

## BIOPROSPECÇÃO DE TRICHODERMA SPP. COM POTENCIAL ENZIMÁTICO

MICHELE RODRIGUES FRANCISCO\*

MARGY A. ESPARZA MORA\*\*

JULIE G. CHACÓN-OROZCO\*\*\*

RICARDO HARAKAVA\*\*\*\*

MARCELO ELIAS FRAGA\*\*\*\*\*

---

O objetivo deste estudo foi identificar e selecionar o potencial enzimático de espécies do gênero *Trichoderma* spp., por conseguinte, as espécies de *Trichoderma* foram identificadas por caracterização morfológica (macro e microscopia) e por análise molecular, utilizando oligonucleotídeos iniciadores da região ITS1 e ITS4, gerando produtos de tamanho aproximado de 930pb. Os isolados estudados foram identificados como sendo: *T. atroviride*, *T. asperelloide*, *T. harzianum* e *T. longibrachiatum* por análise morfológica e confirmados por análise molecular. Nas análises enzimáticas foram realizados ensaios qualitativos com meios de cultura contendo leite desnatado para produção de peptidase; amido solúvel para amilase, carboximetilcelulose para celulase, pectina cítrica para pectinases e meio Pikovskaya para fitase. Sendo assim, os isolados apresentaram potencial enzimático negativo para as enzimas peptidase, celulase e pectinase e positivo para amilase em todos *Trichoderma* spp. e apenas uma cepa de *T. longibrachiatum* produziu a enzima fitase. Portanto, de acordo com as análises, os *Trichoderma* spp. poderiam ser utilizados em processos biotecnológicos que envolvam atividade enzimática amilolítica.

**PALAVRAS-CHAVE:** BIOTECNOLOGIA, TAXONOMIA, PCR, ITS, PRODUÇÃO DE ENZIMAS.

---

\*Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ, Brasil. (e-mail: mrfsonia@hotmail.com)

\*\*Mestre em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ, Brasil. (e-mail: maleja.esparza@gmail.com)

\*\*\*Mestre em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Instituto Biológico - São Paulo, SP, Brazil. (e-mail: jchaconorozco@gmail.com)

\*\*\*\*Doutor em Plant Pathology, Instituto Biológico, São Paulo, SP, Brazil. (e-mail: harakava@biologico.sp.gov)

\*\*\*\*\*Doutor em Ciências Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ, Brasil. (e-mail: fraga@ufrj.br)

## INTRODUÇÃO

Pesquisas são desenvolvidas no sentido de isolar e identificar quimicamente os produtos produzidos por micro-organismos. Portanto, os fungos, em especial, despertam grande interesse em diversos setores industriais, devido à capacidade de produzir substâncias de alto valor agregado que serão utilizadas em indústrias farmacêuticas, químicas e alimentícias (TAI; STEPHANOPOULOS, 2013).

No ano de 2014 e 2015, respectivamente, o mercado global de enzimas em aplicações industriais lucrou aproximadamente US\$ 4,6 bilhões e US\$ 4,9 bilhões e a perspectiva até 2021 é que lucre US\$ 6,3 bilhões, segundo a BCC Research – Market Forecasting (BCC Research, 2020). Além disso, o desenvolvimento de pesquisas sobre enzimas despertou em diversos segmentos industriais e comerciais a utilização de fungos filamentosos para produção de enzimas geralmente extracelulares (UENOJO e PASTORE, 2007).

No entanto, é necessário para que se obtenha sucesso na exploração do potencial de variedades de enzimas fúngicas industriais, conhecimento minucioso das características fisiológicas, bioquímicas e genéticas dos fungos filamentosos que estão sendo avaliados (BORTOLAZZO, 2011).

Portanto, a identificação do gênero *Trichoderma*, baseada apenas nas características morfológicas, tem se mostrado insatisfatória (DRUZHININA et al., 2006), pois acredita-se não ser suficiente para elucidar as divergências genéticas entre as espécies (CHAVERRI e SAMUELS, 2003). Desta forma, para a pesquisa de identificação outros tipos de métodos, tais como molecular, bioquímica e fisiológica, constituem-se ferramentas essenciais para uma identificação mais coerente (SIMÕES; SANTOS; LIMA, 2013).

O gênero *Trichoderma* é caracterizado como fungos filamentosos e cosmopolitas colonizadores do solo e possui diversas aplicações biotecnológicas por serem capazes de sintetizar enzimas hidrolíticas (PASHA et al., 2013).

Sendo assim, pesquisas se direcionam para seleção de novos fungos como fonte de novas enzimas, explorando assim o potencial biotecnológico da biodiversidade mundial (MACIEL, 2013). Dessa forma, esse estudo tem como objetivo ampliação de dados sobre a diversidade de fungos e uso em processos biotecnológicos com produtores de enzimas relevância.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 58 isolados de *Trichoderma* obtidos de diferentes substratos depositados na Coleção Científica do Laboratório de Biologia de Fungo do IV/UFRRJ. Os fungos encontravam-se conservados em tubos de ensaio contendo BDA, solo e água (Método Castellani) em geladeira com temperatura de 4° C.

Por conseguinte, os *Trichoderma spp.* foram identificados por características macroscópicas: cor da superfície e reverso da colônia no meio BDA, presença ou ausência de pigmentação e odor de forma subjetiva; em sequência, após o preparo de lâminas foi realizado estudo microscópico (microscópio óptico, modelo OLYMPUS CH30 PM-PBK-3), onde observou-se: diâmetro e forma dos conídios, diâmetro dos clamidoporos, comprimento e largura das fiálides, após incubação em BOD a 25 °C por 7 dias (SAMUELS et al., 2015). Utilizou-se a chave interativa de Samuels et al. (2015) para identificar todas as espécies por características morfológicas, e concluiu-se que havia 4 espécies (*T. atroviride*; *T. asperelloide*; *T. harzianum*; *T. longibrachiatum*). Os 58 isolados foram agrupados nestas 4 espécies encontradas. Dentre as 4 espécies encontradas na análise morfológica, foram escolhidos 11 isolados de *Trichoderma spp.* de forma aleatória para serem realizadas as análises moleculares e confirmar as espécies encontradas.

Então, para auxiliar e confirmar os estudos morfológicos, aplicou-se a análise molecular utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (VARGA et al., 2011). Estas análises foram

realizadas em parceria com o Laboratório de Fitopatologia e Biologia Molecular no Instituto Biológico, São Paulo. Seguindo as seguintes etapas: Extração de DNA através do método CTAB (DOYLE, DOYLE, 1987); reação em cadeia de polimerase (PCR), para a amplificação de fragmento da região Internal Transcribed Spacers (ITS), utilizando-se um par de primers universais, ITS1 (5'-CAAAATGGGTAAGGAGGASAAGAC-3') e ITS4 (5'- CAGTACCGGCRGCRATRATSAG-3'), gerando produtos de tamanho aproximado de 930pb (WHITE et al., 1990; SHOUKOUHI; BISSETT, 2008). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC100 (MJ Research). Para o processo de sequenciamento dos fragmentos amplificados, as condições de amplificação foram: uma etapa de pré-desnaturação a 94 °C por 2 min, 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 seg, anelamento 56 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 4 min. Os produtos de PCR foram purificados por precipitação com polietilenoglicol, segundo protocolo descrito por Schmitz e Riesner (2006). O sequenciamento foi realizado pelo método de terminação de cadeia com o reagente BigDye 3.1 (Applied Biosystems) e sequenciador automático ABI3500 (Applied Biosystems). Após o sequenciamento, construiu-se a árvore filogenética com sequências similares das regiões ITS1 e ITS4 dos isolados e sequências de diferentes espécies de fungos obtidas no GENBANK/NCBI, através do método de Maximum Likelihood (ML). Para avaliar a robustez da topologia, a árvore foi avaliada pelo método de Jukes-Cantor com 1000 repetições de bootstrap, e a análise filogenética foi conduzida no programa Molecular Análise Genética Evolutiva-MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2011).

Em continuidade, todos os 11 isolados foram inoculados em placas de Petri e incubados em BOD a 25 °C por um período de 5 dias, em meio de cultura específico, em triplicata. Foram considerados fungos produtores de enzimas, aqueles que apresentassem a formação de halo de degradação ao redor da colônia como proposto por Stamford et al. (1998).

A atividade da celulase foi avaliada através do meio sintético contendo carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono de acordo com Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004). Após o período de incubação, a revelação do halo de hidrólise foi realizada adicionando-se 10 mL da solução corante de vermelho congo ( $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  em tampão Tris HCL 0,1 M, pH 8) sobre cada colônia, após 30min, a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão, por 15min. A formação de um halo amarelo ao redor da colônia fúngica indicava que havia a degradação da carboximetilcelulose (POINTING, 1999).

A atividade da amilase e da pectinase foi detectada de acordo com **Hankin e Anagnostakis (1975)**. A atividade amilolítica foi verificada após a adição de 5 mL de uma solução de iodo sobre cada colônia fúngica. A formação de uma zona amarelada ao redor da colônia fúngica e o desenvolvimento da coloração azul escuro na superfície restante da placa de Petri indicava que havia ocorrido a hidrólise do amido. A atividade pectinolítica foi detectada após a adição da solução de ácido clorídrico (HCL) 5 N, durante 5min. A degradação da peptidase foi verificada de acordo com **Gopinath et al. (2005)**. Já para a avaliação da capacidade de produção da fitase foi utilizado o meio **Pikovskaya (PIKOVSKAYA, 1948)**. O halo indicativo da produção das enzimas peptidase e fitase pode ser visto sem solução reveladora, com a detecção de uma zona clara ao redor das colônias fúngicas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 58 isolados de *Trichoderma spp.* foram identificados de acordo com características morfológicas (macro e microscopia) e dividido em 12 grupos. O Grupo I: representado por 18 isolados (31%); Grupo II: 6 isolados (10%); Grupo III: 14 isolados (24%); Grupo IV: 4 isolados (7%); Grupo V: 2 isolados (3%); Grupo VI: 1 isolado (2%); Grupo VII: 1 isolado (2%); Grupo VIII: 2 isolados (3%); Grupo IX: 1 isolado (2%); Grupo X: 3 isolados (5%); Grupo XI: 4 isolados (7%); Grupo XII: 2 isolados (3%). Após observações das características, de acordo com a chave interativa Samuels et al. (2015), foram identificadas 4 espécies: Grupo I = *Trichoderma atroviride*, Grupo II, X e XI = *Trichoderma asperelloide*, Grupo III, V, VI e XII = *Trichoderma harzianum* e Grupo IV, VII, VIII e IX = *Trichoderma longibrachiatum* (Tabela 1).

**TABELA 1. CARACTERÍSTICAS MACRO E MICROSCÓPICAS DOS ISOLADOS DE *TRICHODERMA* A 25 °C EM BDA E MÉDIAS DAS DIMENSÕES DO CRESCIMENTO E ESTRUTURAS MORFOLÓGICAS.**

Grupos	Macroscópica		Microscopia (µm)			
	Colônia		Fiálide		Conídio	Clamidósforo
	Cor Verso/Reverso	Cresc. (cm)	Larg.	Comp.	Comp. x Larg.	Diâmetro
I	Verde-claro à levemente amarelado	8,5	2.6	8.0	3.5-4.0 x 3.2-3.5	7.0
II	Amarelo-claro no centro e nas bordas verde-escuro	8,5	2.3	8.5	3.5-4.1 x 2.9-3.3	Ausente
III	Branco no centro e verde-claro a mais escura nas bordas	9,5	2.3	7.5	2.38-3.5 x 3.0-3.7	7.2
IV	Verde-claro e amarelo-claro	8	6.0	8.5	4.3-4.6 x 2.1-2.4	Ausente
V	Branco no centro e verde-claro a mais escura nas bordas	8,5	1.9	6.7	2.2-3.5 x 2.0-2.7	Ausente
VI	Verde-claro e levemente amarelado nas bordas	10	2.0	6.5	3.1-4.0 x 2.7-3.0	Ausente
VII	Amarelo-claro e levemente verde-claro nas bordas	9,5	5.7	7.3	3.7-5.0 x 2.2-2.9	Ausente
VIII	Branco e levemente verde-claro a amarelo-claro nas bordas	10	6.5	10.2	4.0-4.8 x 2.0-2.5	Ausente
IX	Amarelo-claro e levemente verde-claro nas bordas	6	8.5	10.0	3.6-5.8 x 2.3-3.0	Ausente
X	Verde-claro a verde mais escura nas bordas	9,5	1.8	8.7	3.4-3.9 x 3.1-3.5	Ausente
XI	Verde-claro a verde mais escura nas bordas	10	2.4	9.7	3.7-4.3 x 3.2-3.7	9.0
XII	Levemente amarelado no centro e verde-claro a mais escura nas bordas	10	2.8	7.3	3.0-4.0 x 2.0-3.2	Ausente

Cresc. – Crescimento, Comp. – Comprimento, Larg. – Largura.

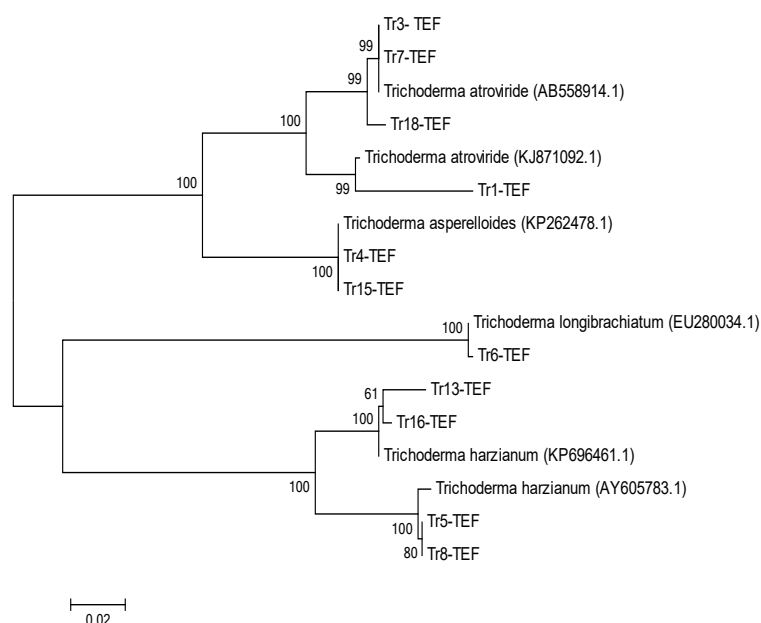
Menezes et al. (2010) utilizaram a região do ITS para identificar três isolados de *Trichoderma spp.* com extração do DNA a partir do micélio, assim como apresentamos neste

estudo. Colonia e Chagas Junior (2014) identificaram, por meio do sequenciamento da região ITS, cepas de *Trichoderma spp.* isolados do fertilizante Trichoplus JCO. Os autores utilizaram a extração do DNA de acordo com a metodologia de CTAB e as amplificações geraram bandas exatamente iguais às encontradas neste trabalho com 930 pb, identificando também fungos *T. asperelloide*, *T. harzianum*; *T. longibrachiatum*. As sequências ITS1 e ITS4 do DNAr foram comparadas com as sequências de *Trichoderma atroviride* (n. AB558914.1) e (n. KJ871092.1); *Trichoderma asperelloides* (n. KP262478.1); *Trichoderma longibrachiatum* (n. EU280034.1) e *Trichoderma harzianum* (n. KP696461.1) e (n. AY605783.1), depositadas na base de dados do GenBank (Figura 1). Onde as linhagens *T. atroviride* agruparam com a sequência de uma linhagem da mesma espécie apresentada no banco de dados, entre 99-100% de similaridade. Já com relação às linhagens *T. asperelloides* e *T. longibrachiatum*, com 100% de similaridade e *T. harzianum*, com similaridade entre 61-100%. Desta forma, como mostra a figura 1, os isolados de *Trichoderma* deste estudo foram caracterizados com elevado grau de identidade molecular.

Sendo assim, o alinhamento e análise filogenética das sequências utilizadas mostraram agrupamentos que corroboram para a identificação taxonômica das espécies estudadas neste trabalho.

Já na avaliação dos estudos enzimáticos, dos 58 *Trichoderma spp.*, todos obtiveram resultados negativo para atividade da enzima peptidase, celulase e pectinase, pois, revelaram que os isolados não apresentaram o halo de degradação, porém tiveram um bom desenvolvimento no meio de cultura específico para peptidase e não se desenvolveram bem nos meios específicos para celulase e pectinase. Já o oposto aconteceu com estes isolados para a atividade da enzima amilase, onde o resultado foi positivo para todos os isolados, apresentando o halo de degradação e bom desenvolvimento no meio de cultura específico para amilase. Para a atividade da enzima fitase, todos os isolados obtiveram desenvolvimento expansivo, ocupando toda a placa de Petri, porém apenas um isolado de *T. longibrachiatum* obteve resultado positivo.

**FIGURA 1. ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSTRUÍDA PELO MÉTODO DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA, MOSTRANDO A RELAÇÃO ENTRE OS ONZE ISOLADOS DE *TRICHODERMA SPP.*, COM ESPÉCIES DE *TRICHODERMA SPP.* DEPOSITADAS NO GENBANK-NCBI. AS SEQUÊNCIAS UTILIZADAS SÃO DO GENE ALFA ELONGASE (TEF). TR = *TRICHODERMA*. BARRA DE ESCALA = 0,02 SUBSTITUIÇÕES POR POSIÇÃO.**



Segundo Qualhato (2013), a diferença de valores da atividade da peptidase pode estar relacionada com a composição da fonte indutora presente no meio de cultura. Em estudos com cinco espécies de *Trichoderma*, utilizando substrato azocaseína e micélio macerado de fitopatógenos como fonte de carbono, obteve-se resultados baixos em todos os tratamentos, ou seja, mesmo adotando uma metodologia diferenciada deste presente estudo, o resultado também não foi eficiente. Souza (2015) utilizou Ágar-Leite, o mesmo utilizado em nosso trabalho, para avaliar a produção de peptidase em fungos e da mesma forma não obtiveram resultado positivo, embora se tenha também observado o crescimento dos fungos.

Quanto à produção de amilase, Marques (2007) avaliou um complexo multienzimático produzido por fungos *Trichoderma harzianum*. A atividade amilolítica foi determinada utilizando uma mistura que também, assim como em nosso estudo, continha amido solúvel como substrato, porém, a leitura foi realizada utilizando espectrofotômetro, e se constatou que esta espécie de fungo possui potencial para a produção de amilase, assim como xinalase e celulase. Atmaja e Khairul (2013), avaliaram quantitativamente a atividade da enzima amilase, utilizando espectrofotômetro UV-visível (faixa 400-600 nm) envolvendo a maltose com reagentes DNS (ácido dinitrosalicílico). Foi observado que a alfa-amilase pode ser produzida por *Trichoderma viride* utilizando meios de fermentação com a presença de amilose como fonte de carbono.

Para a avaliação do potencial de produção da enzima celulase, embora não tenha encontrado resultado satisfatório para a atividade desta enzima, atualmente alguns autores descrevem fungos do gênero *Trichoderma* como bons produtores de enzimas do complexo celulolítico utilizando distintas metodologias (CASTRO e PEREIRA JR, 2010; BASSO et al., 2010; MAEDA et al., 2011; GERHARDT et al., 2015). Oitenta linhagens de fungos foram caracterizadas de acordo com atividade da celulase utilizando o papel de filtro (FPase) e CMC como fonte de carbono utilizado para crescimento e produção da enzima, sendo esta última a mesma utilizada neste trabalho. Entre os fungos estudados pelos autores estão algumas espécies de *Trichoderma*, tais como: (*T. harzianum*, *T. inhamatum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. pseudokoningii* e *T. viride*), onde algumas destas colônias, mesmo com pouco crescimento, puderam apresentar maiores índices enzimáticos. Concluiu-se que o índice enzimático não foi um bom parâmetro para avaliar a atividade enzimática das linhagens (RUEGGER e TAUKE-TORNISIELO, 2004). O pouco desenvolvimento dos isolados foram observados e algumas espécies de *Trichoderma* também não produziram o halo de degradação, como os resultados obtidos em nosso estudo.

Anisa e Girish (2014), isolaram o fungo *Trichoderma viride* a partir de resíduos agrícolas e estrume em meio de cultura Ágar-pectina, igual ao adotado neste estudo, para a avaliação da sua capacidade de produzir enzimas pectinolíticas. Porém, a forma de determinação da enzima foi diferente, onde os autores utilizaram uma solução de iodeto de potássio sobre as culturas, e observaram a presença de zonas claras que indicava a capacidade pectinolítica dos fungos. Este estudo foi bem sucedido em isolar e identificar este fungo como um bom produtor de enzimas pectinolíticas e novos estudos podem ajudar na produção desta enzima em larga escala.

Já na avaliação da produção de fitase, Castro e Pereira Jr (2010), no estudo dos isolados fúngicos, também não observaram a visualização do halo de degradação. No entanto, a dificuldade na visualização no halo de degradação pode ter ocorrido pelo crescimento expansivo da colônia, visto que após o período de incubação a colônia estava ocupando toda a placa de Petri. No presente trabalho, também foi observado que os fungos tiveram um crescimento expansivo, ocupando desta forma toda a placa. Portanto, a não visualização do halo de degradação pode estar relacionada a este crescimento expansivo.

Cunha et al. (2015), avaliaram a produção de fitase por fungos isolados na região do Alto Paranaíba, no estado de Minas Gerais. Foram utilizados para estudos isolados de *Rhizopus sp.*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma sp.*, *Xylaria sp.* e *Fusarium sp.* A metodologia utilizada foi diferente da adotada neste trabalho, onde os autores utilizaram meio de cultura líquido composto por infusão de batata; sacarose; peptona; Tween 20 e CaCl<sub>2</sub>, com pH ajustado para 5,5. A atividade enzimática



foi determinada no sobrenadante das culturas, medindo o fosfato inorgânico liberado. Porém, dentre estes isolados, os *Trichoderma sp.* também não apresentaram atividade enzimática significativa para fitase.

## CONCLUSÃO

O estudo mostrou que dentre os 58 isolados de fungos que tínhamos inicialmente, após as análises morfológica e molecular, foi possível identificar 4 espécies, sendo estas, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma asperelloide*, *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma longibrachiatum*. Já as análises enzimáticas apontaram que todos os *Trichoderma spp.* apresentam resultados negativo para produção de peptidase, celulase, pectinase e resultado positivo para produção de amilase. E apenas um dos isolados, identificado como *Trichoderma longibrachiatum*, apresentou resultado positivo para produção de fitase, porém este resultado não foi significativo. Sendo assim, todos os *Trichoderma spp.* testados poderiam ser utilizados em processos biotecnológicos que envolvam apenas atividade enzimática amilolítica.

## ABSTRACT

### BIOPROSPECTING OF TRICHODERMA SPP. WITH ENZYMATIC POTENTIAL

The objective of this study was to identify and select the enzymatic potential of species of the genus *Trichoderma spp.*. Therefore, the species of *Trichoderma* were identified by morphological characterization (macro and microscopy) and by molecular analysis, using oligonucleotides initiators from the ITS1 and ITS4 region, generating products with an approximate size of 930bp. The studied isolates were identified as *T. atroviride*, *T. asperelloide*, *T. harzianum* and *T. longibrachiatum* by morphological analysis and confirmed by molecular analysis. In the enzymatic analyzes, qualitative tests were carried out with culture media containing skimmed milk for the production of peptidase; soluble starch for amylase, carboxymethylcellulose for cellulase, citrus pectin for pectinases and Pikovskaya medium for phytase. Thus, the isolates showed negative enzymatic potential for peptidase, cellulase and pectinase enzymes and positive for amylase in all *Trichoderma spp.* and only one strain of *T. longibrachiatum* produced the enzyme phytase. Therefore, according to the analyzes, *Trichoderma spp.* could be used in biotechnological processes involving amylolytic enzyme activity.

**KEYWORDS:** BIOTECHNOLOGY, TAXONOMY, PCR, ITS, ENZYME PRODUCTION.

## REFERÊNCIAS

1. ANISA, S.K.; GIRISH, K. Pectinolytic Activity of *Rhizopus sp.*, and *Trichoderma viride*. **International J. of Research in Pure and Applied Microbiology**, v.4, n.2, p.28-31, 2014.
2. ATMAJA, D.S.; KHAIRUL, W. Isolasi, purifikasi dan karakterisasi  $\alpha$  – amilase dari *Trichoderma viride* FNCC 6013. **Chemical Information**, v.1, n.1, p.85-93, 2013.
3. BASSO, T.P.; GALLO, C.R.; BASSO, L.C. Atividade celulolítica de fungos filamentosos isolados de bagaço de cana de açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.11, p.1282-1289, 2010.
4. BCC RESEARCH – MARKET FORECASTING. **Global Markets for Enzymes in Industrial Applications**. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-report-bio030j.html>>. Acesso em: 30/03/2020.
5. BORTOLAZZO, N.G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP, Piracicaba, 2011.
6. CASTRO, A.M.; PEREIRA, N.J. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.33, n.1, p.181-188, 2010.
7. CHAVERRI, P.; SAMUELS, G.J. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. **Studies in Mycology**, v.48, p.101-119, 2003.
8. COLONIA, B.S.O.; CHAGAS JUNIOR, A.F. Screening and detection of extra cellular celulases (Endo – and Exo-glucanases) secreted by filamentous fungi isolated from soils using rapid tests with chromogenic dyes. **African Journal**

- of **Biotechnology**, v.13, n.52, p.4694-4701, 2014.
9. CUNHA, M.C.; MONTEIRO, P.S.; MENDES, F.Q. Caracterização bioquímica de fitases produzidas por fungos isolados na região do Alto Paranaíba em Minas Gerais. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v.3, p.61-69, 2015.
  10. DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.
  11. DRUZHININA, I. S.; KOPCHINSKIY, A. G.; KUBICEK, C. P. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. **Mycoscience**, v.47, p.55-64, 2006.
  12. GERHARDT, J.A.; CARVALHO, I.F.; SILVA, M.L.; POLIZELI, M.L.T. M.; ALNOCH, R.C. Avaliação da atividade celulolítica de fungos filamentosos isolados de amostras de solo da região norte do estado de mato grosso. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v.11 n.21; p.1971-1981, 2015.
  13. GOPINATH, S.C.B.; ANBU, P.; HILDA, A. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. **Mycoscience**, v.46, n.2, p.119-126, 2005.
  14. HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v.67, n.3, p.597-607, 1975.
  15. MACIEL, M.H.C. **Abordagem polifásica para identificação de linhagens de Aspergillus seção Nigri preservadas na micoteca URM e caracterização quanto a produção e purificação de poligalacturonases**. 2013. 151 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
  16. MAEDA, R.N.; SERPA, V.I.; ROCHA, V.A.L.; MESQUITA, R.A.A.; SANTA ANNA, L. M.M.; CASTRO, A.M. de; DRIEMEIER, C.E.; PEREIRA Jr,N.; POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v.46, p.1196-1201, 2011.
  17. MARQUES, S.F.F. **Biotecnologia enzimática: produção de complexo multienzimático de Trichoderma harzianum e sua aplicação na alimentação de frangos de corte**. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.
  18. MENEZES, J.P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z.I.; BLUME, E.; JUNGES, E.; MANZONI, C.G. Variabilidade Genética na Região ITS do rDNA DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.34, n.1, p.132-139, 2010.
  19. PASHA, K.M.; ANURADHA, P.; RAO, D.S. Screening of a pectinolytic fungal strain; *Aspergillus foetidus* MTCC 10367 for the production of multiple enzymes of industrial importance. **International J. of Pharma and Bio Sciences**, v.4, n.2, p.1205-1209, 2013.
  20. PIKOVSKAYA, R.J. Mobilization of phosphorous in soil in connection with vital activity of some microbial species. **Mikrobiologiya**, v.17, p.362-370, 1948.
  21. POINTING, S.B. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. **Fungal Diversity**, v.2, p.17-33, 1999.
  22. QUALHATO, T.F. **Avaliação do perfil enzimático e expressão gênica de cinco espécies de Trichoderma e potencial antagonístico contra Fusarium solani, Rhizoctonia solani e Sclerotinia sclerotiorum**. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
  23. RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.2, p.205-211, 2004.
  24. SAMUELS, G.J.; CHAVERRI, P.; FARR, D.F.; MCCRAY, E.B. *Trichoderma* Online, **Systematic Botany e Mycology Laboratory**, ARS, USDA. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>>. Acesso em: 02/09/2015.
  25. SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v.354, n.2, p.311-313, 2006.
  26. SHOUKOUHI, P.; BISSETT, J. Preferred primers for sequencing the 5' end of the translation elongation factor 1-alpha gene (eEF1a1). 2008. Disponível em: <<http://www.isth.info/methods>>. Acesso em 10/12/2014.
  27. SIMÕES, M.F.; SANTOS, C.; LIMA, N. Structural Diversity of *Aspergillus* Section *Nigri* Spores. **Microscopy Microanalysis**, v.19, p.1-8, 2013.
  28. SOUZA, P.M. **Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro**. 2015. 133 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
  29. STAMFORD, T.L.M.; ARAÚJO, J.M.; STAMFORD, N.P. Enzymatic Activity of microorganisms isolated from yam bean legume (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, p.382-385, 1998.
  30. TAI, M.; STEPHANOPOULOS, G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. **Metabolic Engineering**, v.15, p.1-9, 2013.
  31. TAMURA, K.; PETERSON D.; PETERSON N.; STECHER G.; NEI M.; KUMAR S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p. 2731-2739, 2011.
  32. UENOJO, M; PASTORE, G.M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v.30, n.2, p.388-394, 2007.
  33. VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; KOCSUBÉ, S.; BRANKOVICS, B.; TÓTH, B.; SZIGETI, G.; SAMSON, R. A. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 1-17, 2011.
  34. WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA, 1990. p. 315–322.