols, L.; Abu-Elmagd, K.; Skedros, D.; Todo, S.; Rinaldi, M. G. 1998. Acute invasive sinusitis due to *Trichoderma longibrachiatum* in a liver and small bowel transplant recipient. **Clin. Infect. Dis.** 26:487-489.

GHOSE, T.K. 1987. Measurement of cellulose activities. **Pure e Appl. Chem.** 59, 257-268.

GOKUL, B.; Lee, J.H.; Song, K.B.; Rhee, S.K; Kim, C.H; Panda, T. 2000. Characterization and applications of chitinases from *Trichoderma harzianum* – A review. **Biop. Eng.** 23, 691-694.

GONÇALVES, R.C.; Alfenas, A.C.; Mafia, R.G. 2007. Armazenamento de Microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: Alfenas, A.C.; Mafia, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. UFV. Viçosa. p. 92-102.

GUARRO, J.; Gené, J.; Stchigel, M. 1999. Developments in Fungal Taxonomy. **Clin. Microbiol. Rev.** 12, 454-500.

HANADA, R.E. 2006. **Controle de *phytophthora palmivora*, agente causal da podridão parda dos frutos de cacauero com fungos endofíticos**. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 101p.

HANADA, R.E.; Pomella, A.W.V.; Soberanis, W.; Loguercio, L.L.; Pereira, J.O. 2009. Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* against the Black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. **Biol. Cont.** 50, 143-149.

HARMAN, G.E.;Howell C. R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito M. 2004. *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Rev. Microbiol.** 2, 43-56.

HOWARD, D.H. 1956. The preservation of bacteria by freezing in glycerol broth. **J. Bacteriol.** 71, 625.

HOWELL, C.R. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. **Plant Dis.** 87, 4-10.

JUHÁSZ, T.; Szengyel, Z.; Szijártó, N.; Réczey, K. 2004. Effect of pH on cellulose production of *Trichoderma reesei* RUT C30. **Appl. Biochem. and Biotechnol.** 113/116, 201-211.

KÓVACS, K.; Szakacs, G.; Zacchi, G. 2009 a. Enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce using crude *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride* enzymes. **Process Biochem.** DOI 10.1016/j.procbio.2009.07.006.

KÓVACS, K.; Szakacs, G.; Zacchi, G. 2009 b. Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride*. **Biores. Technol.** 100, 1350-1357.

KULLNIG, C.; Szakacs, G.; Kubicek, C.P. 2000. Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. **Mycol. Res.** 104, 1117-1125.

LIECKFELDT, E.; Kullnig, C.M.; Kubicek, C.P.; Samuels, G.J.; Börner, T. 2001. *Trichoderma aureoviride*: phylogenetic position and characterization. **Mycol. Res.** 105, 313-322.

LOGUERCIO, L.L.; Carvalho, A.C.; Niella, G.R.; Souza, J.T.; Pomella, A.W.V. 2009. Selection of *Trichoderma stromaticum* isolates for efficient biological control from witches' broom disease in cacao. **Biol. Cont.** DOI: 10.1016/j.biocontrol.2009.06.005.

LUCON, C.M.M.; Koike, C.M.; Ishikawa, A.I.; Patrício, F.R.A.; Harakava, R. 2009. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesq. Agropec. Bras.** 44, 225-232.

MACRIS, B.J. 1984. Production and characterization of cellulose and β -glucosidase from a mutant of *Alternaria alternata*. **App. and Envir. Microbiol.** 47, 560-565.

MAFIA, R. G.; Alfenas, A. C.; Maffia, L. A.; Ventura, G. M.; Sanfuentes, E. A. 2003. Encapsulamento de *Trichoderma inhamatum* para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* na propagação clonal de *Eucalyptus*. **Fitopatol. Bras.** 28, 101-105.

MANACHINI, P.L.; Fortina, M.G.; Parini, C. 1987. Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. **Biotechnol. Let.** 9, 219-224.

MARTINS, L.F.; Kolling, D.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P.; Ramos, L.P. 2008. Comparison of *Penicillium echinulatum* e *Trichoderma reesei* cellulase in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Biores. Technol.** 99, 1417–1424.

MOREIRA, C. G. 2006. **Avaliação da diversidade e biomassa de fungos associados a folhas em decomposição de *Tibouchina pulchra* Cogn submersas em reservatórios do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), São Paulo, SP.** Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente), Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.

OSPINA-GIRALDO, M. D.; Royse, D. J.; Chen, X.; Romaine, C. P. 1999. Molecular phylogenetic analyses of biological control strains of *Trichoderma harzianum* and other biotypes of *Trichoderma* spp. associated with mushroom green mold. **Phytop.** 89,308-313.

PANDEY, A.; Nigam, P.; Soccol, C.R.; Singh, D.; Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 31, 135-152.

PAPAVIZAS, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocadium*: biology, ecology and potential for biocontrol. **Ann. Rev. Phytopathol.** 23, 23-54.

PEERSON, 1974 apud Rifai, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycol. Pap.** 116, 1-56.

RABINOVICH, M.L.; Melnik, M.S.; Bolobova, A.V. 2002. Microbial Cellulases (Review). **Appl. Biochem. and Microbiol.** 38, 305–321.

RANQUE, S.; Garcia-Hermoso, D.; Michel-Nguyen, A.; Dumon, H. 2008. Isolation of *Trichoderma atroviride* from a liver transplant. **J. de Mycol. Méd.** 18, 234-236.

REESE, E.T.; SIU, R.G.H.; Levinson, H.S. 1950. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. **J. Bacteriol.** 59, 485-497.

RIFAI, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycol. Pap.** 116, 1-56.

RUEGGER, M.J.S.; Tauk-Tornisielo, S.M. 2004. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Rev. Brasil. Bot.** 27, 205-211.

SAMUELS, G.J. 2006. *Trichoderma*: systematic, the sexual state and ecology. **Phytopathol.** 96, 195-206.

- SCHICKLER, H.; Haran, S.; Oppenheim, A.; Chet, I. 1998. Induction of the *Trichoderma harzianum* chitinolytic system is triggered by the chitin monomer, *N*-acetylglucosamine. **Mycol. Res.** 102, 1224-1226.
- SHALINI, S.; Kotasthane, A.S. 2007. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. **Elect. J. of Envir. Agric. and Food Chem.** 6, 2272-2281.
- SILVA, L.A.O. 2006. **Produção, purificação e caracterização das xilanases de *Trichoderma inhamatum***. Tese (doutorado em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo.
- SINGH, S.K.; Sharma, V.P.; Sharma, S.R.; Kumar, S.; Tiwari, M. 2006. Molecular characterization of *Trichoderma* taxa causing green mould disease in edible mushrooms. **Cur. Sci.** 90, 427-431.
- SOUZA, A.Q.L. 2006. **Potencial genético e químico dos Endófitos de *Murraya paniculata* L. (Jack)**. Tese (doutorado em Ciências Biológicas), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo.143p
- VLAEV, S.D.; Djejeva, G.; Raykovska, V.; Schügerl, K. 1997. Cellulase production by *Trichoderma* sp. grown on corn fibre substrate. **Proc. Biochem.** 32, 561-565.
- WANG, Y.H.; Zhou, J.; Chu, J.; Zhang, S.L.; Zhuang, Y. 2009. Production and distribution of β -glucosidase in a mutant strain *Trichoderma viride* T 100-14. **New Biotech.** DOI:10.1016/j.nbt.2009.07.008
- WHITE, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, J.J., Sninsky, T.J., White, (Eds.) **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, p.315-22.
- WOOD, T.M.; McCrae, S.I. 1978. The cellulase of *Trichoderma koningii*: purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase. **Biochem. J.** 171,61-72.
- XIAO, Z.; Gao, P.; Qu, Y.; Wang, T. 2001. Cellulose-binding domain of endoglucanase III from *Trichoderma reesei* disrupting the structure of cellulose. **Biotechnol. Let.** 23, 711-715.
- YU, Z.; Qiao, M. Zhang, Y.; Zhang, K. 2007. Two new species of *Trichoderma* from Yunnan, China. **Ant. van Leeuw.** 92, 101-108.

ZAIA, D.A.M.; Zaia, C.T.B.V.; Lichtig, J. 1998. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Quim. Nov.** 21, 787-793.

ZHANG, C.; Druzhinina, I. S.; Kubicek, C. P.; Xu, T. 2005. [Trichoderma biodiversity in China: Evidence for a North to South distribution of species in East Asia](#). **FEMS Microbiol. Let.** 251, 251–257.