

 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ANÁLISE DO SECRETOMA DE ISOLADOS DO FUNGO *Trichoderma asperellum* (TR356) EM RESPOSTA AO FUNGO FITOPATOGÊNICO *Sclerotinia sclerotiorum***

AMANDA RAFAELA RODRIGUES

GOIÂNIA

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ANÁLISE DO SECRETOMA DE ISOLADOS DO FUNGO *Trichoderma asperellum* (TR356) EM RESPOSTA AO FUNGO FITOPATOGÊNICO *Sclerotinia sclerotiorum***

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás por Amanda Rafaela Rodrigues para obtenção do grau de mestre em Biologia. Área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

GOIÂNIA

2014

**ANÁLISE DO SECRETOMA DE ISOLADOS DO FUNGO *Trichoderma  
asperellum* (TR356) EM RESPOSTA AO FUNGO  
FITOPATOGÊNICO *Sclerotinia sclerotiorum***

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

Universidade Federal de Goiás

---

Prof. Dra. Valdirene Neves Monteiro

Universidade Estadual de Goiás

---

Prof. Dra. Kátia Flavia Fernandes

Universidade Federal de Goiás

## GRADECIMENTOS

Em outro tempo era muito mais fácil escrever, as palavras fluíam de forma tão natural que praticamente se formavam sozinhas.

Hoje enfrento tamanha dificuldade, mas percebo que não pelas linhas a escrever, mas sim pela diversidade de pessoas que preciso e desejo incluir nesses agradecimentos.

Quando olho para trás, me lembro o quanto meus dias eram vazios, e se hoje corro o risco de me faltarem linhas e palavras, é porque não os meus dias, mas sim meu mundo está repleto de pessoas que o tornaram tão colorido.

A Biologia me proporcionou algo que nunca havia sentido antes, a oportunidade de perceber que existem pessoas que realmente se importam com você, e que essas pessoas são incontáveis nos dedos, diferente de alguns anos atrás. Embora nesse momento a qualificação profissional seja o foco, o engratecimento pessoal se faz maior...

Portanto hoje, só me resta agradecer...

Antes de mais nada agradeço aos meus PAIS por serem a minha base nessa existência. Sem eles esse dia não se tornaria possível. Minha mãe NILCE e meu pai Mauro, muito obrigada por terem se privado de tantas coisas para que eu pudesse ter a oportunidade de hoje concluir o mestrado. Obrigada pelo amor incondicional e por pelo menos tentarem entender um pouco do que eu fazia, principalmente minha mãe, que lutava sofredamente contra o sono, e mesmo que movida pelos cochilos balançava a cabeça concordando ou se segurando para não cair... AMO MUITO VOCÊS...

Muito Obrigada Aline e Milena, minhas irmãs, uma o oposto da outra mas que me complementam, obrigada pelo simples fato de existirem...

Agradeço a Minha Tia Nilcéia (segunda mãe) e ao meu irmãozinho Brener, sei que até hoje não entendem nada do que eu faço, mas mesmo assim me apoiam e me defendem bravamente...

Obrigada aos amigos que fiz durante a graduação, principalmente a Bárbara e o Zé, que escutaram tantas lamúrias e reclamações em silêncio, muitas vezes segurando para não rir, ou me enforçar...

Agradeço imensamente a todos do Laboratório de Enzimologia que fizeram com que eu me sentisse em um verdadeiro lar. Muito Obrigada, Rogério, Pabline, Amanda Araújo, Kênia, Angel, Gabi e Val pela companhia super agradável. E Marcela, muito obrigada por ser tão companheira, e agora, de quem vamos gargalhar?

que passaram das paredes do laboratório. Andrei, sempre acnei que voce era insuportável, mas com o passar do tempo percebi o quanto é generoso, obrigada pela amizade. Vanessinha, obrigada por sempre me escutar, me aconselhar, sofrer junto e me fazer refletir, obrigada pela amizade sincera e verdadeira. Obrigada Alonsito e James, meus estrangeiros amados e preferidos por esse intercâmbio cultural, vocês me ensinam bastante. Ah, JP, meu amigo... Obrigada por ser meu companheiro de todas as horas, na alegria na tristeza, na saúde e na doença e dividindo o Candy Crush, com certeza sem você teria sido difícil chegar tão longe...

Obrigada Marcelo, por ser mais que um amigo, um orientador, um irmão... Obrigada por cada conselho e tentativas de me persuadir de algo... Obrigada por se estressar tanto tentando resolver meus problemas, escutando todos os meus dramas e desespero finalizando com uma simples e curta %chulapada+. Sem você não teria conhecido a Lorena, que mesmo sem saber, me ajudou muito com tanta calma e carinho...

Agradeço imensamente ao Professor Cirano, pela oportunidade de trabalhar no laboratório. Uma pessoa íntegra, justa e com um coração enorme ...

Não poderia esquecer, é claro, de agradecer aquele que torna os meus dias mais felizes. Fabyano, meu marido (que engraçado dizer isso). Muito obrigada por ser meu companheiro de todas as horas, meu amigo, meu confidente, meu %orientador+ (que raiva!)... Obrigada por estar ao meu lado quando mais preciso e carregar junto comigo (quando não carrega pra mim) toda carga que julgar pesada... Obrigada por me auxiliar e me ensinar, todos sabem a sua importância para que eu pudesse chegar até aqui (sabem também o quanto é chato e enjoado). Sem você me ensinando, explicando e ajudando, seria impossível conseguir este título... TE AMO!!

Agradeço ao pessoal da EMBRAPA/ CERNAGEN por ter permitido a realização dos experimentos...

Obrigada ao programa de Pós Graduação em Biologia/UFG e a todos os funcionários do ICB que me ajudaram sempre que precisei...

Finalizo agradecendo a Deus pelo dom da vida, por permitir que nesse existência eu cruzasse com pessoas tão legais que aceitaram colorir a minha vida.

MUITO OBRIGADA!!!



*Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

*+E o saldo final de tudo foi mais positivo que mil divãs...+*

*Tiê*

LISTA DE ABREVIATURAS .....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS .....	10
RESUMO.....	12
1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1. <i>Trichodema</i> spp.....	13
1.2. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	17
1.3. Proteômica de Fungos Filamentosos.....	19
1.4. Secretoma de Fungos Filamentosos.....	21
1.5. Espectrometria de Massas (MS).....	23
2. OBJETIVOS .....	25
2.1. Objetivo geral .....	25
2.2. Objetivos específicos .....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. Manutenção dos isolados .....	25
3.2. Produção de parede celular de <i>S. sclerotiorum</i> .....	25
3.3. Indução por discos de meio de cultura .....	26
3.4. Dosagem de proteínas totais .....	27
3.5. Preparo das amostras para construção dos mapas proteômicos em gel de poliacrilamida (1D). .....	27
3.6. Preparo das amostras de géis unidimensionais para análise por espectrometria de massas.....	27
3.6.1. Espectrometria de Massa por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF) .....	29
4. RESULTADOS .....	30
4.1. Quantificação de proteínas secretadas das diferentes induções de <i>T. asperellum</i> TR356 e <i>S.     sclerotiorum</i> .....	30
4.2. Caracterização dos perfis protéicos através de SDS-PAGE das diferentes induções de <i>T.     asperellum</i> TR356 e <i>S. sclerotiorum</i> . .....	31
4.3. Espectrometria de Massas (MS).....	33
5. DISCUSSÃO .....	45
CONCLUSÃO.....	51
PERSPECTIVAS .....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53



**PDF Complete**

*Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

.....	62
ANEXO 1. Espectros de MS por MALDI/TOF de bandas demarcadas na figura 5.....	63
ANEXO 2. Ampliação do espectro de massa por MALDI/TOF da banda T72h-2 evidenciando os demais espectros. ....	71
ANEXO 3. Artigo publicado na Biological Control.....	72
REFERENCES.....	84

ACB	Agente de Controle Biológico
m/z	Razão entre massa e carga
LC- MS/MS	Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
nm	Nanômetro
TFA	Ácido Trifluoroacético
TOF	Time-of-Flight
T72H	Indução com <i>Trichoderma asperellum</i> TR356 crescido em meio TLE por 72 horas
T+Ss	Indução com <i>Trichoderma asperellum</i> TR356 crescido em meio TLE juntamente com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por 72 horas
Ss4d	Indução com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> crescido em meio TLE por 4 dias
Ss72h	Indução com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> crescido em meio TLE por 7 dias (4 dias + 72h)
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
T+ P (Ss)	Indução com <i>Trichoderma asperellum</i> TR356 crescido em meio TLE com 0,5% (w/v) de parede celular de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
µg	Microgramas

Figura 1. Placa contendo o fungo <i>Trichoderma asperellum</i> TR356 crescido em meio de cultura MYG. ....	17
Figura 2. Placa contendo o fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> crescido em meio de cultura MYG. ....	19
Figura 3. Mapas de <i>Trichoderma asperellum</i> (A) e <i>Trichoderma harzianum</i> (B) contra parede celular de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . ....	23
Figura 4. Perfil proteico de indução de <i>T. asperellum</i> TR356 e <i>S. sclerotiorum</i> em diferentes períodos em meio TLE. ....	31
Figura 5. Perfil proteico das induções em meio TLE em diferentes condições.. ....	32
Figura 6. Espectro de massa por MALDI/TOF da banda T72h-2. ....	34
Figura 7. Espectro de massa por MALDI/TOF da banda T+Ss-1. ....	35
Figura 8. Espectro de massa por MALDI/TOF da banda T+Ss-2. ....	36
Figura 9. Sobreposições dos espectros de massa por MALDI/TOF de bandas excisadas de massas moleculares próximas em diferentes induções.. ....	38
Figura 10. Interpretação do espectro de massa referente ao íon $m/z$ 1580.2 de T72h-2 obtido por MALDI/TOF. ....	40
Figura 11. Interpretação do espectro de massa referente ao íon $m/z$ 1508.7 de T+Ss-1 obtido por MALDI/TOF. ....	41
Figura 12. Interpretação do espectro de massa referente ao íon $m/z$ 2393.8 de T+Ss . 2 obtidos por MALDI/TOF. ....	42
Figura 13. Interpretação do espectro de massa referente ao íon $m/z$ 2033.1 de T72h-2 obtido por MALDI/TOF. ....	43



**PDF**  
Complete

Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Tabela 1. Quantificação de proteínas das induções contendo <i>T. asperillum</i> TR356 e <i>S. sclerotiorum</i> crescidas em diferentes períodos em meio TLE sem glicose.....	30
Tabela 2. Informações adicionais das proteínas identificadas..	44

The genus *Trichoderma* is represented by non-pathogenic soil fungi that have been studied by act as biological control agents against fungal pathogens, such as *Sclerotinia sclerotiorum*, the fungus that causes white mold, besides that, reduce environment and human health risks by being able to replace agrochemicals. Proteomic strategies with MS techniques have been important tools in studies of patterns identification for protein expression in different growth conditions. This work aims to development new strategies that enable the detection and identification of proteins secreted by *Trichoderma asperellum* (TR356) and *Sclerotinia sclerotiorum* when inoculated together and separated. The results obtained by MALDI / TOF analysis allowed the identification of a -1.3--glucanosiltransferase and -1.2-D-mannosidase, demonstrating the possibility of proteins identification for better comprehension about interaction between these organisms. It was therefore possible to identify the proteins through strategies used, but further analysis are required in order to elucidate the function and interaction of proteins secreted by the fungus *Trichoderma asperellum* TR356 against *S. sclerotiorum*.

**Keywords:** *Trichoderma asperellum*, *S. sclerotiorum*, MALDI/TOF, secretome.

O gênero *Trichoderma* é representado por fungos de sol não patogênicos que são estudados por sua ação como agentes de controle biológico contra fungos fitopatógenos, como *Sclerotinia sclerotiorum*, o fungo causador do mofo branco. Os fungos *Trichoderma spp.* atuam como importantes agentes de controle biológico, diminuindo os riscos à saúde humana e ao meio ambiente por serem capazes de substituir os agroquímicos. Estratégias proteômicas juntamente com técnicas de MS são importantes ferramentas em estudos de padrão, identificação e expressão de proteínas em diferentes condições de crescimento. Levando em consideração a importância de tais estudos, o presente trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de novas estratégias que possibilitem a detecção e identificação de proteínas secretadas por *Trichoderma asperellum* (TR356) e *Sclerotinia sclerotiorum* quando inoculados juntos e/ou separados os dois organismos vivos. Os resultados obtidos através das análises por MALDI/TOF permitiram a identificação das proteínas, -1,3-glucanossiltransferase e -1,2-D-mannosidase, demonstrando a possibilidade de identificação para o entendimento futuro acerca da interação destes organismos. Foi possível, portanto, a identificação das proteínas através das estratégias utilizadas, porém serão necessárias futuras análises a fim de elucidar a interação e função das proteínas secretadas através do fungo *T. asperellum* TR356 sobre *S. sclerotiorum*.

Palavras-chave: *Trichoderma asperellum*, *S. sclerotiorum*, MALDI/TOF, secretoma

### 1.1. *Trichoderma* spp.

O gênero *Trichoderma* é representado por fungos de sol não patogênicos que vem sendo estudados por sua ação como agentes de controle biológico contra fungos fitopatogênicos, como *Sclerotinia sclerotiorum*, de fungo causador do mofo branco.

Este fungo é um dos principais agentes de controle biológico (ACBs) para fungos fitopatogênicos, detendo quase 50% do mercado (WHIPPS, 2001; HERAUX *et al.*, 2005), contribuindo na degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos que estão presentes em agroquímicos, fato devido a produção de um grande arsenal de hidrolases, peroxidases e outras enzimas líticas, sendo organismos resistentes às toxinas e produtos químicos naturais (AZCBN-AGUILAR & BAREA, 1997; KATAYAMA & MATSUMURA, 1991; LIMA, 2002), e economicamente importantes pela produção de enzimas industriais e antibióticos.

O gênero *Trichoderma* é natural do solo, havendo poucos relatos sobre ocorrência de doenças de plantas causadas por esse gênero, sendo a utilização desse organismo satisfatória no controle biológico (KUBICEK *et al.*, 2001; HARMAN, 2004). Alguns podem tolerar altas faixas de temperaturas (MCBEATH & ADELMA, 1991), porém a grande maioria vive e são consideradas mais efetivas em temperaturas entre 25°C a 40°C (HJELJORD *et al.*, 2001). São sensíveis a temperaturas acima de 40°C e pHs básicos (MELO, 1996) e presença de íons metálicos em alta concentração. (KÜÇÜK *et al.*, 2008).

Análises genômicas já demonstraram a capacidade do gênero em antagonizar, parasitar e matar fungos fitopatogênicos, sendo estes estudos importantes para uma melhor compreensão das interações deste gênero com outros organismos oportunistas, tais como animais e plantas (DRUZHININA *et al.*, 2011).

O banco de dados virtual GenBank (NCBI) classifica esse gênero como pertencente ao Domínio Eucaryota, Grupo Fungi/Metazoa, Reino Fungi, Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Sordariomycetes, Subclasse

oocreales, %Família+ Hypocreales mitospóricos (ou Família Hypocreacea, Gênero *Hypocrea* na forma teleomórfica). Essa classificação é baseada no Index Fungorum ([verwww.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org)) que é organizado por diferentes e renomadas instituições, sendo constantemente revisado e atualizado utilizado como uma fonte de referência bastante confiável.

Através de características morfológicas, a identificação como gênero tem sido relativamente fácil (KÜÇÜK & KIVANÇ, 2003), mas o conceito de espécie, tem sido problemático utilizando os métodos tradicionais (DRUZHININA & KUBICEK, 2005). Segundo CHET (1987), os isolados que são micoparasitas e utilizados no controle biológico de fitopatógenos eram geralmente classificados como pertencentes à espécie *Trichoderma harzianum*. Entretanto, LOPES *et al.*, (2012) com a finalidade de selecionar potenciais candidatos para o controle biológico comercial contra *S. sclerotiorum* demonstraram em estudo a existência de 24 isolados de solo Brasileiro com potencial antagonista que pertencem a 5 espécies diferentes. Geralmente a identificação de espécies de *Trichoderma* são realizadas baseando em técnicas morfológicas e moleculares. Porém, estudos demonstraram que ferramentas individuais não são suficientes para explicar a diversidade desse gênero (KUBICEK *et al.*, 2003 ;HOYOS - CARVAJAL *et al.*, 2009) bem como sua atuação no controle biológico, particularmente entre as espécies de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma asperellum*, sendo necessária utilização de ferramentas moleculares e bioquímicas para a taxonomia.

Nos últimos anos, a crescente preocupação da população com o meio ambiente e saúde, bem como a necessidade de desenvolvimento de métodos de controle mais eficientes, surgiu a busca por novas estratégias de controle de patógenos, nesse caso, o controle biológico (FRIGHETTO, 2000, HOWELL, 2002; VERMA *et al.*, 2007; SCHUSTER and SCHMOLL, 2010 ).

O potencial de *Trichoderma* para biocontrole foi reconhecido primeiramente em 1930. Desde então, o gênero tem sido estudado como um antagonista de fungos fitopatogênicos, diminuindo os riscos à saúde humana e ao meio ambiente por serem capazes de substituir os agroquímicos utilizados. Estes por sua vez, que são tóxicos e poluentes, causando grandes impactos negativos ao meio ambiente além de

produtores agrícolas e consumidores (PUNJA & UTKHEDE, 2003).

Segundo CHET *et al.*, 1997, controle biológico é ainda definido como a utilização de micro-organismos específicos, os quais interferem junto a organismos patogênicos e pragas causadoras de doenças, sendo uma ferramenta natural e uma alternativa ecológica para superar os problemas causados por métodos químicos para a proteção de plantas, reduzindo a densidade populacional ou o impacto causado por um organismo patogênico específico, tornando-o menos abundante ou menos prejudicial do que ele seria sem a presença do agente de controle biológico (ALABOUVETTE, 2006). Dos micro-organismos utilizados como antagonistas para o controle de fitopatógenos, 90% correspondem a diferentes isolados de *Trichoderma spp.* (BENÍTEZ *et al.*, 2004).

As espécies desse gênero, como *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma maghanense*, utilizam grande variedade de compostos como fonte de carbono e nitrogênio, sendo resistentes a inibidores produzidos por outros micro-organismos e tolerantes a diferentes tipos de fungicidas (KULLNING *et al.*, 2000).

Trabalhos de *Trichoderma spp.* atuando no controle biológico de *S. sclerotiorum* tem sido descritos na literatura demonstrando a capacidade de inibição do crescimento de *S. sclerotiorum* através da produção de enzimas hidrolíticas, penetração e micoparasitismo (ABDULLAH *et al.*, 2008).

A composição da parede celular do patógeno é uma característica importante na indução da produção dessas enzimas, como quitinases e  $\alpha$ -1,3-glucanases (HARAN *et al.*, 1996), sendo seus genes já bem caracterizados (KUBICEK *et al.*, 2001). Entretanto, a caracterização de proteínas produzidas por fungos deste gênero envolvidas nas vias de produção de antibióticos e nos mecanismos de indução de defesa em plantas ainda são relativamente pouco estudadas.

O papel de cada enzima do complexo enzimático de espécies de *Trichoderma* possui modo de ação diferenciado. Enzimas com diferentes modos de ação parecem ser requeridas para o máximo efeito antifúngico em diferentes patógenos (VITERBO

ação de peptídeos com atividade de antibióticos.

A ação sinérgica entre enzimas hidrolíticas e metabólitos secundários confere ao micoparasita um nível de antagonismo maior do que quando estes dois mecanismos agem separadamente (BENÍTEZ *et al.*, 2004).

O fungo *Trichoderma spp.* pode atuar através de diversos mecanismos de ação. Dentre os efeitos estão competição, predação, parasitismo, produção de metabólitos que inibem o crescimento do fitopatógeno além de todos os aspectos que produzem mudanças morfológicas e bioquímicas na planta hospedeira tais como tolerância ao stress, solubilização ou sequestro de nutrientes inorgânicos e indução de resistência a doenças causadas por fitopatógenos (VITERBO *et al.*, 2002). Apesar dos diferentes mecanismos de defesa, todos podem ocorrer ao mesmo tempo.

A habilidade do gênero *Trichoderma* em controlar fungos de solo varia, sendo possívelmelhoraraatuaçãodessesagentespelaseleçãodeisoladoscommaiorpotenciald antagonismo(ETHUR*et al.*,2008).

LOPES*et al.*,(2012), verificou correlação positiva entre a produção de metabólitos voláteis e potencial de antagonismo contra *S. sclerotiorum* em estudos realizados comisolados do gênero *Trichoderma*, demonstrando que isolados que possuem eficiência no antagonismotambém são ótimos produtores de metabólitos voláteis.

Com o elevado potencialpara utilização comoagentesdecontrolebiológicodedoençasdeplantas,trabalhoscomogêner *Trichoderma spp.*,quevisemoisolamento, caracterizaçãodasproteínassecretadaseseleçãodeisoladoscompotencialparautilizaçã oemprogramasdecontrolebiológicoaoataquedepatógenos,devemserestimuladospoise xistempoucosrelatosacercadainteraçãotentre *Trichodermaspp*,plantaepatógenoemníve lde expressãodeproteínas.

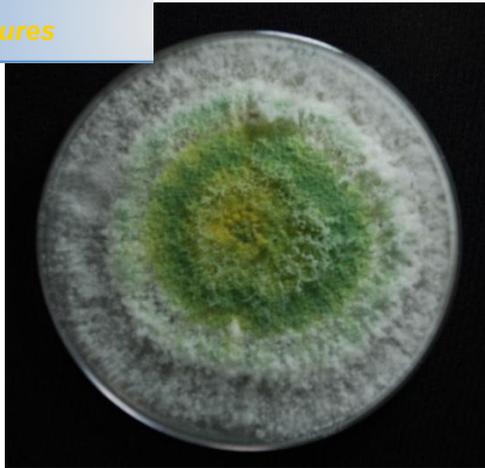


Figura 1. Placa contendo o fungo *Trichoderma asperellum* TR356 crescido em meio de cultura MYG.

## 1.2. *Sclerotinia sclerotiorum*

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é um fungo patógeno responsável pela diminuição da produção agrícola no Brasil, como culturas de morangos, feijão e tomates. Este fungo é conhecido como mofo branco, em função dos sintomas causados na planta e por apresentar estrutura morfológica de aspecto cotonoso com estruturas de resistência agregadas as hifas (escleródios). As plantas infectadas por este patógeno apresentam lesões em sua estrutura anatômica e morfológica e o fungo ataca toda parte aérea da planta, principalmente no início da floração ou após a polinização das flores. Nos órgãos infectados são encontradas lesões encharcadas, de coloração parda e consistência mole, com micélio branco de aspecto cotonoso, cobrindo os tecidos da planta. Com o progresso da doença, as folhas e caules infectados tornam-se marrons e permanecem eretos mesmo com a morte da planta.

O controle deste fungo é dificultado pela formação dos escleródios (estruturas negras e compactas), que são estruturas de resistência e podem sobreviver vários anos na ausência do hospedeiro, sendo elementos-chaves para o início da doença, uma vez que provocam o crescimento do apotécio que são a principal fonte do inóculo inicial (ascósporos) infectando plantas após a floração (ADAMS & AYERS, 1979; PURDY, 1979; SUN & YANG, 2000).

indicado para o controle deste fitopatógeno, porém, apresentam uma eficácia duvidosa por não possuírem capacidade de controlar a doença em períodos de alta infestação (VIEIRA *et al.*, 2001) além de causarem prejuízos a saúde humana e ao meio ambiente, sendo, uma alternativa para o manejo da doença a ação de antagonistas que parasitam escleródios e apotécios. A degradação dos escleródios por antagonistas de fungos e bactérias do solo é uma das maneiras mais eficazes de diminuir o banco de escleródios de *S. sclerotiorum* no solo (FERRAZ *et al.*, 2003), não se tendo verificado eficiência de fungicidas comumente utilizados no controle desta praga (BOLTON *et al.*, 2005; LEITE, 2006).

Muitas espécies antagônicas foram descritas como eficazes no controle de *S. sclerotiorum*. Dentre as espécies antagônicas relatadas o gênero *Trichoderma spp.* são amplamente estudados no biocontrole.

Entre muitos relatos de antagonistas contra *S. sclerotiorum*, o gênero *Trichoderma* apresenta várias espécies amplamente estudados no biocontrole de fitopatógenos (MENEZES *et al.*, 2007). Em geral, acredita-se que a maior frequência de espécies como *T. harzianum* e *T. asperellum* correlaciona negativamente com viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* em solos (FERRAZ *et al.*, 2011). Os escleródios consistem basicamente em uma casca de melanina e uma parte interna constituída por hidrocarbonetos, principalmente -1,3- glucanas e proteínas (LE TOURNEAU, 1979). -1,3- glucanases, quitinases e proteases são as enzimas largamente estudadas capazes de degradar a parede celular do patógeno por *Trichoderma*. Assim, espera-se que os antagonistas através do aumento da secreção de enzimas extracelulares, tais como quitinase, -1,3- glucanases e proteases sejam responsáveis, por sua vez, pelo declínio mais acentuado dos escleródios de *S. sclerotiorum* no solo (WOO *et al.*, 2006).

Estudos recentes demonstraram que N-acetil-glucosaminidases (NAGases), enzimas que participam do sistema quitinolítico, também são essenciais nos processos de micoparasitismo contra o mofo branco (GERALDINE *et al.*, 2013), salientando a importância dos estudos destas enzimas como marcadores bioquímicos sobre a busca de novos isolados de *Trichoderma spp.* potencialmente eficazes no controle de *S. sclerotiorum*.



Figura 2. Placa contendo o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* crescido em meio de cultura MYG.

### 1.3. Proteômica de Fungos Filamentosos

Os estudos das proteínas e dos genes das principais classes de enzimas envolvidas no micoparasitismo, ou mesmo genes de proteínas envolvidas nas vias de sinalização celular e de metabólitos secundários permitiram um maior conhecimento sobre as espécies de biocontrole (MASSART & JIJAKLI, 2007). Análises mais abrangentes como a proteômica, têm sido utilizadas entre diferentes espécies de *Trichoderma*, porém para quase todas ainda não existem genomas completos disponíveis para uma melhor interpretação dos resultados. Em sua grande maioria, tais técnicas, utilizam diferentes condições de crescimento para mostrar o arsenal genético destes fungos ao invés de estudar eventos individuais durante o micoparasitismo (CARPENTER *et al.*, 2005; LIU & YANG, 2005; VIZCAÍNO *et al.*, 2006; VIZCAÍNO *et al.*, 2007; SCHERM *et al.*, 2008). As proteínas geralmente são estudadas em uma escala global através da combinação sinérgica de tecnologias com bons resultados, incluindo eletroforese em gel de poliacrilamida uni e bidimensional (separação das proteínas por ponto isoelétrico e posteriormente, por massa molecular), espectrometria de massas, cromatografia líquida multidimensional e técnicas de bioinformática (CRAVATT *et al.*, 2007; PARDANANI *et al.*, 2002).

A eletroforese é um método de separação e identificação de proteínas na proteômica, pois possibilita a visualização de um grande número de proteínas

ntes isoformas (HAYNES *et al.*, 2000; LOW *et al.*, 2002). No entanto, a técnica apresenta ainda algumas limitações como reprodutibilidade e boa resolução de proteínas.

Existem métodos de análise proteômica mais sensíveis que a técnica de eletroforese, metodologias baseadas na separação de peptídeos por cromatografia líquida em nanocolunas de alta eficiência ligadas diretamente ao espectrometro de massas (DELAHUNT e YATES, 2005). Esta metodologia reduz o consumo de solventes, reagentes e material a ser analisado, melhorando o desempenho nas análises de amostras, nesse caso, de proteínas.

A proteômica, ainda, é definida como a análise do proteoma, que são as proteínas e suas isoformas expressas por um organismo em determinadas condições, permitindo quantificar e identificar o número de proteínas que influenciam diretamente a bioquímica celular, e prover uma análise do estado celular e mudanças que ocorrem durante o crescimento, desenvolvimento ou resposta a fatores ambientais. Mostra-se como uma tecnologia útil no estudo de sistemas biológicos dinâmicos e complexos (MENDONZA, 2009), fornecendo informações mais completas relacionadas a vias de sinalização, conjunto de proteínas reguladoras, modificações pós-traducionais e outras informações importantes em estados fisiológicos normais e anormais de células e/ou organismos através de técnicas capazes de identificação de um conjunto de proteínas produzidas por uma célula (ROCHA *et al.*, 2005).

As estratégias proteômicas têm sido usadas como uma ferramenta bastante importante nos estudos do padrão de expressão de proteínas sob diferentes condições de crescimento e interação entre *Trichoderma* spp. e fungos fitopatogênicos (GRINYER *et al.*, 2005; MARRA *et al.*, 2006). GRINYER (2004b) separou e identificou proteínas envolvidas no controle biológico a partir de uma cepa de *T. harzianum*, no qual foi analisado o sub-proteoma com o objetivo de mapear as proteínas da mitocôndria deste isolado, conseguindo uma eficiente extração das proteínas contidas na mitocôndria e a posterior separação por gel bidimensional (2 DE). Foram extraídas 196 bandas dos géis, sendo obtidas 31 spots com identificações positivas.

ERet *et al.*, (2004a) estudou pela primeira vez o proteoma intracelular do fungo através de um trabalho cujo o objetivo era separar o máximo possível de proteínas do micélio de um isolado de *T. harzianum* para a construção de um mapa protéico de referência. Foram usados em paralelo dois métodos para a identificação de proteínas (MALDI-TOF e LC-MS/MS) ocasionado pela falta de um genoma publicado de *T. harzianum* e escassez de informações disponíveis nas bases de dados.

O proteoma é dinâmico e podem ocorrer modificações pós-traducionais de acordo com estímulos internos ou externos, sendo reflexo das condições em que o organismo ou célula se encontram no momento (PANDEY & MANN, 2000; BHADAURIA *et al.*, 2007). A pesquisa em proteômica de fungos filamentosos restringe-se devido às dificuldades associadas à eficiente extração de proteínas e a falta de sequências genômicas dos fungos nas bases de dados. Portanto, os avanços nas técnicas de eletroforese e espectrometria de massas, acoplado com um aumento de proteínas nos bancos de dados permitiram aumentar o conhecimento sobre a expressão diferencial de proteínas de fungos com relevância biotecnológica em relação as variáveis ambientais (CARBERRY *et al.*, 2007).

#### 1.4. Secretoma de Fungos Filamentosos

O secretoma é considerado o conjunto de enzimas e demais proteínas secretadas por um determinado tipo celular ou por um conjunto de células, assim como a maquinaria responsável pela secreção destas proteínas (TJALSMA *et al.* 2000), considerado como uma fração do proteoma total, ou seja, um sub-proteoma.

Sabendo que os fungos filamentosos, como *Trichoderma spp*, secretam proteínas que são importantes para a nutrição dos mesmos foram realizados estudos que permitiram um maior conhecimento acerca desse arsenal protéico. YANG *et al.*, (2009) avaliou o secretoma de *T. harzianum* quando crescido na presença de parede celular de *Botrytis cinerea*. Atividades enzimáticas evidenciaram a secreção de algumas proteínas que degradam parede celular como quitinases, - 1,3(6)-glucanases, proteases. Dos géis obtidos a partir do estudo, 100 bandas foram

LC-MS/MS e 3 proteínas foram identificadas (l-aminoácido oxidase, endoquitinase, endoquitinase), sendo todas elas de espécies de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. hamatum* e *T. harzianum*, respectivamente).

Experimentos demonstraram através de análises proteômicas diferenças no perfil protéico das proteínas extracelulares secretadas quando crescidas em diferentes condições.

O secretoma tem sido abordado por pesquisadores do mundo inteiro, SAYKHEDKAR *et al.*, (2012), analisaram diferencialmente proteínas secretadas por *Aspergillus nidulans* utilizando para crescimento pó de palha de sorgo em um período de 1, 2, 3, 5, 7 e 14 dias em 1% de glicose em culturas cultivadas, onde foram identificados um total de 294 proteínas incluindo celulases, hemicelulases, pectinases, esterases, hidrocarbonetos, quitinases e muitas proteínas de função desconhecida. Outro estudo realizado com *Aspergillus flavus* utilizando diferentes fontes de carbono para crescimento (glicose, batata dextrose e rutina) demonstraram proteínas secretadas diferencialmente expressas, achando proteínas comuns aos três meios, duas únicas para o meio batata dextrose (BDA), 10 pra o meio contendo apenas glicose e 18 proteínas só para a degradação de rutina (MEDINA *et al.*, 2004).

As técnicas de eletroforeses são importantes justamente por demonstrarem as mudanças que ocorrem na secreção de proteínas como consequência de cultivos sob diferentes condições. Como observado por Medina (2004), diferentes substratos exercem influência sobre a secreção de proteínas.

Muitas proteínas secretadas merecem atenção pelo seu potencial na utilização industrial, estimulando pesquisas na área de genética e mecanismo de secreção de enzimas. As análises de secretoma de fungos filamentosos são indispensáveis para conhecer a identidade e função do arsenal de proteínas extracelulares que participam da degradação dos compostos de parede celular dos patógenos, visando uma aplicação biotecnológica (BOUWS *et al.*, 2008).

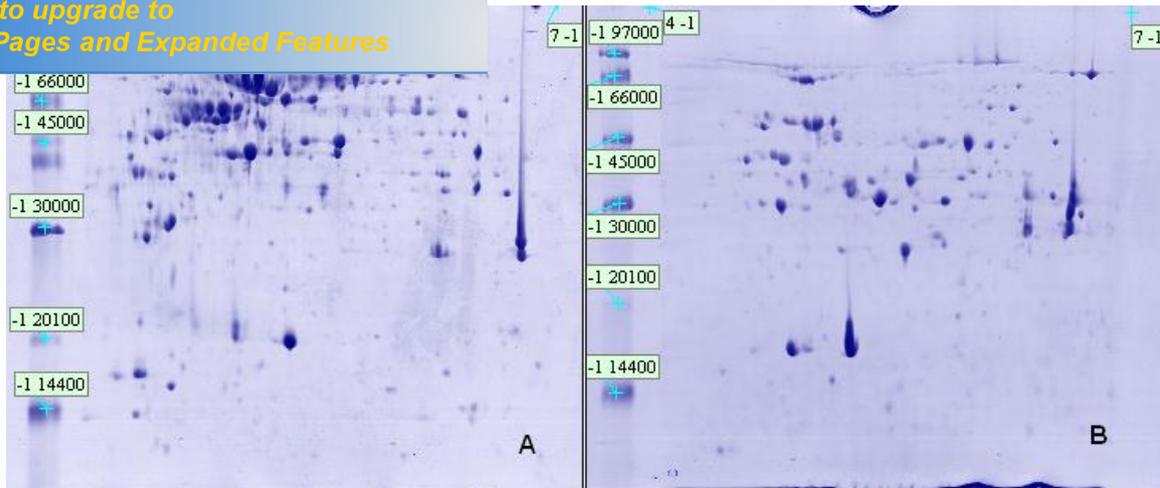


Figura 3. Exemplos de mapas de *Trichoderma asperellum* (A) e *Trichoderma harzianum* (B) contra parede celular de *Sclerotinia sclerotiorum* utilizados para se observar a variedade de proteínas secretadas através de técnicas de gel bidimensional (RODRIGUES, A.R).

### 1.5. Espectrometria de Massas (MS)

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica utilizada para análise, quantitativa e qualitativa, caracterização de peptídeos, proteínas e proteomas. Em particular, a cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (LC / MS / MS) fornece uma combinação potente de ferramentas para a análise de proteínas complexas ou proteoma de moléculas de diversas massas moleculares (BLACKBURN *et al.* 2010). É uma ferramenta analítica muito valiosa pela possibilidade de determinar a massa molecular e quantificar biomoléculas, tais como proteínas, carboidratos, lipídeos e oligonucleotídeos, além de fragmentá-las de forma a elucidar sua estrutura e confirmar sua identificação.

O potencial de aplicação da MS em estudos biológicos tem sido bastante estendido em razão dos impressionantes avanços observados nos últimos anos nas áreas de genômica, transcriptômica, metabolômica, proteômica, etc. (HOFFMANN & STROOTBART, 2007; FENG *et al.*, 2008).

Atualmente a MS é a técnica escolhida para identificação, de proteínas e estudos de modificações pós -traducionais em diferentes condições. Para análise por MS, as amostras podem ser inseridas diretamente no espectrômetro de massas, ou o equipamento pode ser acoplado a uma técnica de separação, podendo ser em fase gasosa, líquida ou eletroforese capilar.

geração de íon por um método de ionização apropriado. Em seguida, os íons são separados por meio de sua relação massa carga ( $m/z$ ) em um analisador de massas e detectados qualitativamente e ou quantitativamente por meio de um detector de íons. A magnitude do sinal elétrico em função da razão  $m/z$  é convertida por um processador de dados, o qual gera o espectro de massas correspondente (GROSS, 2004).

Para que as proteínas sejam analisadas, deve haver o tratamento necessário, remoção de contaminantes, digestão das proteínas a peptídeos (tripsinização). As proteínas são comparadas através das massas moleculares reais dos resultados obtidos no equipamento com massas teóricas, contrastadas com um banco de dados.

Através de técnicas de extração e separação de proteínas, combinadas com o avanço em espectrometria de massas (MS), foi permitido aumentar o conhecimento sobre a expressão diferencial de proteínas em fungos com potencial biotecnológico.

Atualmente, os avanços em espectrometria de massas permitem um melhor estudo acerca das proteínas e/ou centenas de proteínas presentes em uma mistura complexa. Neste contexto, a espectrometria de massas é analítica, identificando a composição química de um composto ou amostra (SPARKMAN, 2000), através da fragmentação de uma proteína em partículas carregadas (íons) e medições de carga e massas das partículas resultantes. Os avanços nas técnicas de espectrometria de massas, hoje, permitem relativamente fácil identificação de proteínas, particularmente para os organismos com genomas sequenciados (QUIRINO *et al.*, 2010).

Sabendo da importância dos fungos filamentosos no controle biológico, estudos estruturais comparativos estão em andamento visando um melhor entendimento das interações de espécies de *Trichoderma* fungos hospedeiros, bem como o entendimento da interação de espécies de *Trichoderma*/plantas hospedeiras/fitopatógeno (GRINYER *et al.*, 2005).

## 2.1. Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi desenvolver novas estratégias de estudos que possibilitem a detecção e identificação de proteínas secretadas por *Trichoderma asperellum* (TR356) e *Sclerotinia sclerotiorum* quando crescidos em diferentes condições.

## 2.2. Objetivos específicos

- Comparar perfis eletroforéticos provenientes dos secretomas das diferentes induções realizadas;
- Sequenciar peptídeos realizando a identificação das proteínas secretadas das diferentes induções utilizando técnicas de espectrometria de massas.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Manutenção dos isolados

Foram utilizados isolados de *Trichoderma asperellum* (TR356), e *Sclerotinia sclerotiorum* pertencentes a coleção da Embrapa Arroz e Feijão (CNPAF). Os fungos foram mantidos com repiques periódico em meio MYG [0,5% (p/v) de extrato de malte, 0,25% (p/v) de extrato de levedura, 1% (p/v) de glicose e 2% (p/v) de água] e estocados a 4°C.

### 3.2. Produção de parede celular de *S. sclerotiorum*

Para a produção de parede celular, discos de meio MYG,  $\pm$  4 mm, contendo micélio de *S. sclerotiorum* foram inoculados em frascos de 1L contendo 500 mL de meio MYG líquido [0,5% (p/v) de extrato de malte, 0,25% (p/v) de extrato de levedura, 1% (p/v) de glicose]. Os frascos foram incubados à temperatura de 28 °C a

micélio de cada frasco foi coletado por filtração, autoclavado, congelado a - 20 °C e liofilizado. Ao término da liofilização, os micélios foram macerados. Foi adicionado água destilada ao pó obtido, e as misturas foram agitadas e centrifugadas a 12000 g por 15 minutos, processo repetido até não haver mais quantidade de proteínas.

### 3.3. Indução por discos de meio de cultura

Discos de meio MYG,  $\pm 4$  mm, contendo *S. sclerotiorum* foram inoculados em frascos de 250 mL contendo 150 mL de meio TLE [Bactopetona 1,0 g l<sup>-1</sup>, Uréia 0,3 g l<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0 g l<sup>-1</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,4 g l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,3 g l<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,2 g l<sup>-1</sup>, 2% (v/v) de solução de elementos traços, pH 5,0]. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 28 °C e velocidade de 180 rpm por 4 dias. Após esse período foram inoculados 5 discos,  $\pm 4$  mm, de *T. asperellum* no meio contendo micélio de *S. sclerotiorum*. Foram adicionados discos contendo *S. sclerotiorum* nos períodos de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a introdução de *T. asperellum* no inóculo (T+Ss).

Após a escolha do melhor tempo de indução (72h) e intencionando a comparação do inóculo contendo os isolados de *T. asperellum* e *S. sclerotiorum*, foram realizados inóculos contendo os organismos separadamente. Para *S. sclerotiorum*, discos de meio MYG,  $\pm 4$  mm, foram inoculados em frascos de 250 mL contendo 150 mL de meio TLE. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 28 °C e velocidade de 180 rpm em dois tempos, 4 dias (Ss4d) e 7 dias (4 dias + 72h) (Ss72h). Para *T. asperellum*, discos de  $\pm 4$  mm, foram inoculados em frascos de 250 mL contendo 150 mL de meio TLE. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 28 °C e velocidade de 180 rpm por 72h (T72h). Também foram inoculados discos de meio MYG,  $\pm 4$  mm, de *T. asperellum* em 0,5% de parede celular de *S. sclerotiorum* em frascos de 250 mL contendo 150 mL de meio TLE (T+P(Ss)). Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 28 °C e velocidade de 180 rpm por 72h.

dos de todas as induções foram obtidos após filtração a vácuo, estes foram dialisados, centrifugados e congelados sendo utilizados posteriormente para análises de proteínas secretadas. Foram feitas duas réplicas técnicas e duas réplicas biológicas de todas as induções realizadas.

### **3.4. Dosagem de proteínas totais**

A concentração de proteínas foi determinada através do método descrito por BRADFORD (1976). Adicionou-se 100  $\mu$ L de amostra e 1 mL de reagente de Bradford incubado a temperatura ambiente por 15 minutos. A leitura foi feita no espectrofotômetro a 595 nm. As quantificações de proteínas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e submetidas ao teste de comparação de média Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) realizados no software SISVAR v.5.3 (FERREIRA, 2011).

### **3.5. Preparo das amostras para construção dos mapas proteômicos em gel de poliacrilamida (1D).**

A partir dos sobrenadantes das induções realizadas, 40  $\mu$ g de proteínas de cada amostra foram liofilizadas, dialisadas e precipitadas em TCA/Acetona para a eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional (1D) na presença de SDS (SDS-PAGE), utilizando a metodologia descrita por LAEMMLI (1970). A corrida ocorreu por um período de 3 horas a 110v. Após o término, o gel foi corado com Comassie Blue para a visualização das bandas e possível análise do perfil protéico. O perfil foi determinado levando em consideração apenas a massa molecular.

### **3.6. Preparo das amostras de géis unidimensionais para análise por espectrometria de massas.**

Para análise por espectrometria de massas, bandas foram excisadas dos géis unidimensionais. Estas bandas foram tratadas segundo SHEVCHENKO *et al.*, (1996; 2007) com algumas modificações. As bandas retiradas dos géis foram colocadas em tubos de 0,5 mL. Em seguida, 200  $\mu$ L de uma solução de bicarbonato de amônio 25

(v/v) foram adicionados, agitados em vórtex por 20 minutos e o sobrenadante descartado, procedimento realizado até os pedaços de géis ficarem totalmente transparentes. Após o descarte da solução de amônia e acetonitrila, 100 µl de acetonitrila foram adicionados às amostras e agitados em vórtex por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram completamente secas em uma Speed-Vaccum.

Foram adicionados 40 µl de uma solução 10 mM de DTT em bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 as amostras e as mesmas foram incubadas à 56 °C por 60 minutos. Após descartar o sobrenadante, 40 µl de Iodoacetamida 55 mM em bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 foram acrescentados as amostras, estas que foram incubadas a temperatura ambiente ao abrigo da luz. O sobrenadante foi retirado e 100 µl de tampão bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 foram adicionados a cada amostra e agitado em vórtex por 10 minutos. Após retirar o sobrenadante, 100 µl de bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 em acetonitrila 50% (v/v) foram adicionados e as amostras agitadas por 10 minutos em vórtex. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram completamente secas em uma Speed-Vaccum.

Foram adicionados as amostras, 15 µl de uma solução de tripsina Gold-Mass V582A (Promega) 10ng/µl em tampão bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 no gelo. Após 15 minutos, 40 µl de tampão bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 foram adicionados e as amostras foram incubadas à 37 °C por 16 horas. O sobrenadante da reação foi transferido para tubos novos de 0,5 mL. Aos pedaços de géis foram adicionados 50 µl de ácido trifluoroacético (TFA) 5% (v/v) em acetonitrila e agitado em vórtex por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para os tubos novos contendo o sobrenadante da etapa anterior. Esta etapa foi repetida novamente. As amostras foramsecadas totalmente em uma Speed-vaccum.

As amostras foram ressuspendidas em 20 µl de água miliQ e 3 µl foram transferidos para tubos novos de 0,5 mL contendo 9 µl de matriz [5 mg de ácido -4-ciano-hidroxicinamico em 500 µl de TFA 0,3% (v/v)/ acetonitrila 50% (v/v)]. Dessa mistura, 0,7 µl de cada amostra foram aplicadas em poços diferentes, em triplicata, de uma placa de MALDI (Bruker Daltonics).

### 3.6.1. Espectrometria de Massa por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF)

As análises das amostras por espectrometria de massas foram realizadas em MALDI-TOF-TOF (UltraFlex III, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) controlado pelo software FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics). Nesta etapa obteve-se os espectros de massas dos peptídeos para identificação das proteínas e sequência de aminoácidos através do Protein Blast, sendo as sequências obtidas através do Flex Analysis. O modo de detecção utilizado foi refletido, positivo e a faixa de detecção de 700 . 4500  $m/z$  com 200 tiros. As bandas dos géis tripsinizadas foram misturadas com uma solução de matriz ácido -ciano-4-hidroxicinâmico, concentração de 10mg/mL, em uma razão 1:3 em uma placa MTP AnchorChip 400/384 maciça (Bruker Daltonics), e secadas a temperatura ambiente.

Os espectros de MS/MS foram obtidos através da fragmentação via LIFT após análise dos espectros de MS obtidos e seleção de íons precursores para fragmentação. Estas etapas foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas, CENARGEN/EMBRAPA, em Brasília, DF.

#### 4.1. Quantificação de proteínas secretadas das diferentes induções de *T. asperellum* TR356 e *S. sclerotiorum*

A partir da cinética de crescimento realizada com os inóculos contendo *T. asperellum* (TR356) e *S. sclerotiorum*, foi possível observar que os tempos iniciais (0, 24 e 48 h) apresentaram concentrações semelhantes entre si e inferiores ao tempo de 72h. Após esse período, observou-se um decréscimo na concentração de proteínas no tempo de 96h, igualando as concentrações de proteínas iniciais, seguido de um aumento na concentração no período de 120h que igualou ao valor encontrado no tempo de 72h (Tabela 1).

Tabela 1. Quantificação de proteínas das induções contendo *T. asperellum* TR356 e *S. sclerotiorum* crescidas em diferentes períodos em meio TLE sem glicose. Os resultados foram comparados por ANOVA e o teste Tukey ( $\alpha=0,05$ ) foi utilizado para os distinguirem.

Tempo	Proteínas ( $\mu\text{g/mL}$ )*			
0h	6,08	$\pm$	0,55	b
24h	6,57	$\pm$	0,42	b
48h	6,86	$\pm$	0,28	b
72h	16,18	$\pm$	0,14	a
96h	8,04	$\pm$	0,55	b
120h	14,51	$\pm$	0,83	a

\*Letras similares representam a mesma performance.

Durante as quantificações de proteínas, foi observado que os períodos de 72 e 120 horas de indução eram considerados potenciais para a realização dos testes de proteínas secretadas por *T. asperellum* TR356 em meio TLE sem glicose contra *S. sclerotiorum*.

## Perfil proteico de indução de *T. asperellum* TR356 e *S. sclerotiorum* em diferentes períodos de indução em meio TLE. SDS PAGE 10%.

O perfil das proteínas secretadas nas induções de T+Ss que foram realizadas para determinação do tempo a ser utilizado como padrão para as análises foram expressos diferencialmente, o que pode ser observado no SDS-PAGE corado com nitrato de prata, porém analisando as bandas apresentadas, podemos verificar que as massas moleculares são semelhantes aumentando a quantidade de bandas visualizadas a partir de 48 h de crescimento. Pode-se verificar que bandas inicialmente expressas em 0 h, provenientes do crescimento micelial somente de Ss4d praticamente não são visualizadas no período de 24 h. (Figura 4).

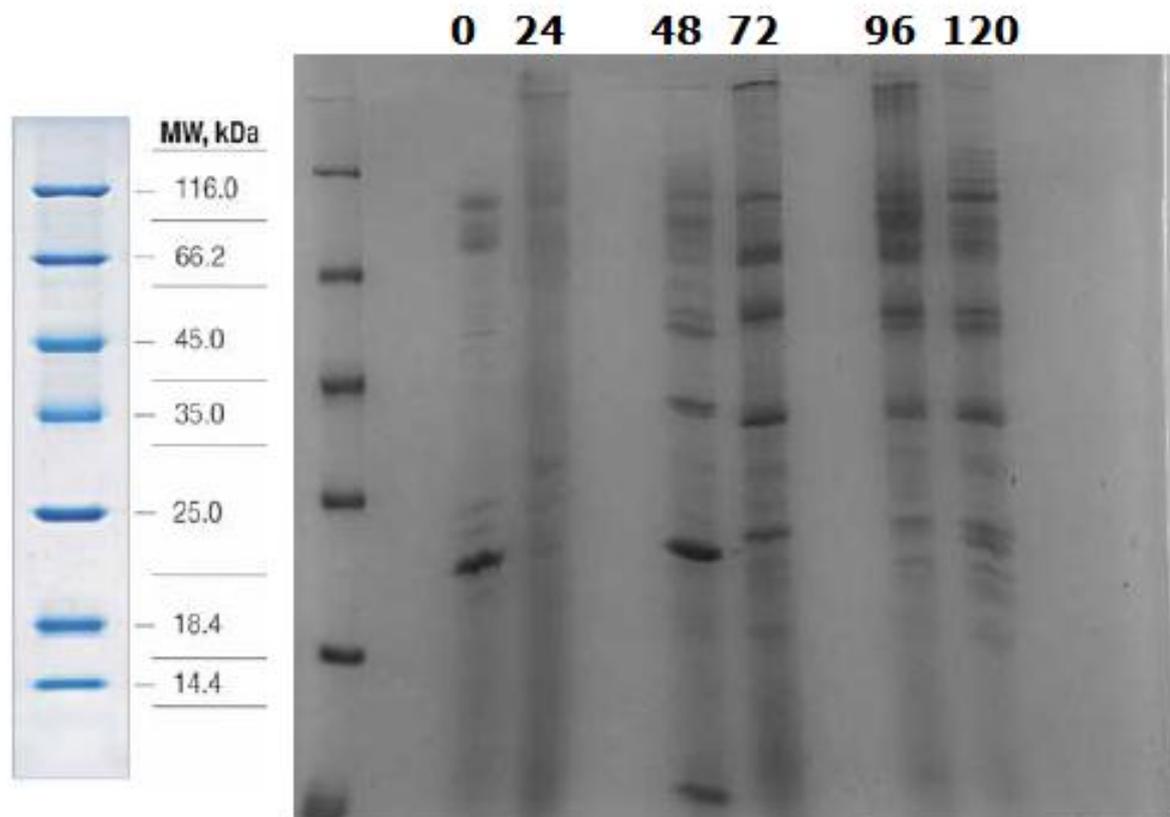


Figura 4. Perfil proteico de indução de *T. asperellum* TR356 e *S. sclerotiorum* em diferentes períodos em meio TLE. SDS PAGE 10%.

Depois de escolhido o período de 72 h como o período a ser estudado por apresentar uma das maiores concentrações de proteínas e ser um tempo relativamente curto, foram coletadas alíquotas das induções T72h, T+Ss, Ss4d,

s que foram utilizados para a análise do secretoma.

As amostras foram aplicadas em um gel unidimensional para verificação do perfil protéico. (Figura 5).

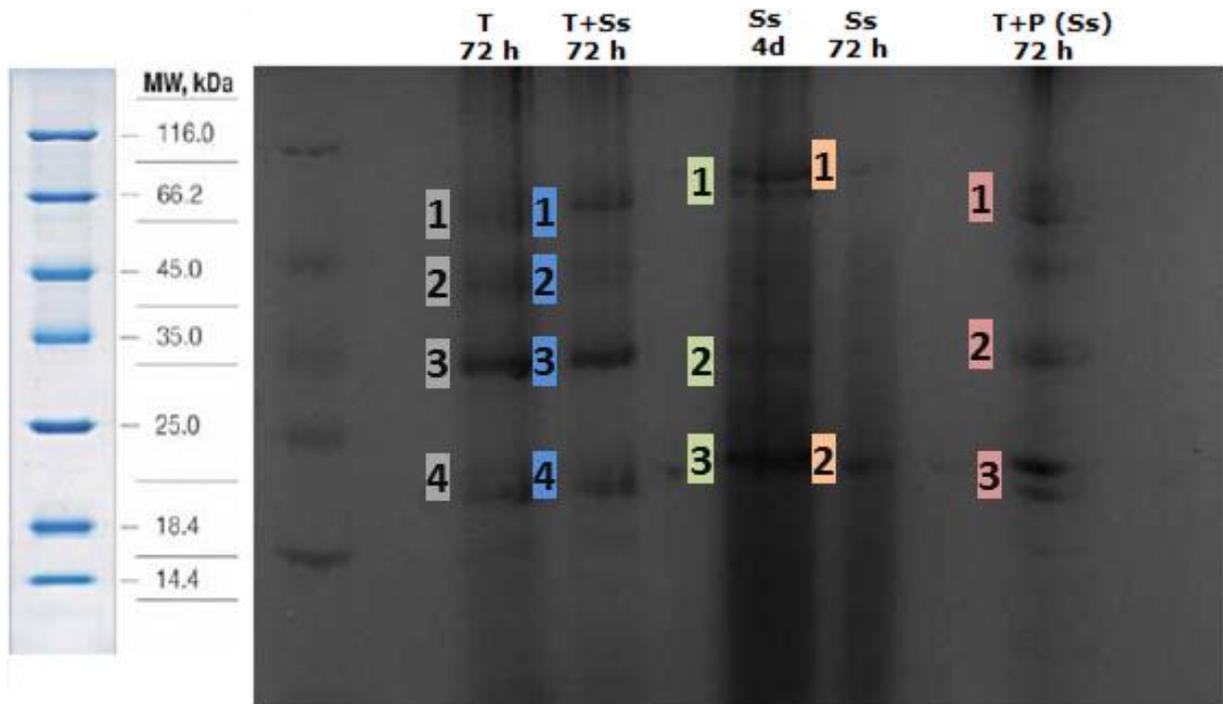


Figura 5. Perfil proteico das induções em meio TLE em diferentes condições. SDS PAGE 10%. T72h . Indução de *T. asperellum* crescido por 72 h em meio TLE (cinza), T+Ss- Indução de *T. asperellum* inoculado com *S. sclerotiorum* crescido por 72 horas em meio TLE (azul), Ss4d . Indução de *S. sclerotiorum* crescido em meio TLE por 4 dias (verde), Ss72h- Indução de *S. sclerotiorum* crescido em meio TLE por 7 dias (4 dias + 72 h) (laranja) e T+P(Ss)- Indução de *T. asperellum* induzidos com parede celular de *S. sclerotiorum* crescidos por 72 h em meio TLE (vermelho).

Algumas diferenças puderam ser observadas nos perfis protéicos apresentados nas induções T72h , T+Ss , Ss4d, Ss72h e T+P(Ss). Todas as bandas que puderam ser visualizadas foram excisadas e enumeradas em ordem crescente de acordo com sua visualização (Figura 5).

A indução T72h apresentou proteínas correspondentes as diferentes massas moleculares entre 66 e 20 kDa. Um perfil semelhante foi observado na indução de T+Ss, sugerindo a possibilidade de algumas proteínas pertencerem ao *T. asperellum* TR356, como é o caso das proteínas de 35 kDa. Os sobrenadantes das induções Ss4d e Ss72h foram visualmente semelhantes, enquanto a indução T+P(Ss) apresentou um perfil bem diferenciado em relação as outras induções.

### 4.3. Espectrometria de Massas (MS)

Após a excisão das bandas do gel, foi realizada a tripsinização, que é a digestão das proteínas a peptídeos. Todas as bandas enumeradas no gel foram analisadas por MS (Anexo 1). Apenas as amostras correspondentes as bandas T72h . 2 , T+Ss . 1 e T+Ss - 2 foram identificadas.

Nos espectros obtidos no MS de T72h-2 (Figura 6), os íons mais proeminentes possuem  $m/z$  1580.0 [M+H<sup>+</sup>], 1461.8 [M+H<sup>+</sup>], 1069.6 [M+H<sup>+</sup>] e 1364.7 [M+H<sup>+</sup>], sendo utilizado o íon de  $m/z$  1580.0 [M+H<sup>+</sup>] e 2033.1 0 [M+H<sup>+</sup>] (Anexo 2), para análise por MS/MS.

Os espectros obtidos da indução T+Ss-1 (Figura 7) demonstraram íons com maiores intensidades em  $m/z$  1174.6 [M+H<sup>+</sup>], 1508.7 [M+H<sup>+</sup>] e 957.4 [M+H<sup>+</sup>], sendo utilizado o íon de  $m/z$  1508.7 para análise por MS/MS.

Nos espectros obtidos das bandas T+Ss-2 (Figura 8) , a análise permitiu identificar alguns íons evidentes com  $m/z$  na faixa de 1500. Apesar disso, apenas o íon com  $m/z$  2393.2 [M+H<sup>+</sup>] foi passível de interpretação.

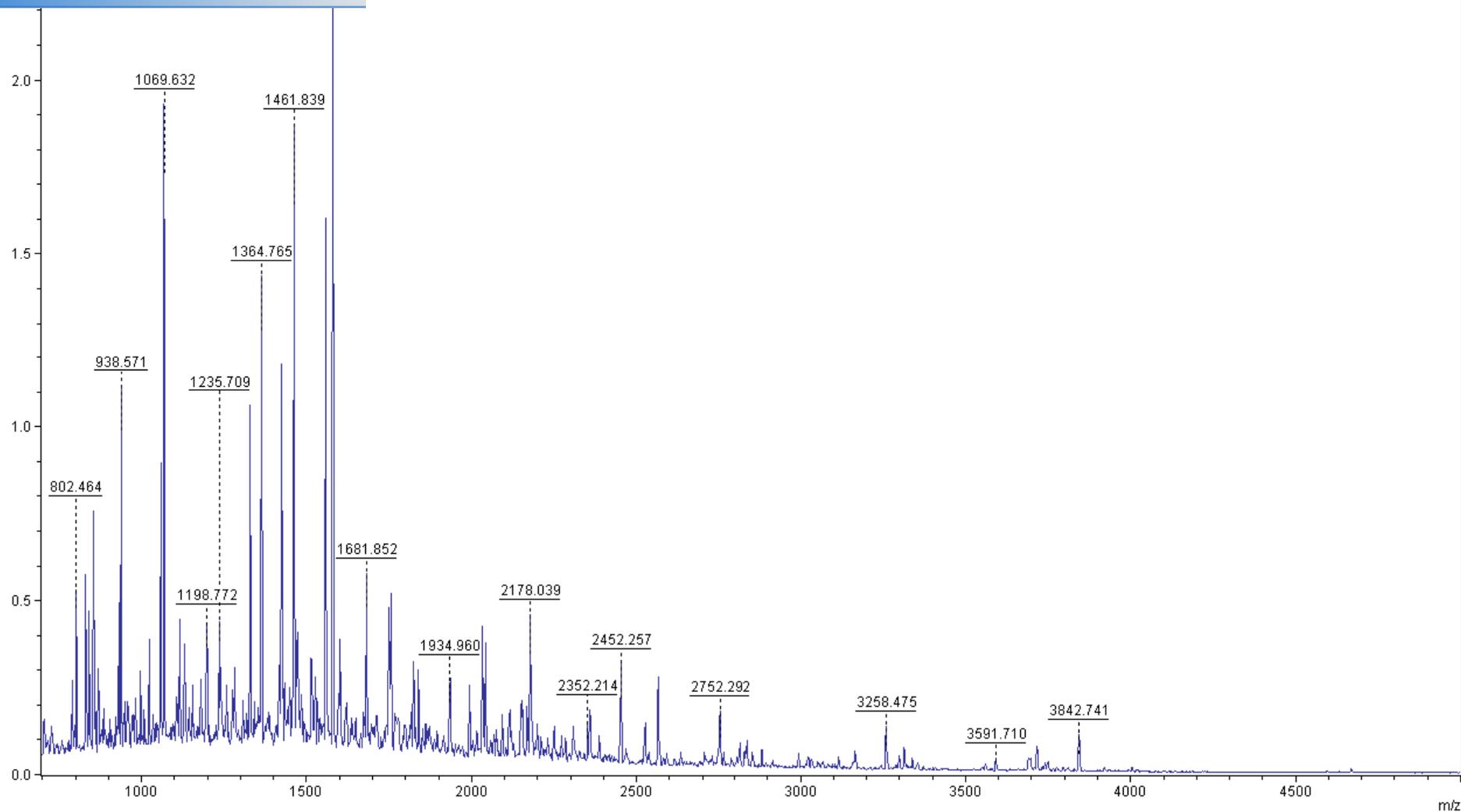


Figura 6. Espectro de massa por MALDI/TOF da banda T72h-2.

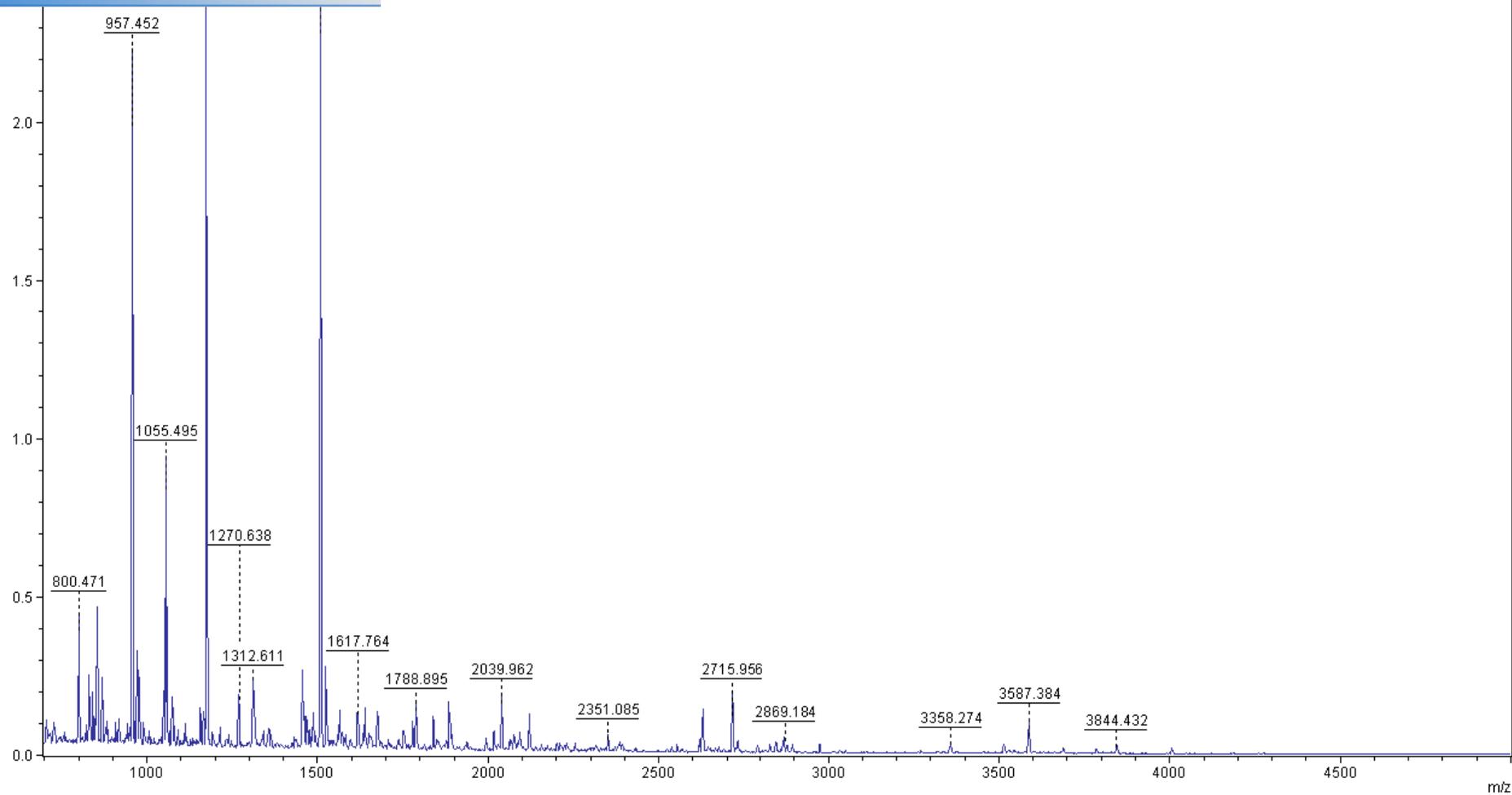


Figura 7. Espectro de massa por MALDI/TOF da banda T+Ss-1.

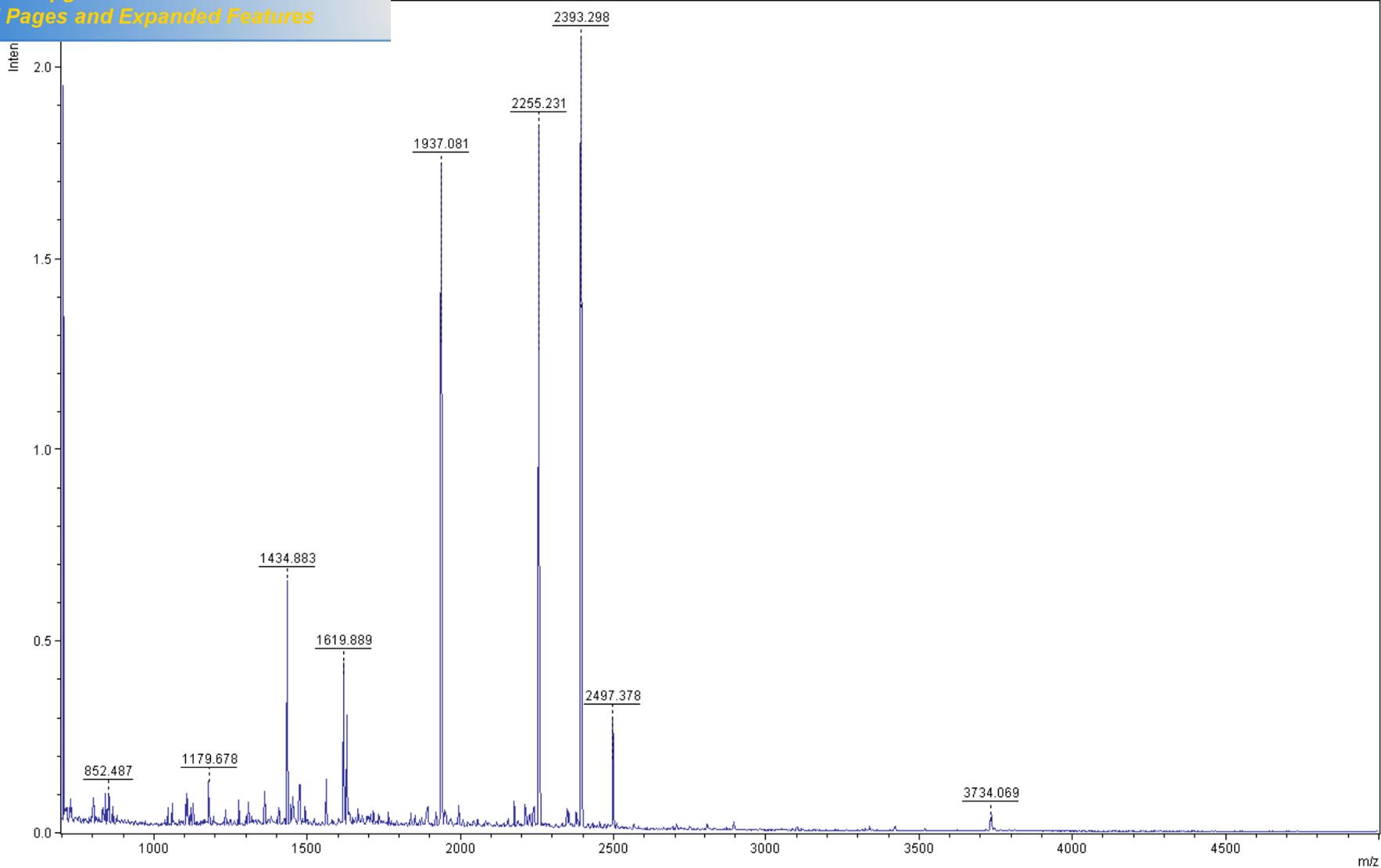


Figura 8. Espectro de massa por MALDI/TOF da banda T+Ss-2.



Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

ctros gerados a partir das bandas que possuíam as mesmas massas moleculares, observadas no gel, das condições analisadas demonstraram que as amostras de T72hou T+P(Ss) são mais parecidas com as induções de T+Ss, do que com as Ss4d ou Ss72h, estas que são mais parecidas entre si (Figura 9). Estes espectros podem nos sugerir que os peptídeos sobrepostos sejam os mesmos, porém, para a confirmação precisa desses resultados, faz-se necessária a fragmentação e sequenciamento dos mesmos para validação. Vale ressaltar que os erros no MALDI são de aproximadamente 0.1 Da.

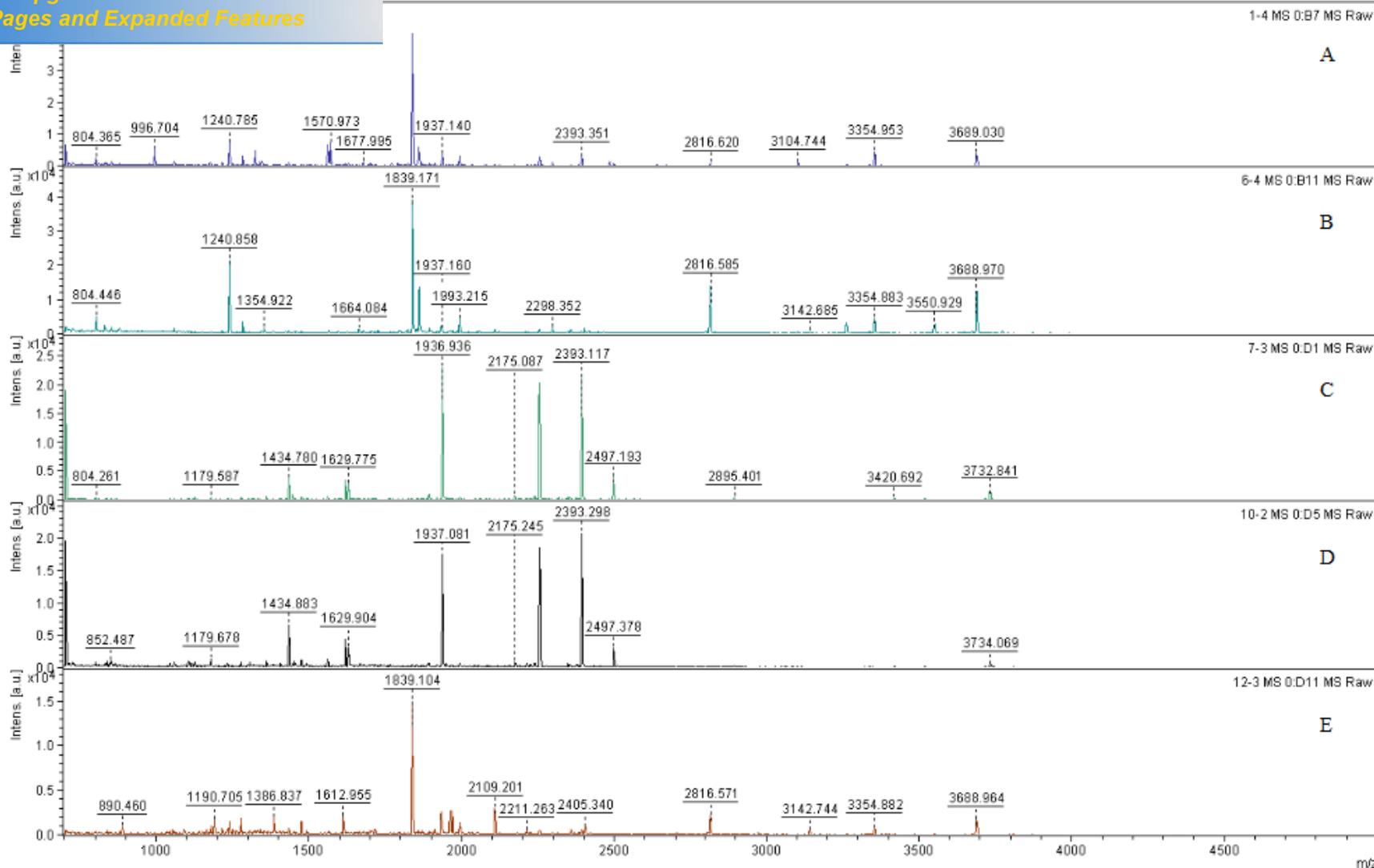


Figura 9. Sobreposições dos espectros de massa por MALDI/TOF de bandas excisadas de massas moleculares próximas em diferentes induções. A - T+Ss-4, B - T72h-4, C - Ss72h-3, D - Ss4d-2, E - T+P(Ss)-3.

Figura 2, T+Ss . 1 e T+Ss - 2 tiveram proteínas identificadas por MS/MS. As demais bandas ainda não foram sequenciadas devido a problemas técnicos e amostrais, impossibilitando a identificação de proteínas por MS/MS.

O íon de  $m/z$  1580.2  $[M+H^+]$  proveniente de T72h-2 (Figura 6) após fragmentação foi sequenciado (Figura 10). A sequência obtida após comparação com bancos de dados sugere a uma  $\alpha$ -1,3-glucanosiltransferase proveniente de isolado de *T. viride*, porém ainda não descritos em *T. asperellum*.

A sequência encontrada do espectro de  $m/z$  2033.1  $[M+H^+]$  proveniente de T72h-2 (Anexo 2) quando comparada aos bancos de dados é semelhante à  $\alpha$ -1,2-D-mannosidase (Figura 13) extraída de *T. viride*.

O íon de  $m/z$  1508.7  $[M+H^+]$  proveniente de T+Ss-1 (Figura 7) após fragmentação foi sequenciado (Figura 11). A sequência obtida após comparação com bancos de dados sugere uma proteína hipotética proveniente de *S. Sclerotiorum*.

O íon de  $m/z$  2393.8  $[M+H^+]$  proveniente de T+Ss.2 (Figura 8) após fragmentação foi sequenciado (Figura 12). A sequência obtida após comparação com bancos de dados sugere a uma  $\alpha$ -1,3-glucanosiltransferase proveniente de isolado de *T. viride*, porém ainda não descritos em *T. asperellum*.

Os resultados das identificações das proteínas podem ser observados na tabela 2.

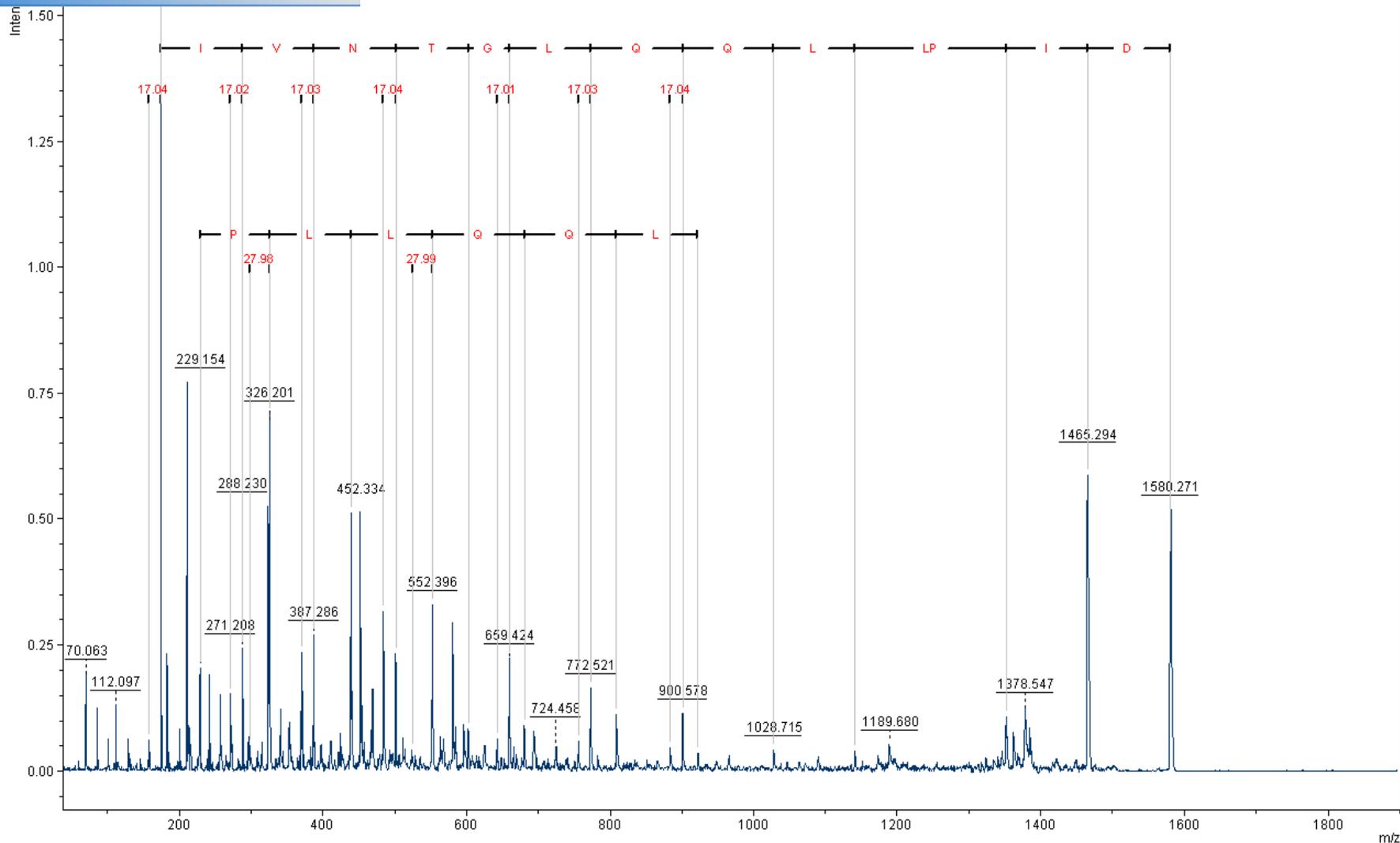


Figura 10. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 1580.2 de T72h-2 obtido por MALDI/TOF.

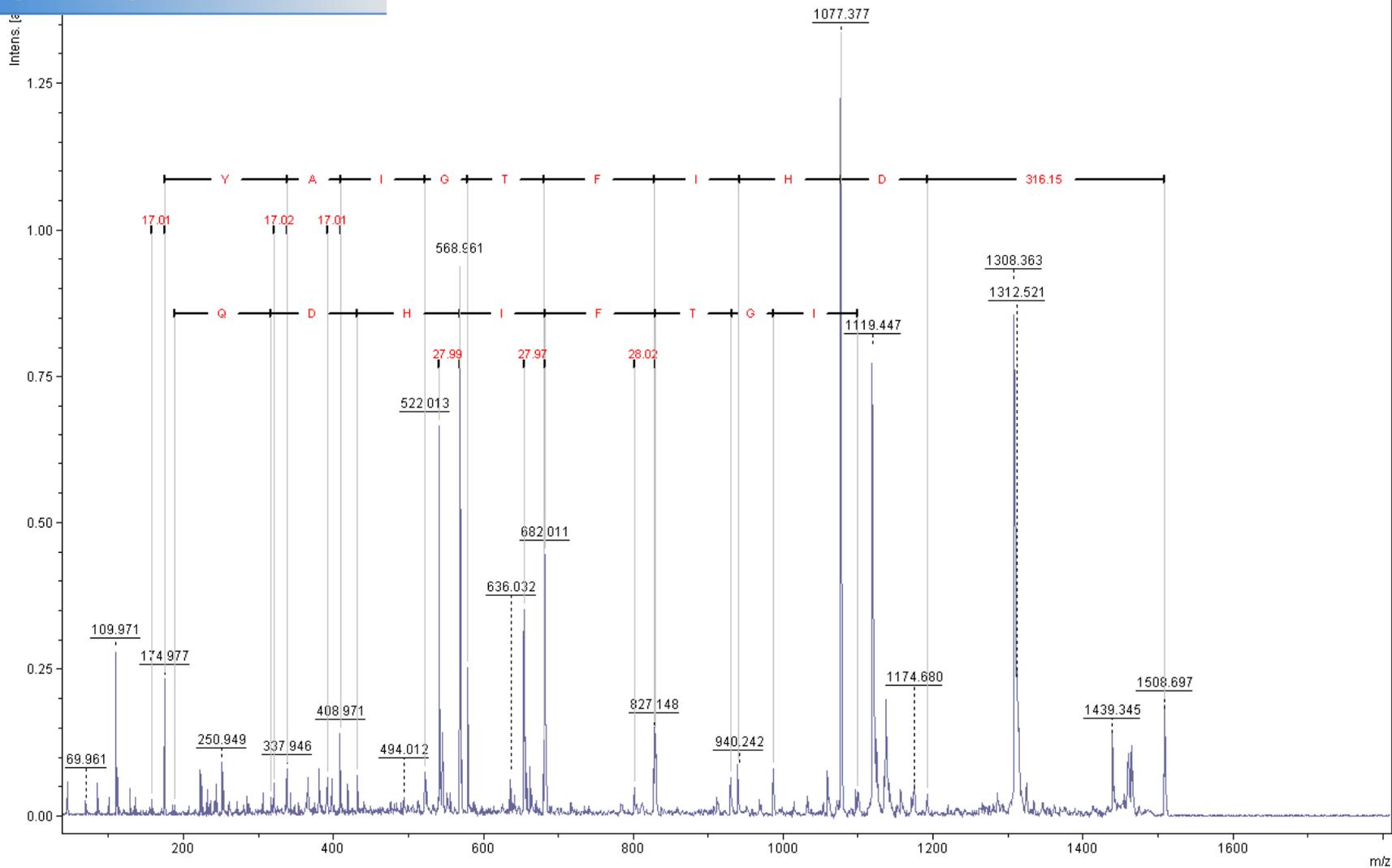


Figura 11. Interpretação do espectro de massa referente ao íon  $m/z$  1508.7 de T+Ss-1 obtido por MALDI/TOF.

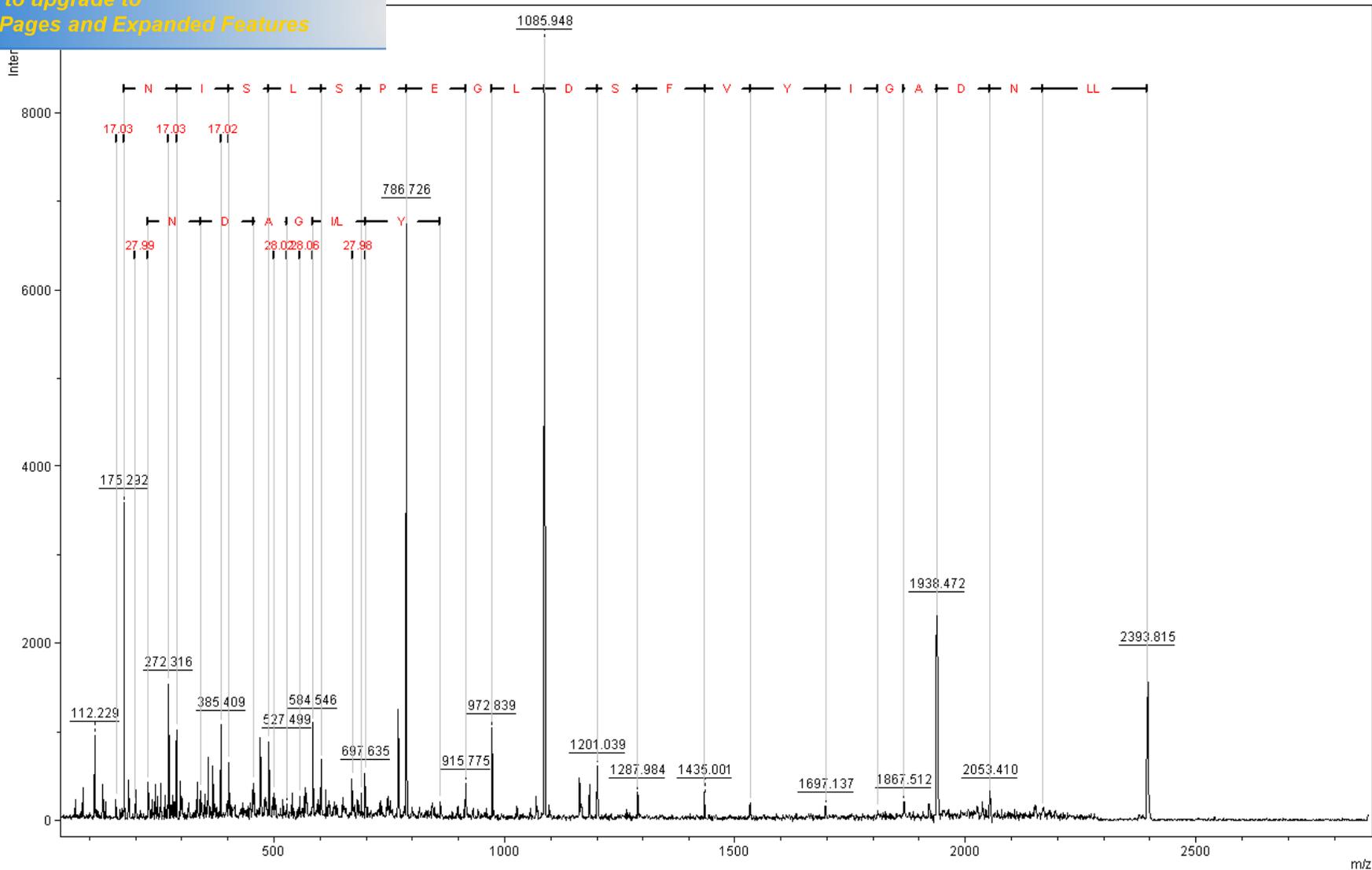


Figura 12. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 2393.8 de T+Ss . 2obtidos por MALDI/TOF.

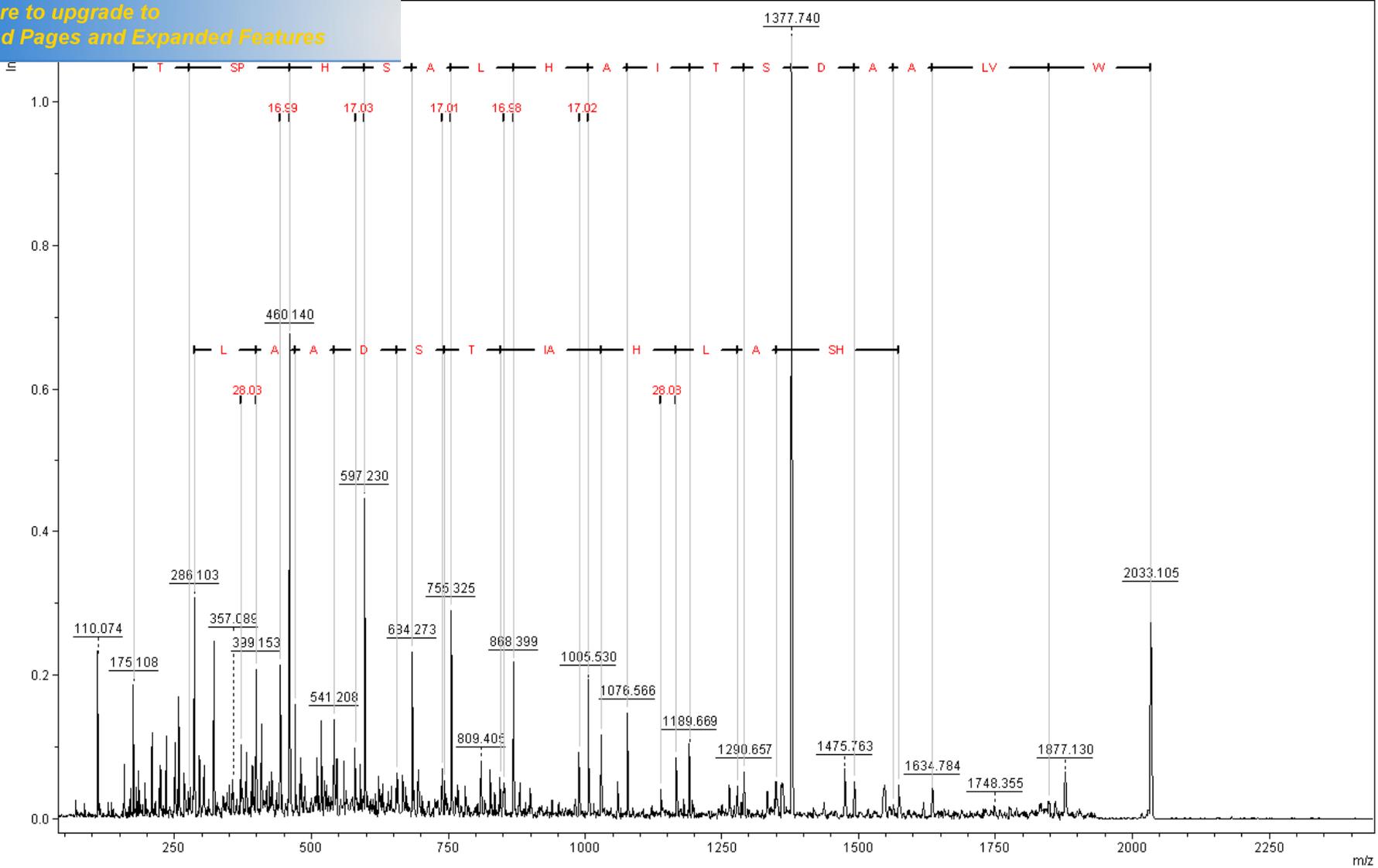


Figura 13. Interpretação do espectro de massa referente ao íon m/z 2033.1 de T72h- 2 obtido por MALDI/TOF.

Identificadas. O número de acesso do NCBI foi obtido através do Protein Blast (algoritmo blastp) usando o banco de dados (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). [M+H<sup>+</sup>] Observado - Íons precursores observados utilizados para fragmentação de peptídeos. [M+H<sup>+</sup>] Esperado - Íons precursores esperados gerados a partir das ferramentas de massa destacando a exatidão dos peptídeos obtidos ([http://web.expasy.org/peptide\\_mass](http://web.expasy.org/peptide_mass)). kDa - Massas moleculares. PI - Pontos isoelétricos teóricos observados a partir das sequências obtidas no NCBI. Peptídeo sinal de secreção obtidos pelo SignalP tool2.1.

Descrição (Nome da proteína/Espécie)	Nº de acesso NCBI	[M+H <sup>+</sup> ] Observado / [M+H <sup>+</sup> ] Esperado	Sequências	e-value	(kDa) e PI teórico	Condição - Banda	Proteína Secretada
Proteína Hipotética SS1G 00730 ( <i>S. sclerotiorum</i> )	XP_001598641.1	957,46 / 957,46 1174,65 / 1174,65 1508,69 / 1508,73	NFMVYQR ALLGTSFGVPGR GMQDHIFTGIAYR	28 0,043 5,00E-05	66,45 / 4,73	T+Ss-1	Sim
Glycoside hydrolase family 72 protein - -1,3-glucanosiltransferase ( <i>T. virens</i> )	EHK19699.1	2393,81 / 2393,23	LLNDAGIYVFSDLGEP SLSINR	7,00E-13	57,15 / 4,54	T+Ss-2	Sim
Glycoside hydrolase family 72 protein - -1,3-glucanosiltransferase ( <i>T. virens</i> )	EHK19699.1	1580,27 / 1579,91	DIPLLQQLGTVIR	0,01	57,15 / 4,54	T72h-2	Sim
Glycoside hydrolase family 47 protein - -1,2-D-mannosidase ( <i>T. virens</i> )	EHK21505.1	2033,10 / 2033,05	WVLAADSTIAHLASHPSTR	7,00E-10	55,65 / 5,37	T72h -2	Sim

Os resultados obtidos demonstraram que estas metodologias são bastante interessantes de serem utilizadas, uma vez que demandam menor quantidade de material e que estes podem ser analisados através do MS/MS, técnica que permite a identificação da sequência de aminoácidos auxiliando na identificação de proteínas, neste caso, dos fungos *T. asperellum* (TR356) e *S. sclerotiorum*, ambos com genoma sequenciado. (<http://genome.jgi-psf.org/Trias1/Trias1.home.html>) (<http://genome.jgi.doe.gov/ScLsc1/ScLsc1.home.html>) (AMSELENet *et al.*, 2011).

O fungo *T. asperellum* TR356 foi escolhido devido a sua alta eficiência no controle biológico em campo contra o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, autores demonstraram que este isolado era grande produtor de enzimas hidrolíticas, como NAGase e  $\alpha$ -1,3-glucanase, que estão envolvidas nos processos de degradação de parede celular do hospedeiro (GERALDINE, *et al* 2013).

A capacidade do gênero *Trichoderma* como antagonista de fungos fitopatogênicos já havia sido relatada por diversos autores contravários fungos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* (ALMEIDA *et al.*, 2007) *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium sp.* (MONTEIRO *et al.*, 2010), *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* (VITERBO *et al.*, 2001) e *Bipolaris oryzae* (ABDEL-FATAH *et al.*, 2007) sendo portanto, o emprego de micro-organismos antagonísticos no controle de pragas agrícolas de grande importância, representando uma estratégia relevante para assegurar boas condições sanitárias com menores danos ao meio ambiente e à saúde pública (MELO, 1998). Assim, espera-se que os antagonistas, através do aumento da secreção de enzimas extracelulares, tais como quitinase,  $\alpha$ -1,3-glucanases e proteases, sejam responsáveis por uma queda acentuada nos níveis de inóculo de *S. sclerotiorum* no solo, por exemplo (WOO *et al.*, 2006).

Uma forma de observar a liberação dessas enzimas é através do crescimento de espécies de *Trichoderma* em meio líquido contendo parede de micélio autoclavado ou parede celular de fitopatógenos (PEBERDY, 1990; HARAN *et al.*, 1996). No caso do presente estudo, ambos organismos vivos e com parede celular de *S. sclerotiorum*. Com a finalidade de analisar o secretoma, *T. asperellum* TR356 foi crescido em meio TLE sem glicose na presença de *S. sclerotiorum* para avaliar o

nessa condição tentando aproximar em um parâmetro mais realista, em diferentes períodos.

Por ser um repressor catabólico de várias enzimas hidrolíticas possuindo alta taxa de degradação de proteínas e inibição de enzimas alvos, a glicose foi retirada do meio de cultura uma vez que o objetivo do estudo é analisar justamente o que é secretado em induções de *T. asperellum* TR356 contra *S. sclerotiorum* com o intuito de que cada fungo utilize fontes de carbono do próprio organismo vivo.

A concentração de proteínas do sobrenadante de cada meio de crescimento foi determinada e os resultados foram apresentados na Tabela 1. Após as induções foi possível observar que com o decorrer do tempo a quantidade de proteínas variou (aumentou e diminuiu), sendo que os tempos de 72h e 120h apresentaram as maiores concentrações de proteínas (Tabela 1). Com o intuito de evitar a degradação das amostras por estresse em períodos muito longos, a indução de 72 horas foi escolhida, além de ser um tempo razoavelmente mais curto para a realização dos experimentos. Foram feitas réplicas técnicas e biológicas que apresentaram resultados semelhantes.

Através da eletroforese unidimensional, pode se observar que os perfis protéicos são diferentes para cada tempo e tipo de indução (Figuras 4 e 5). Vale ressaltar que embora neste tipo de corrida, um *pool* de proteínas com o mesmo peso molecular se apresentem na malha como proteínas semelhantes, há uma variedade imensa de proteínas que podem ser identificadas e separadas através das técnicas de géis uni e bidimensionais e de MS. As diferenças entre os perfis evidencia que a secreção de proteínas de *T. asperellum* e *S. sclerotiorum* podem ser diferenciadas de acordo com as suas condições de crescimento.

Sabe-se que os primeiros estudos de análise de proteoma em fungos filamentosos foram realizado por GRINYER *et al.*, 2004 onde foi analisado o proteoma intracelular do fungo *Trichoderma harzianum*, as proteínas foram separadas e identificadas através das técnicas de eletroforese e MALDI-TOF-TOF (MS). De acordo com CANTÚ (2008), os peptídeos obtidos também podem ser separados por meio de técnicas de cromatografia líquida uni- ou multidimensional, ionizados e transferidos (ESI ou MALDI) para o analisador de massas. ESI aplicada

referencialmente espécies duplamente carregadas, enquanto MALDI gera quase que exclusivamente íons monocarregados, sendo este segundo utilizado no presente trabalho.

KOLKMAN *et al* (2006) também já havia utilizado géis unidimensionais onde as bandas foram tripsinizadas e aplicadas em LC MS/MS objetivando identificar a expressão diferenciada de proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* em situações de estresse nutricional.

Através de técnicas enzimáticas e proteômicas, o estudo da resposta do secretoma em *T. asperellum*TR356 em crescimento contra *S. sclerotiorum* incrementa o conhecimento acerca dos mecanismos que regulam a expressão das proteínas. Com o intuito de analisar como a síntese de proteínas, especificamente, as enzimas extracelulares estavam relacionadas contra *S. sclerotiorum* em relação a ausência de glicose, tempo e perfil eletroforético, foi realizado uma metodologia que melhor auxiliaria para a análise do secretoma nestas condições.

Análises por SDS-PAGE mostraram as mudanças que ocorrem na secreção de proteínas por *T. asperellum*TR356 quando induzidos com discos de meio cultura de *S. sclerotiorum*. MEDINA (2004) já havia observado a influência do substrato sobre a secreção de proteínas em *Aspergillus flavus*, fato observado no presente estudo quando comparados as induções.

Após a corrida por SDS-PAGE, foram excisadas as bandas do gel para realização da análise através da espectrometria de massas afim de identificar as proteínas secretadas de cada indução. Após a realização do processo de tripsinização (digestão *in gel*), os espectros gerados demonstraram que o perfil de cada indução é diferenciado. Para a determinação das proteínas de cada isolado na indução é preciso realizar o sequenciamento desses peptídeos. Vale lembrar que 50% da massa molecular total das proteínas secretadas podem corresponder a carboidratos (IWASHIDA, 2002) ocasionados pela glicosilação. A glicosilação é uma das principais modificações pós-traducionais, que podem afetar uma variedade de funções das enzimas, incluindo secreção, estabilidade e enovelamento da proteína e contribui, ainda, para o aumento de sua resistência a ataques proteolíticos (KUBICEK *et al.*, 1993), proporcionando as proteínas secretadas, estabilidade e

ais. Essa proteção pode representar uma obstáculo para as análises por MS, podendo ocorrer uma perda de qualidade no espectro de massa devido à baixa quantidade de proteínas presentes, tal fato pode ser observado durante as análises de alguns espectros.

Dentre as proteínas identificadas, pode-se observar a presença de -1,3-glucanosiltransferases que são um complexo de proteínas localizados na membrana plasmática auxiliando e participando nos processos de biogênese e alongação da cadeia de enzimas envolvidas na integração de parede celular, as -1,3-glucanas, sendo importantes no crescimento de fungos (HURTADO-GUERRERO *et al.*, 2009). Estas proteínas ainda não foram relacionadas ao micoparasitismo, havendo a necessidade de uma melhor investigação para que seja possível compreender os mecanismos de resposta de *T. asperellum* TR356 em uma situação de estresse, como quando induzidas com *S. sclerotiorum*, além de avaliar a função dessas e outras proteínas produzidas.

Proteínas -1,2-D-mannosidas também foram identificadas neste trabalho, sendo essas proteínas capazes de atuar na degradação da parede celular dos fungos fitopatogênicos. Estas enzimas normalmente estão envolvidas na retirada de resíduos de manose das glicoproteínas, componentes de parede celular dos fungos. Esse processo normalmente deixa as proteínas mais suscetíveis à ação proteolítica (BARROS *et al.*, 2009) e conseqüentemente gera maior eficácia na degradação dos componentes de parede dos fungos.

Todas as proteínas identificadas compõem classes de proteínas biologicamente importantes, ocorrendo em inúmeros organismos e nesse caso, podendo estar relacionado a degradação da parede celular de fitopatógenos ou em processos de amensalismo, onde ocorre a inibição do crescimento de outros organismos.

Mesmo a técnica de gel bidimensional ser considerada como uma das mais importantes no estudo de proteínas e peptídeos secretados, no presente estudo foi realizado tais análises a partir de géis unidimensionais para a obtenção de espectros testes, estes que apresentaram vários íons com  $m/z$  diferentes, permitindo uma comparação entre as induções. A partir dos genomas já sequenciados pode-se

a organismo separadamente permitindo assim a caracterização dos secretomas presentes nas induções. É importante ressaltar que apesar das técnicas de espectrometria de massas serem consideradas satisfatórias na obtenção de resultados, dependendo da qualidade do material analisado, pode-se encontrar problemáticas nas análises dos mesmos, tal fato observado durante a realização dos experimentos do presente trabalho. BOUWS *et al.*,(2008) já havia relatado problemas durante a identificação de proteínas secretadas em *Aspergillus flavus* que quando submetidas as análises por MS/MS não puderam ser identificadas, optando então pela utilização da técnica de nanoHPLC (MEDINA 2005).

Foram feitas análises através da estratégia de nanoUHPLC-MS/MS com o intuito de se obter melhores resoluções além de facilitar as análises. Porém, após várias tentativas, observou-se que a amostra era muito complexa e devido a quantidade de pigmentação houve uma interferência na eficiência das colunas, impedindo uma visualização e identificação precisa dos peptídeos, sendo esta estratégia a ser utilizada em outro momento (dados não mostrados).

Visando aplicação biotecnológica, as análises realizadas a partir de géis unidimensionais auxiliam na rapidez dos processos, uma vez que demandam menos tempo, quantidade de proteínas (40 µg para gel unidimensional e 600 µg para gel bidimensional) e material para a confecção em relação aos géis bidimensionais, podendo também fornecer informações importantes e relevantes para aplicação do *T. asperellum* TR356 como agente de controle biológico. O presente trabalho está direcionado a validação de um método visando a eficiência na identificação de proteínas secretadas quando dois organismos vivos são inoculados juntos.

As proteínas podem ser identificadas através de softwares de busca para localizar as proteínas nos bancos de dados. Os softwares utilizados neste trabalho foram Flex Analysis para a obtenção das sequências de aminoácidos e Protein blast para a identificação das mesmas.

É importante ressaltar que o presente estudo aborda os dois organismos vivos, permitindo analisar a resposta tanto do *T. asperellum* TR356 quanto do *S. sclerotiorum*, uma vez que a maioria dos estudos proteômicos/secretoma são



**PDF**  
Complete

*Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

o patógeno. Esta metodologia, portanto, permitiu a identificação de proteínas secretadas após a indução com os dois organismos vivos, conferindo maior credibilidade aos estudos a cerca da interação entre agente de controle biológico e fitopatógeno em campo, uma vez que existe uma maior proximidade do real levando em consideração as possíveis variações que podem ocorrer na interação dos dois micro-organismo, por exemplo, inibição de secreção de proteínas.

Enquanto um número de publicações têm abordado os secretomas de fungos induzidos com parede celular de fitopatógenos, o presente estudo apresenta a indução de dois organismos vivos para a identificação das proteínas secretadas.

Sendo fungos do gênero *Trichoderma* importantes agentes de controle biológico, faz-se necessários maiores estudos acerca de sua capacidade de atuação contra fitopatógenos.

Através de metodologias mais eficientes de identificação de proteínas, o entendimento acerca das interações que ocorrem nos processos de micoparasitismo podem agregar conhecimento acerca da atuação contra micro-organismos patogênicos, .

Utilizando técnicas de MS, pode-se identificar as proteínas secretadas quando os dois organismos vivos são induzidos juntos e separados, permitindo assim menos tempo e maior entendimento sobre a interação destes organismos.

O trabalho apresenta algo inovador por se tratar não somente de identificação e sim de um método para verificar se é válido a realização das identificações de proteínas nestas condições, uma vez que trabalhos anteriores utilizavam a parede celular do fitopatógeno. Não foi possível identificar as proteínas de todas as induções realizadas devido as dificuldades ao se trabalhar com um meio bastante complexo, desta forma, análises futuras serão necessárias para elucidar a interação e função destas proteínas no controle biológico através do fungo *Trichoderma* sobre fitopatógenos.



*Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

- Sequenciamento das demais bandas dos espectros obtidos por MS;
- Análises através da estratégia de nanoUHPLC-MS/MS com o intuito de se obter melhores resoluções além de facilitar as identificações de proteínas.

Abdel-Fattah, GM., Shabana, YM., Ismail, AE., Rashad, YM. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. Mycopathologia, 164: 81-89,2007.

Abdullah, MT., Ali, NY., Suleman, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Crop Protection 27, 1354-1359, 2008.

Adams, PB., Ayers, WA. Ecology of *Sclerotinia* species. Phytopathology 69, 896-899,1979.

Alabouvette, C., Steinberg, C. The soil as a reservoir for antagonist to plant diseases. In: EILENBERG J, HOKKANEN HMT, eds. An ecological and societal approach to biological control. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 123-144, 2006.

Almeida, FBR., Cerqueira FM., Silva RN., Ulhoa CJ. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. Biotechnology Letters, 29:1189-1193, 2007.

Amselen, J; *et al.*, Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and botrytis cinerea. plos genetics, aug;7(8):e1002230,2011.

Azcbn-Aguilar, C.; Barea, JM. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. Scientia Horticulturae. v.68 p. 1-24. 1997.

Bae, YS., Knudsen, GR. Soil microbial biomass influence on growth and biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. Biological Control 32, 236-242, 2005.

Barros, MCde., Silva, RN., Ramada, MHS., Galdino, AS., Moraes, LMP de Torres., FAG., Ulhoa, CJ. The influence of N-glycosylation on biochemical properties of Amy1, an  $\alpha$ -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. Carbohydrate Research, 344: 1682-1686, 2009.

Benítez, T., Rincon, AM., Limon, MC., Codon, AC. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology. v.7. p. 249-260. 2004.

Bhadoria, V., Zhao, WS., Wang, LX., Zhang, Y., Liu, JH., Yang, J., Kong, LA., Peng, YL. Advances in fungal proteomics. Microbiological Research, 162: 193-200, 2007.

Blad, BL., Steadman, JR., Weiss, A. Canopy structure and irrigation influence white mold disease and microclimate of dry edible beans. Phytopathology 68, 1431-1437,1978.

Blackburn ,KR., Cheng, FY., Williamson ,JD., Goshe, MB. Data-independent liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS(E)) detection and quantification of the

thogen defense protein mannitol dehydrogenase. *Rapid Commun Mass Spectrom.* Apr 15;24(7):1009-16, 2010.

Boland, GJ., Hall, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 16, 93-108, 1994

Bolton, MD., Thomma, BPHJ., Nelson, BD. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*, v.7, n.1, p.1-16, 2006.

Bouws H., Wattenberg, A., Zorn H. Fungal secretomes--nature's toolbox for white biotechnology. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2008.

Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254, 1976.

Cantú, MD., Carrilho E., Wulff, NA., Palma, MS. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Química Nova*, 31(3): 669-675,2008.

Carberry S., Neville CM., Kavanagh, KA., Doyle S. Analysis of major intracellular proteins of *Aspergillus fumigatus* by MALDI mass spectrometry: identification and characterisation of an elongation factor 1B protein with glutathione transferase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006

Carpenter, MA., Stewart, A., Hidgway, HJ. Identification of novel *Trichoderma hamatum* genes expressed during mycoparasitism using subtractive hybridisation. *FEMS Microbiology Letters* 251: 105. 112,2005.

Carvalho, DDC., Mello, SCMD., Lobo Junior, M., Geraldine, AM. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46, 822-828, 2011.

Chet, I. *Trichoderma* . application, mode of action, and potential as biocontrol agent of soilborne plant pathogen fungi. In: *Innovative Approaches to Plant Disease Control* (I. Chet, ed.), pp.137-160. John Wiley, New York, 1987.

Chet, I., Inbar, J., Hadar, I. Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow DT, Söderström B (eds) *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Springer-Verlag, Berlin, pp 165-184, 1997.

Cravatt, BF., Simon, GM., Yates, Jr. 3RD. The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. *Nature*. v.450, p.991- 1000, 2007.

Delahunt, C. e Yates, JR III. Protein identifications using 2D-LC-MS/MS. *Methods*, n 35, p. 248-255, 2005.

Interaction of ammonium, glucose, and chitin, and chitin regulates the expression of cell-wall degrading enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. Applied Environmental Microbiology, 67: 5643-5647, 2001.

Druzhinina, IS, Kopchinskiy, AG, Komon, M.; Bissett, J.; Szakacs, G.; Kubicek, CP. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. Fungal Genetics and Biology. v. 42. p. 813. 828. 2005.

Druzhinina, IS., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, BA., Kenerley, CM, Monte, EI, Mukherjee, PK., Zeilinger, S., Grigoriev, IV., Kubicek, CP: *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. Nature, 9(10):749-759, 2011.

Eastburn, DM., Butler, EEE. Effects of soil moisture and temperature on the saprophytic ability of *Trichoderma harzianum*. Mycologia 83, 257-263, 1991.

Ethur, LZ., Blume, E. et al., *Trichoderma harzianum* node desenvolvimento e na proteção de mudas contra fusarioses do tomateiro. Ciência e Natura. 30(2):57-69. UFSM, 2008.

Feng, X., Liu, X., Luo, Q., Liu, BF. Mass spectrometry in systems biology: an overview. Mass Spectrometry Reviews, v. 27, n. 6, p. 635-60, 2008.

Fernando, WGD., Nakkeeran, S., Zhang, Y., Savchuk, S. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. Crop Protection 26, 100-107, 2007.

Ferraz, LCL., Bergamin Filho, A., Amorim, L., Nasser, LCB. Viabilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* após a solarização do solo na presença de cobertura morta. Fitopatologia Brasileira 28, 17-26, 2003.

Ferraz, LDCL., Nasser, LCB., Café-Filho, AC. Viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* e incidência de fungos antagonistas em solo de Cerrado. Summa Phytopathologica 37, 208-210, 2011.

Ferreira, DF. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia 35, 1039-1042, 2011.

Figueirêdo, GSD., Figueirêdo, LCD., Cavalcanti, FCN., Santos, ACD., Costa, AFD., Oliveira, NTD. Biological and chemical control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma spp.* and *Ulocladium atrum* and pathogenicity to bean plants. Brazilian Archives of Biology and Technology 53, 1-9, 2010.

Fonseca, CA., Jesuini, RSA., Felipe, MSS., Cunha, DA., Brito, WA., Soares, CMA., Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*, Microbes and Infection, 2001.

Fontenelle, ADB., Guzzo, SD., Lucon, CMM., Harakava, R. Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma spp.* Crop Protection 30, 1492-1500, 2011.

Geraldine, AM., Lopes, FAC., Carvalho, DDC., Barbosa, ET., Rodrigues, AR., Brandão, R S., Ulhoa, CJ., Junior, ML. Field biocontrol of white mold associated to cell-wall degrading enzymes and parasitism of sclerotia by *Trichoderma spp.* isolates. Biological control, 2013.

Grinyer, J., Mckay, M., Nevalainen, H., Herbert, BR. Fungal proteomics: initial mapping of biological control strain *Trichoderma harzianum*. Current Genetics, 45: 163-169, 2004a.

Grinyer, J., Mckay, M., Herbert, BR., Nevalainen, H. Fungal proteomics: mapping the mitochondrial proteins of a *Trichoderma harzianum* strain applied for biological control. Current Genetics 45: 170-175, 2004b.

Grinyer, J., Hunt, S., Mckay, M., Herbert, BR., Nevalainen, H. Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. Current Genetics, 47: 381-388, 2005.

Gross, JH. Mass spectrometry: a textbook. Heidelberg, Germany: SpringerVerlag, 2004.

Haynes, PA., Yates, JR. 3rd. Proteome profiling-pitfalls and progress. Yeast. v.17, p.81-87, 2000.

Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A., Chet, I. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. Phytopathology, 86: 980-985, 1996.

Haran, S.; Schickeker, H. & Chet, I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology 142: 2321-2331, 1996.

Harman, GE., Howell, CR., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology 2, 43-56, 2004.

Harman, GE., Petzoldt, R., Comis, A. & Chen, J b. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of this interaction on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. Phytopathology v. 94 (2). p. 147-153. 2004.

Heraux, FMG., Hallett, SG., Weller, SC. Combining *Trichoderma virens*-inoculated compost and a rye cover crop for weed control in transplanted vegetables. Biological Control 34: 21-26, 2005.

Hjeljord, LG., Stensvand, A. & Tronsmo, A. Antagonism of nutrient-activated conidia of *Trichoderma harzianum* (atroviride) P1 against *Botrytis cinerea*. Phytopathology, 91(12): 1172-1180, 2001.

ss spectrometry: principles and applications. 3. Ed.  
West Sussex, England. Wiley-Interscience, 502 (p),2007.

Hoyos-Carvajal L, Orduz S, Bissett J,. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genetics and Biology* 46: 615-631, 2009;

Howell. CR. Cotton seedling pre emergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 92:177-180,2002.

Hurtado-Guerrero, R., Schuttelkopf, AW., Mouyna, I., Ibrahim, AFM., Shepherd, S., Fontaine, T., Latgé, .JP., Van Aalten, DMF. Molecular mechanisms of yeast cell wall glucan remodeling. *The Journal of Biological Chemistry*, 284: 8461-8469, 2009.

Katayama, A.; Matsumura, F. Photochemically enhanced microbial degradation of environmental pollutants. *Environmental Science & Technology*. v.25. p. 1329. 1333. 1991.

Kolkman, A.; Daran-Lapujade, P.; Fullaondo, A.; Olsthoorn, MM.A., Pronk, J T., Slijper, M. e Heck, A. J. R. Proteome analysis of yeast response to various nutrient limitations. *Molecular Systems Biology*, v. doi:10.1038/msb4100069, 2006.

Kubicek, CP., Messner, R., Gruber, F., Mach, R. L. e Kubicek-Pranz, E. M. The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: From the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, v.15, n.2, p.90-99. 1993.

Kubicek,CPet *al.*,*Trichoderma:Fromgenestobiocontrol*.*J.PlantPathol*.83(2):11-23,2001.

Kubicek ,CP, Bissett J, Druzhinina I, Kullnig-Gradinger C, Szakacs G,. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South- East Asian isolates. *Fungal Genetics and Biology*38: 310-319, 2003.

Kullnig-Gradinger CM, Szakacs G, Kubicek CP. Phylogeny and evolution of the fungal genus *Trichoderma* - a multigene approach. *Mycology Research*106: 757-767, 2002.

Küçük, C., Kivanç, M., Kinaci, E., Kinaci, G. Determination of the growth and solubilization capabilities of *Trichoderma harzianum* T1.*Biologia*. v. 63 (2). P. 167-170. 2008.

Küçük, Ç. & Kivanç, M. Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. *Turkish Journal of Biology*, 27: 247-253, 2003.

LaemmLi, UK.Cleavage of structural proteins assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, 227: 680-685,1970.

doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. Londrina. Embrapa Soja, 2005, p.1-3 (Comunicado Técnico, 76).

Le Tourneau, D. Morphology, Cytology, and Physiology of *Sclerotinia* Species in Culture. . *Phytopathology* 69, 887. 890,1979

Lima, AL. Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de *Trichoderma spp.* isolados de solo do cerrado brasileiro. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, 73p, 2002.

Lopes, FAC. *et al.*, Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology* 116, 815-824, 2012.

Low, TY., Seow, TK., Chung, MC. Separation of human erythrocyte membrane associated proteins with one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis followed by identification with matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics*. v.2, p.1229-1239, 2002.

Marra, R. *et al.*, Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. *Curr. Genet.*, 50:307-321, 2007.

Massart, S. and Jijakli, HM. Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal biocontrol agents: A review. *Journal of Microbiological Methods* 69 (2): 229-241, 2007.

McBeath, J. & Adelman, M. Taxonomy of a new *Trichoderma* found in Alaska. *Abstract. Phytopathology*, 81(10); 1151, 1991.

Medina, M.L., Kiernan U.A., Francisco W.A. Proteomic analysis of rutin-induced secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Fungal Genetics and Biology*, 41: 327-335, 2004.

Medina, M.L, Haynes, P.A. Breci, L. Francisco, W.A. Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Proteomics* 5:3153-3161, 2005.

Melo, IS. *Trichoderma* e *Gliocladium* como Bioprotetores de Plantas. In: LUZ, W.C. (ed.). Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo . R.S - EMBRAPA. v.4. p. 261 - 295. 1996.

Melo, IS & Azevedo, LJ. Controle Biológico. Volume 1- EMBRAPA, 1998.

Mendonza, DPG. Variações do secretoma de *Trichoderma harzianum* em resposta a diferentes fontes de carbono. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, 2009

Menêzes, JE., Souza, RC., Marques, GAS., Silva, JBT., Mello, SCM. Avaliação de sementes de milho no cultivo de *Trichoderma spp.* . Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Circular Técnica, 2007.

Jorff, AS., Costa, FT., Noronha, EF., Ricart, CAO., Sousa, MV., Vainstein, MR., Ulhoa, CJ. New Insights in *Trichoderma harzianum* Antagonism of Fungal Plant Pathogens by Secreted Protein Analysis. *Current Microbiology*, DOI 10.1007/s00284-010-9611-8,2010.

Pandey, A. & Mann, M. Proteomics to study genes and proteomes. *Nature*, 405: 837-846,2000.

Pardanani, A., Wieben, ED., Spelsberg, TC., Tefferi, A. Primer on medical genomics. Part IV: Expression proteomics. *Mayo Clin Proc.* v.77, p.1185-1196, 2002.

Peberdy, JF. Fungal cell walls - a review. In: Kuhn, P.J, Trinci APJ, Jung M.J, Goosey M.W (eds) *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi*. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 5. 30, 1990.

Pereira JL, Noronha EF, Miller RN, Franco OL. Novel insights in the use of hydrolytic enzymes secreted by fungi with biotechnological potential. *Letters in Applied Microbiology* 2007

Pires, CSS., Fontes, EMG., Sujii, ER. Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas: O algodão como estudo de caso. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, 2003.

Punja, ZK. & Utkhede, RS. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotechnology* 21:400-407, 2003.

Purdy, LH. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology* 69, 875-880, 1979.

Quirino, BF., Candido, ES., Campos, PF., Franco, OL., Kruger, RH. Proteomic approaches to study plant-pathogen interactions. *Phytochemistry* 71, 351-362, 2010.

Ramada, MHS., Lopes, FAC., Ulhoa, CJ., Silva, RDN. Optimized microplate  $\alpha$ -1,3-glucanase assay system for *Trichoderma spp.* screening. *Journal of Microbiological Methods* 81, 6-10,2010.

Rocha, TL., Costa, PHAD., Magalhães, JCC., Evaristo, RGS., Vasconcelos, EARD, Coutinho, MV., Paes, NS., Silva, MCMD, Grossi-De-Sá, M. De F. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. *Comunicado Técnico da Embrapa*. Brasília,2005.

Saykhedkar, S. Ray, A. , Canaan, PA., Hartson, SD., Prade, R., J Mort, A. A time course analysis of the extracellular proteome of *Aspergillus nidulans* growing on sorghum stover Saykhedkar *et al.*, *Biotechnology for Biofuels*, 2012.

Scherm, B., Schmoll, M., Balmas, V., Kubicek, CP., Migheli, C. Identification of potential marker genes for *Trichoderma harzianum* strains with high antagonistic potential against *Rhizoctonia solani* by a rapid subtraction hybridization approach. *Current Genetics* 55: 81-91,2008.

..., O., Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 68: 850-858,1996.

Shevchenko, A., Thomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, 2007.

Shuster A, Schmoll M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 87:787-799,2010

Sun, P., Yang, X.B. Light, temperature, and moisture effects on apothecium production of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* 84, 1287-1293,2000.

Suárez, M.B., Sanz, L., Chamorro, M.I., Rey, M., Conzález, F.J., Llobel, A., Monte, E. Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum* Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. *Fungal Genetics and Biology*, 42: 924-934,2005.

Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JD, Bron S, van Dijk JM. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000.

Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY, Valéro JR. Antagonistic fungi, *Trichoderma spp.*: Panoply of biological control. *The Biochemical Engineering* , 37:1-20,2007

Vieira, R.F., Júnior, T.J.P., Peres, P.A., Machado, J.C. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo. branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. *Fitopatologia Brasileira*, 26: 770-773, 2001.

Vieira, R.F., Paula Júnior, T.J., Carneiro, J.E.S., Teixeira, H., Queiroz, T.F.N., Management of white mold in type III common bean with plant spacing and fungicide. *Tropical Plant Pathology* 37, 91-101, 2012.

Viterbo A, Ramot O, Chemin L, Chet I. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma spp.* in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 549-56,2002.

Viterbo, A., Haran, S., Friesem, D., Ramot, O., Chet, I. Antifungal activity of a novel endochitinase gene (chit36) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM. *FEMS Microbiology Letters*, 200: 169-174.2001.

Vizcaíno, J.A., Gonzáles, F.J., Suárez, M.B., Redondo, J., Heinrich, J., Delgado-Jarana, J., Hermosa, R., Gutiérrez, R., Monte, E., Llobell, A., Rey, M. Generation, annotation and analysis of ESTs from *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *BMC Genomics*, 2006.

Vizcaíno, J.A., Redondo, J. Suárez, M.B., Cardoza, R.E., Hermosa, R., González F.J., Rey, M., Monte, E. Generation, annotation, and analysis of ESTs from four different

nder conditions related to biocontrol. Applied  
microbiology Biotechnology,2007.

Whipps, JM. & Lumsden, RD. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects, in: T. Butt, C. Jackson, N. Magan (Eds.), Fungal Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. CABI Publishing. p. 9-22. 2001.

Woo, SL., Scala, F., Ruocco, M., Lorito, M. The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma* spp., Phytopathogenic Fungi, and Plants. Phytopathology 96, 2006

Yang, HH., Yang, SL., Peng, KC., Lo, CT., Liu, SY. Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. Mycological Research, 113: 924-932,2009.

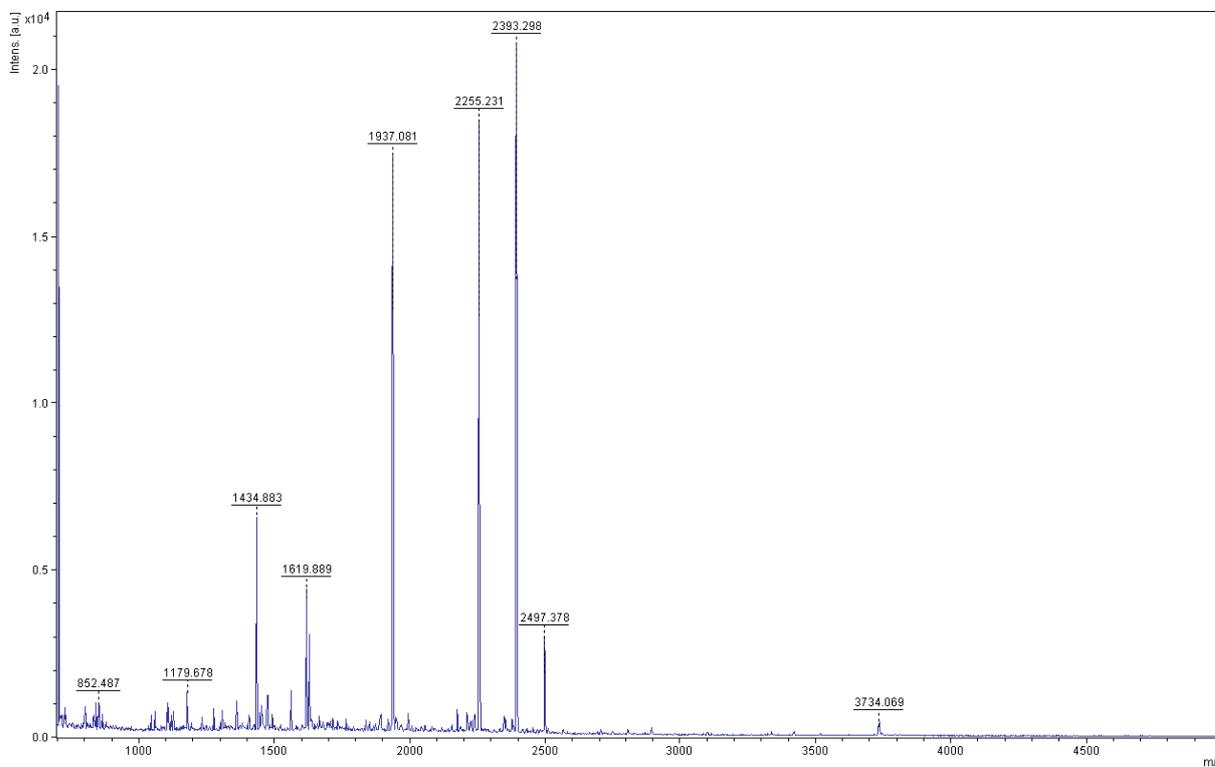


*Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.*

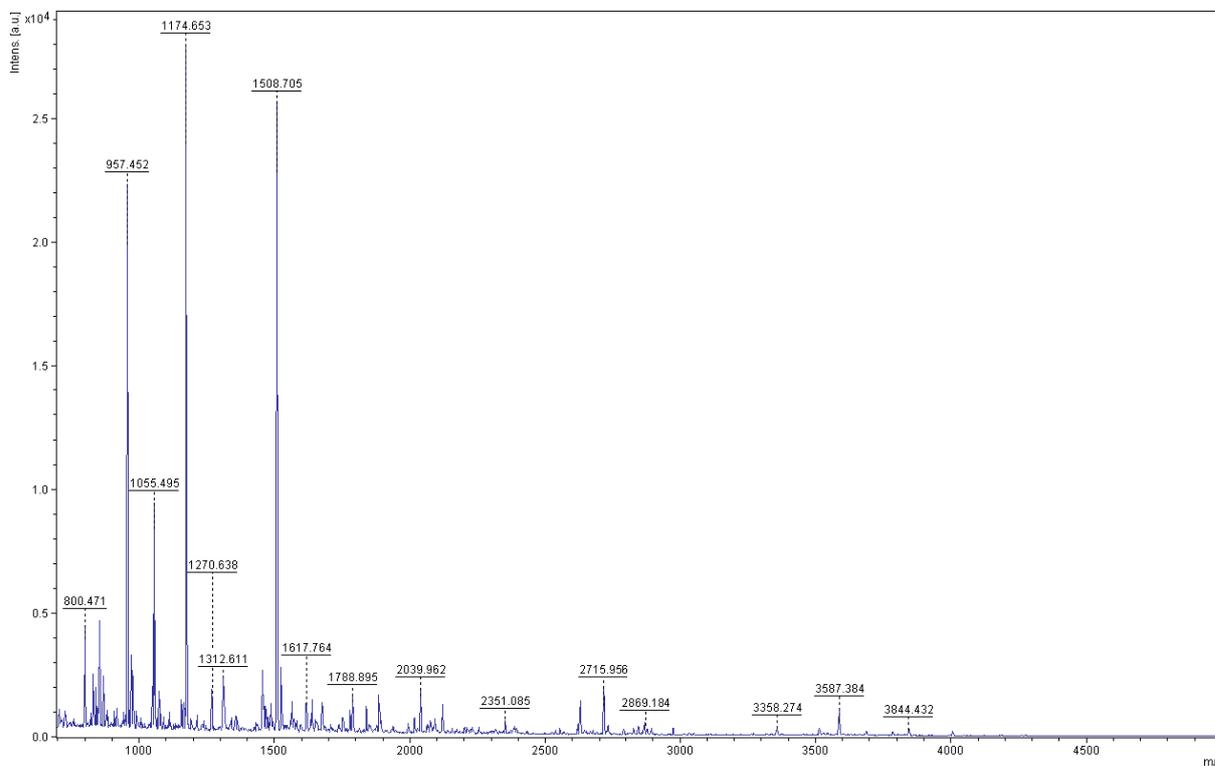
[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

## ANEXOS

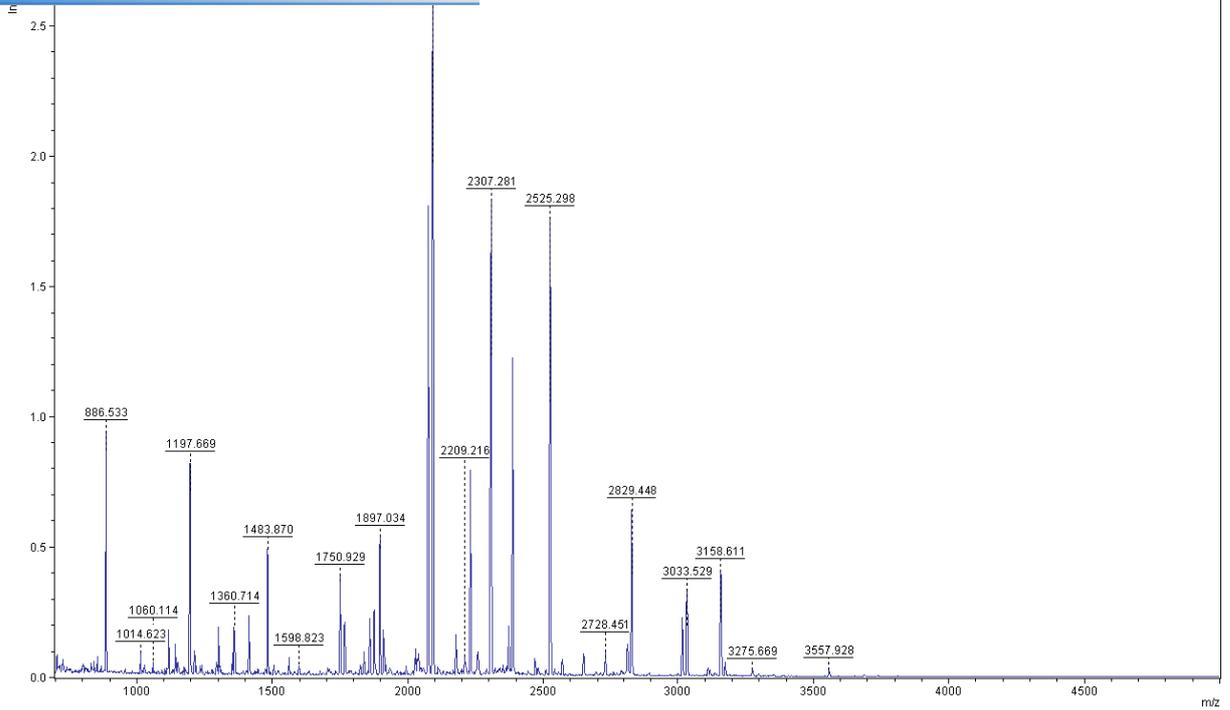
· MALDI/TOF de bandas demarcadas na figura 5.



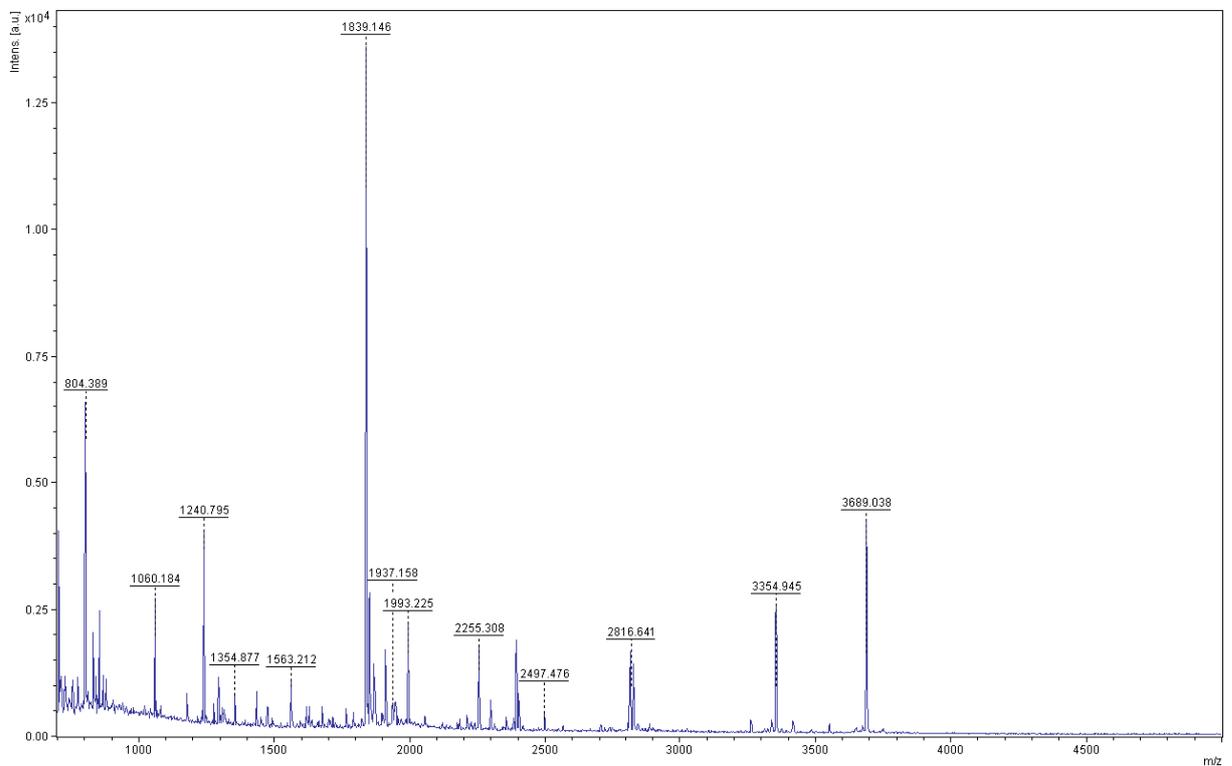
Espectro de massa por MALDI/TOF da banda T+Ss-1.



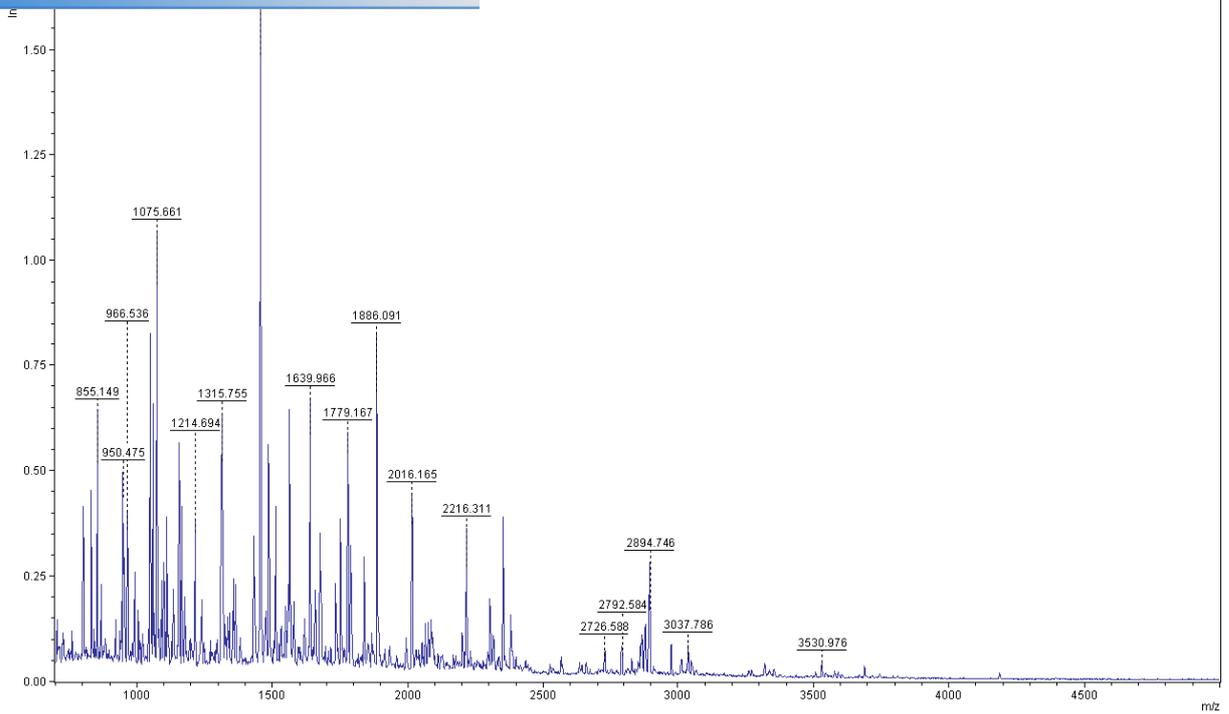
Espectro de massa por MALDI/TOF da banda T+Ss-2.



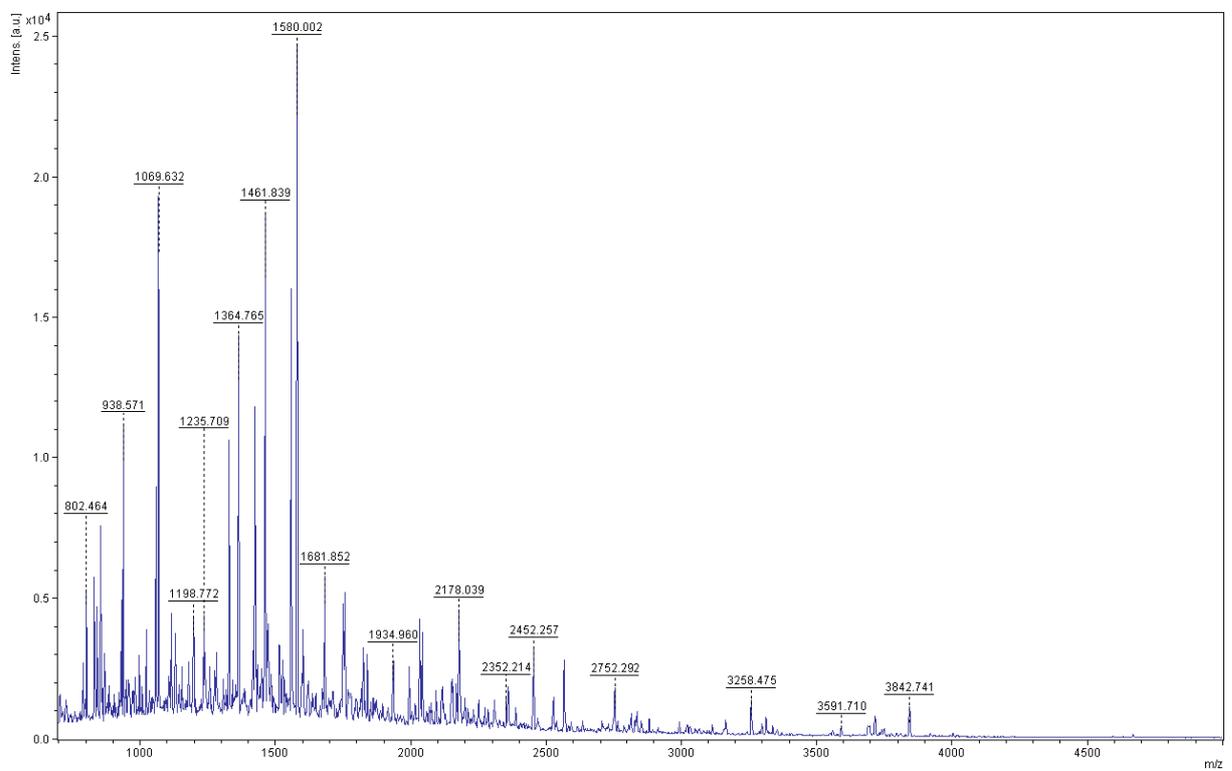
Espectro de massa por MALDI/TOF da banda T+Ss-3.



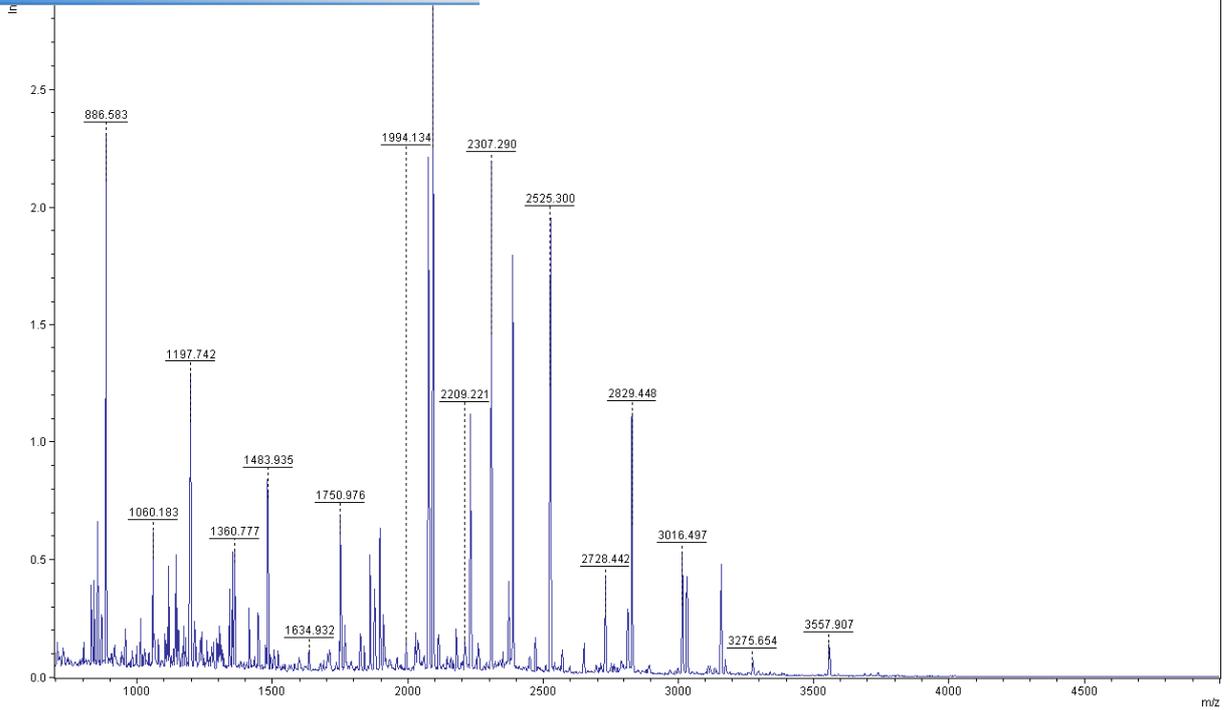
Espectro de massa por MALDI/TOF da banda T+Ss-4



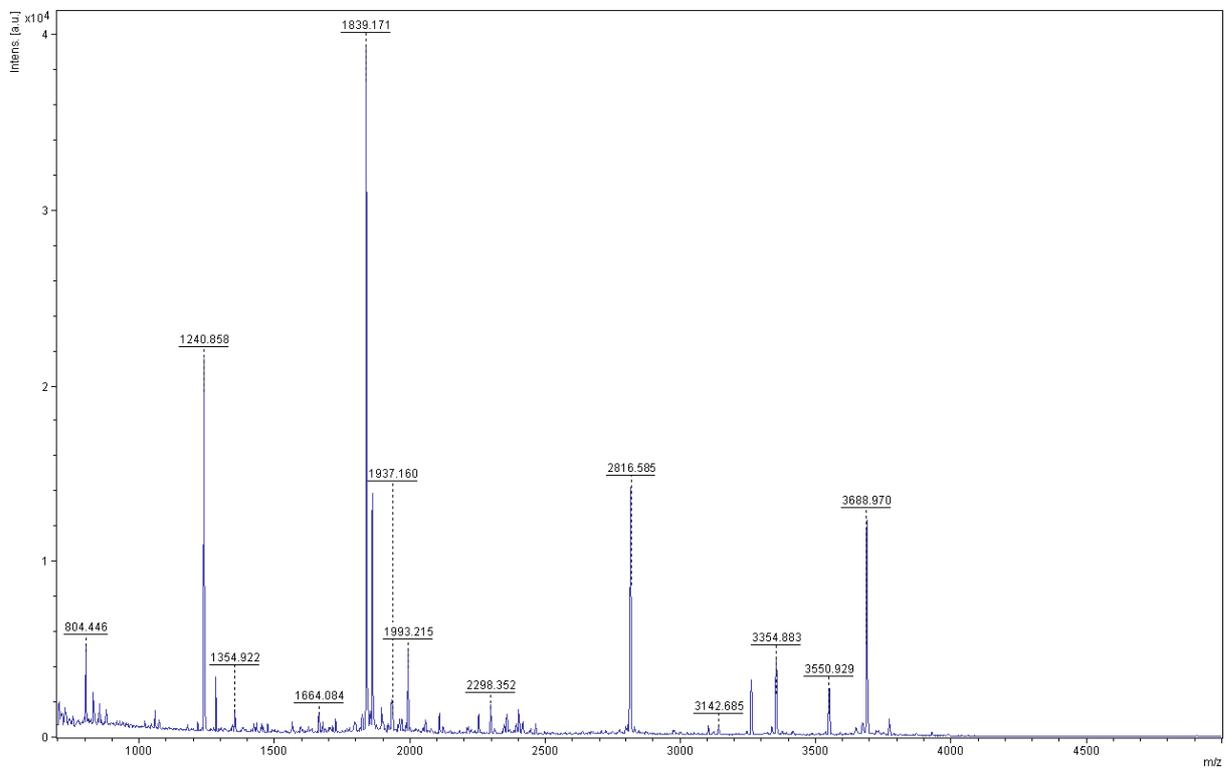
Espectro de massa por MALDI/TOF da banda T72h-1.



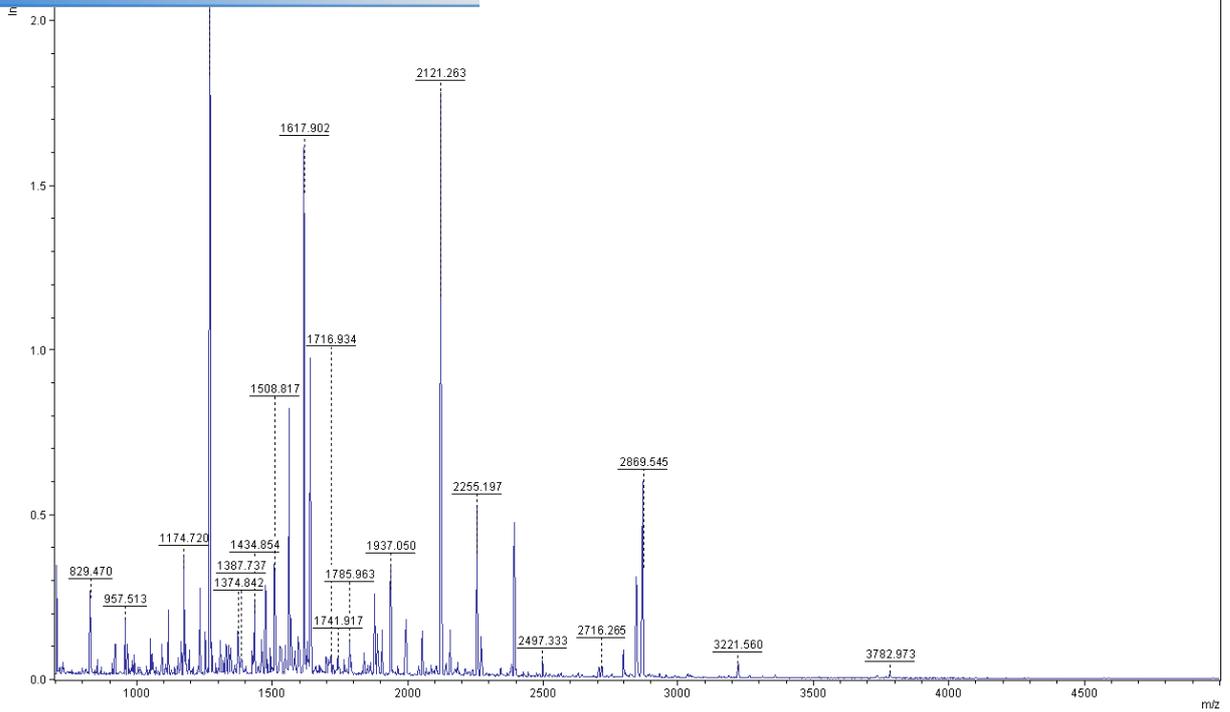
Espectro de massa por MALDI/TOF da banda T72h-2.



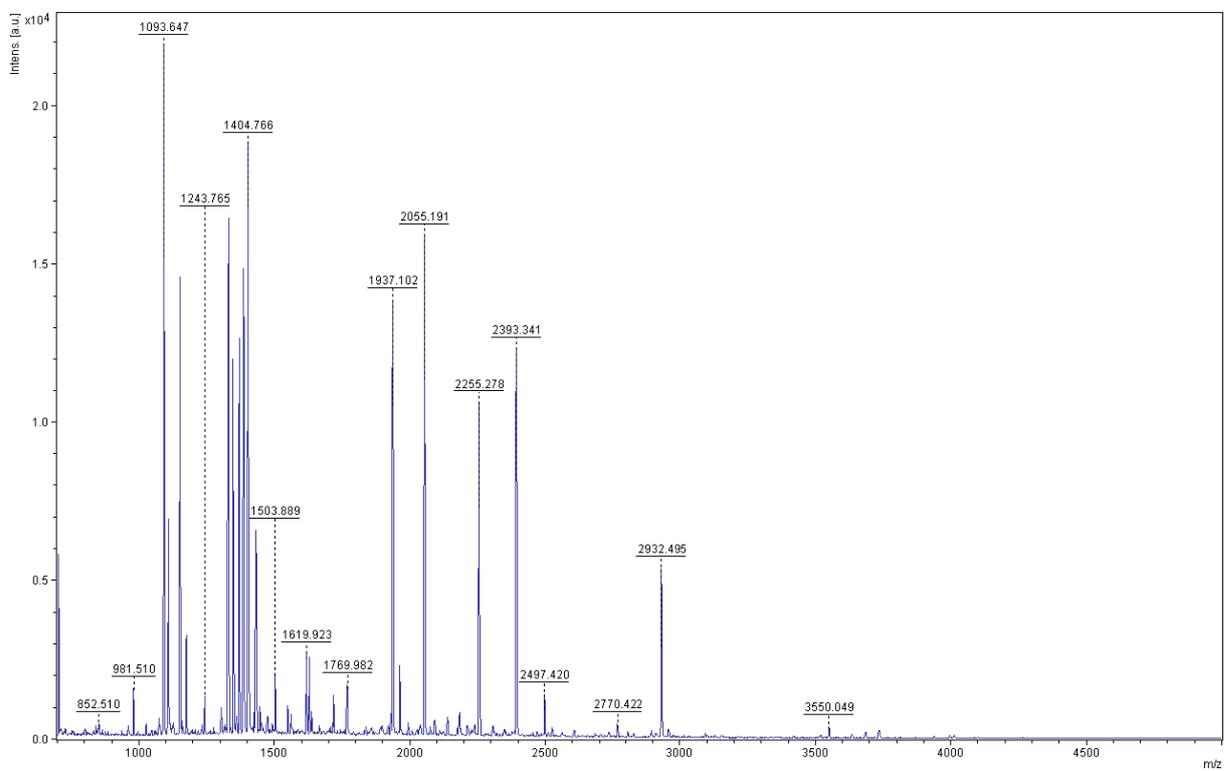
Espectro de massa por MALDI/TOF da banda T72h-3.



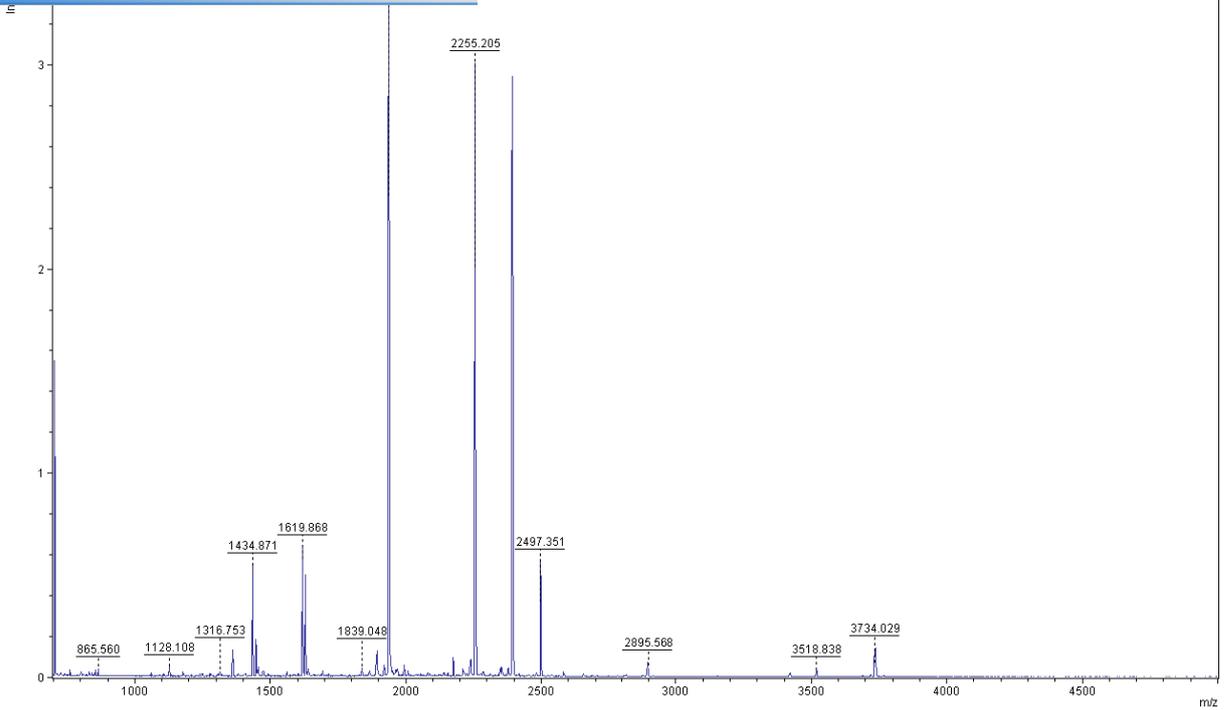
Espectro de massa por MALDI/TOF da banda T72h-4.



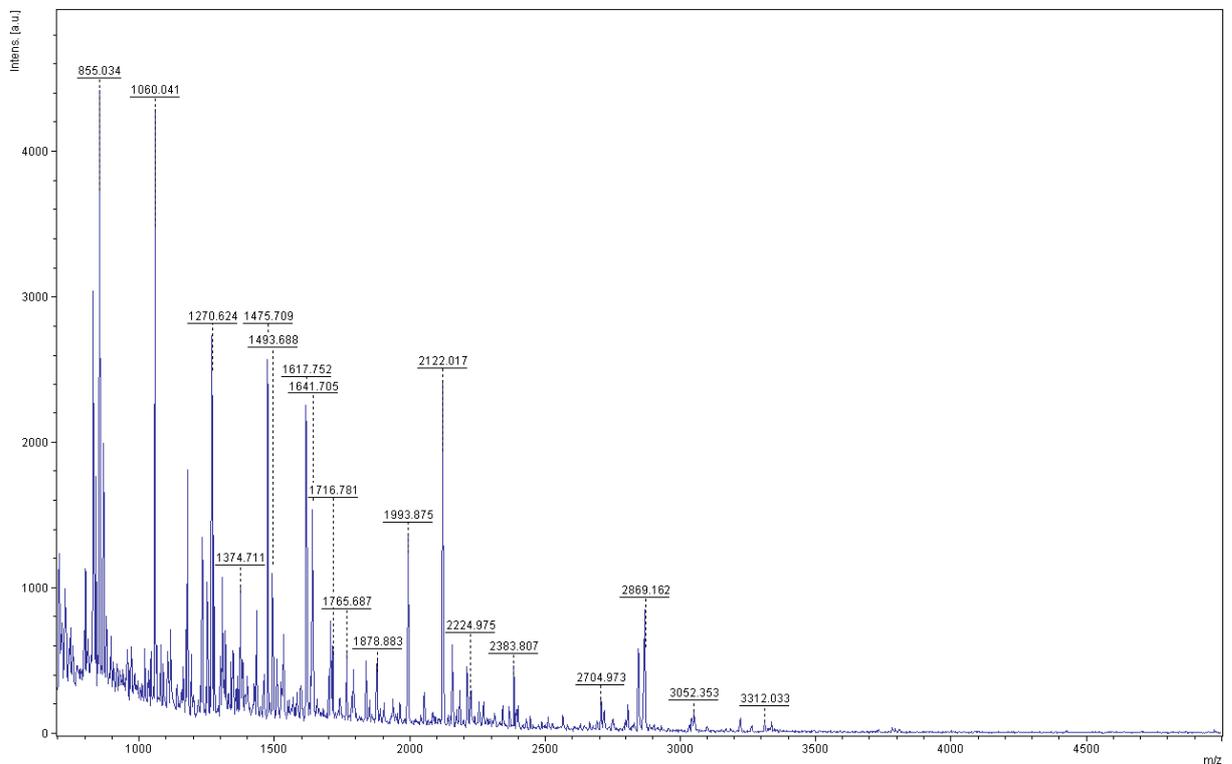
Espectro de massa por MALDI/TOF da banda Ss4d-1.



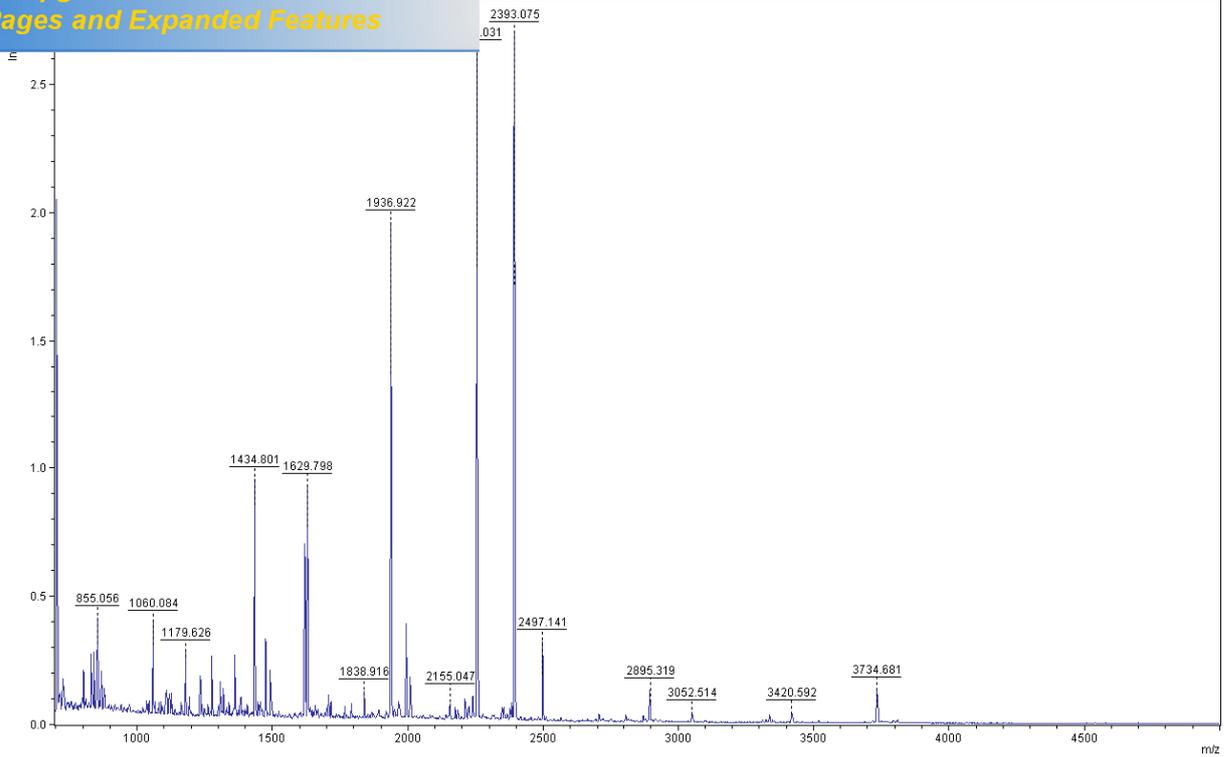
Espectro de massa por MALDI/TOF da banda Ss4d-2.



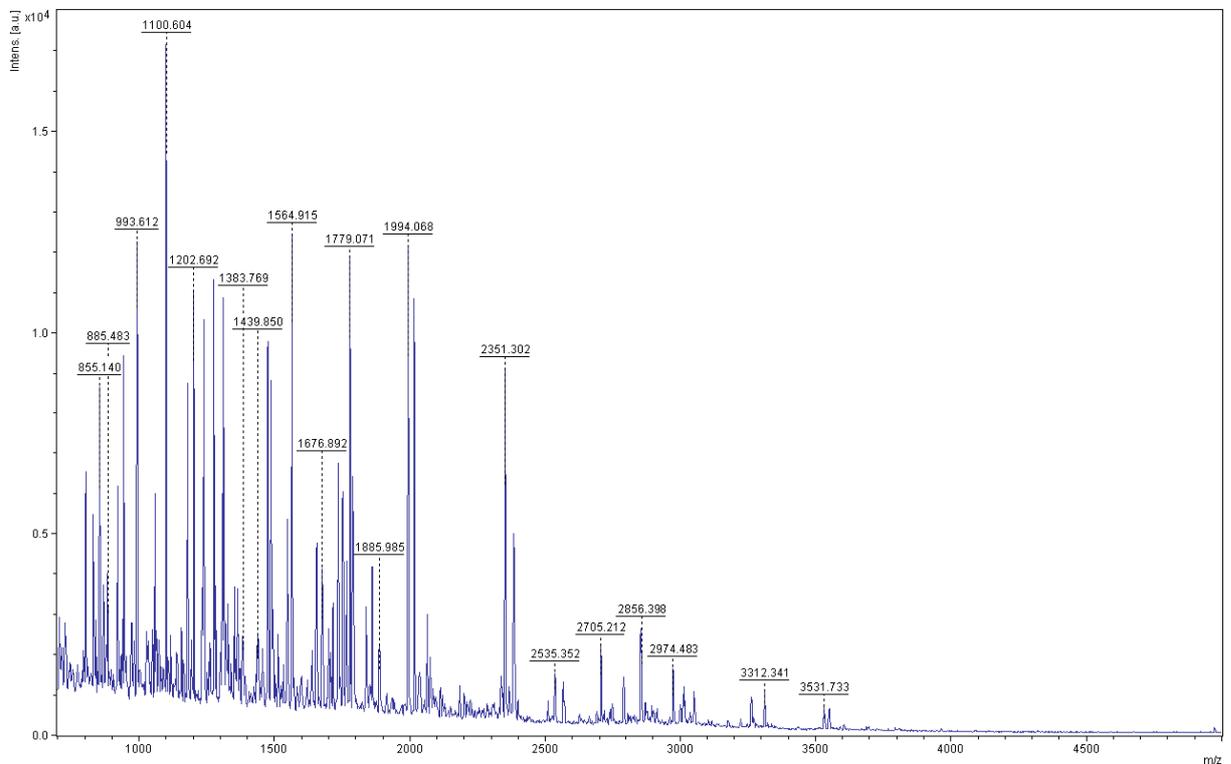
Espectro de massa por MALDI/TOF da banda Ss4d-3.



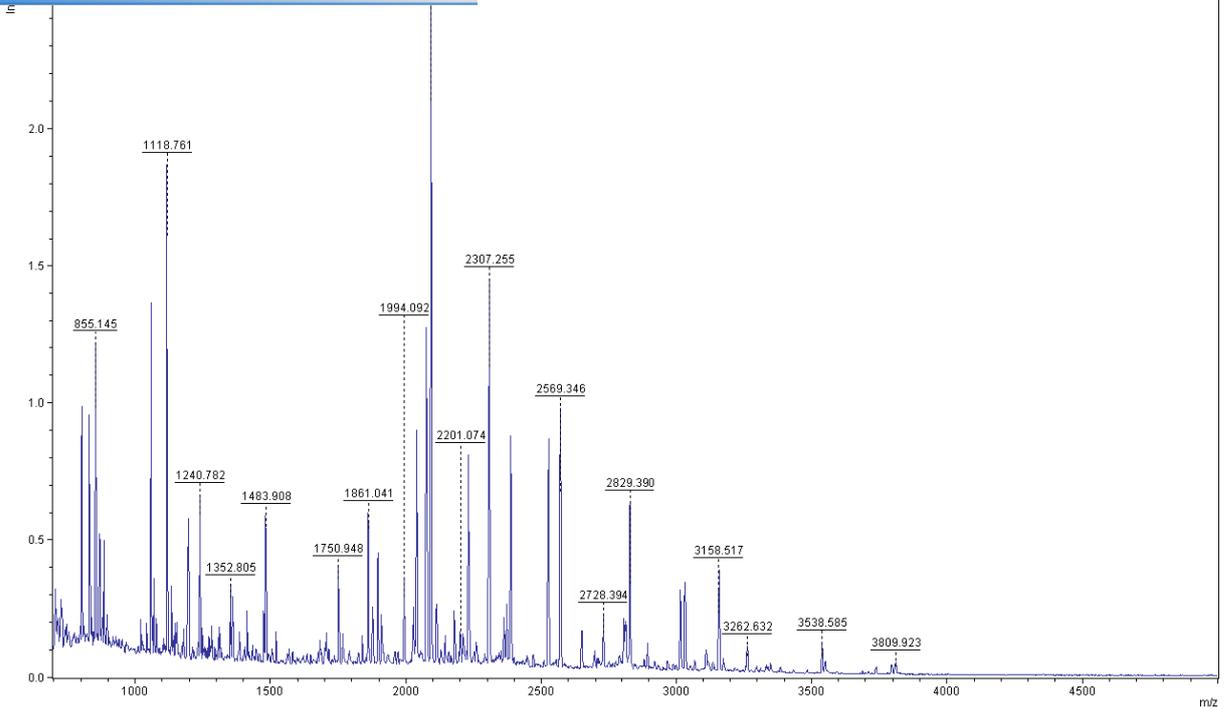
Espectro de massa por MALDI/TOF da banda Ss72h-1.



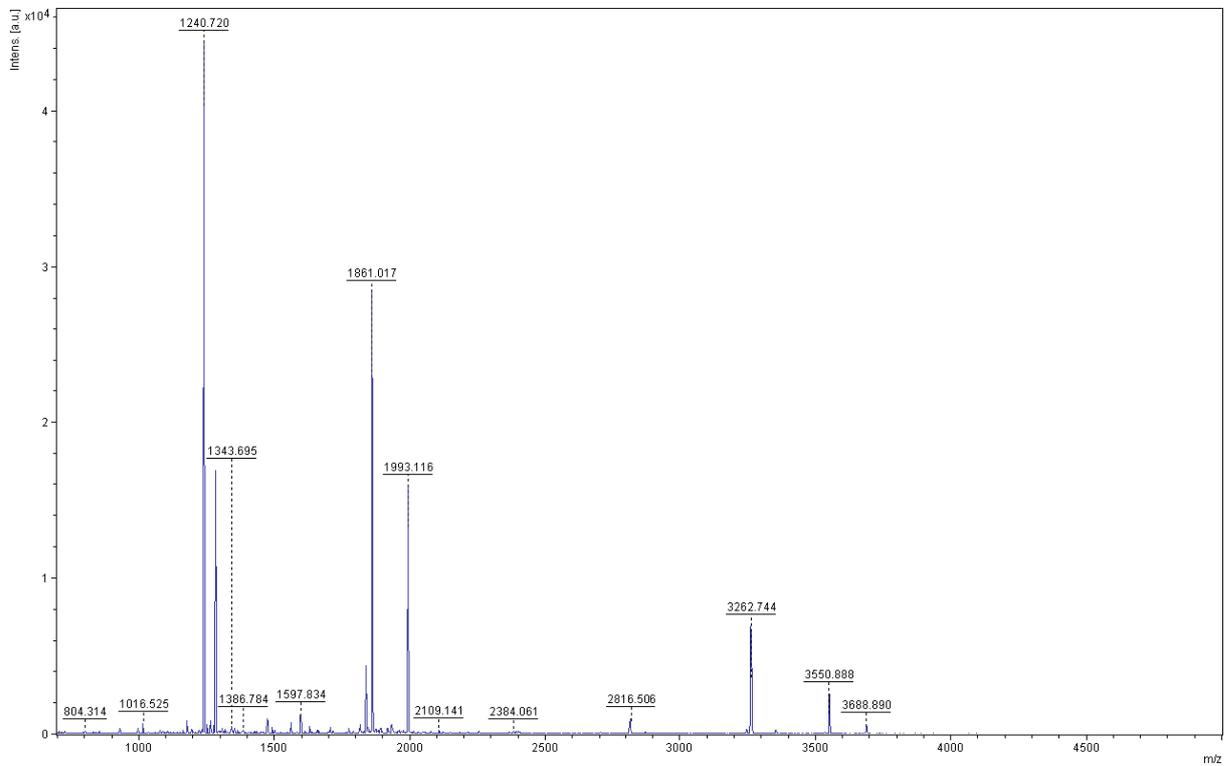
Espectro de massa por MALDI/TOF da banda Ss72h-2.



Espectro de massa por MALDI/TOF da banda T+P (Ss) -1.

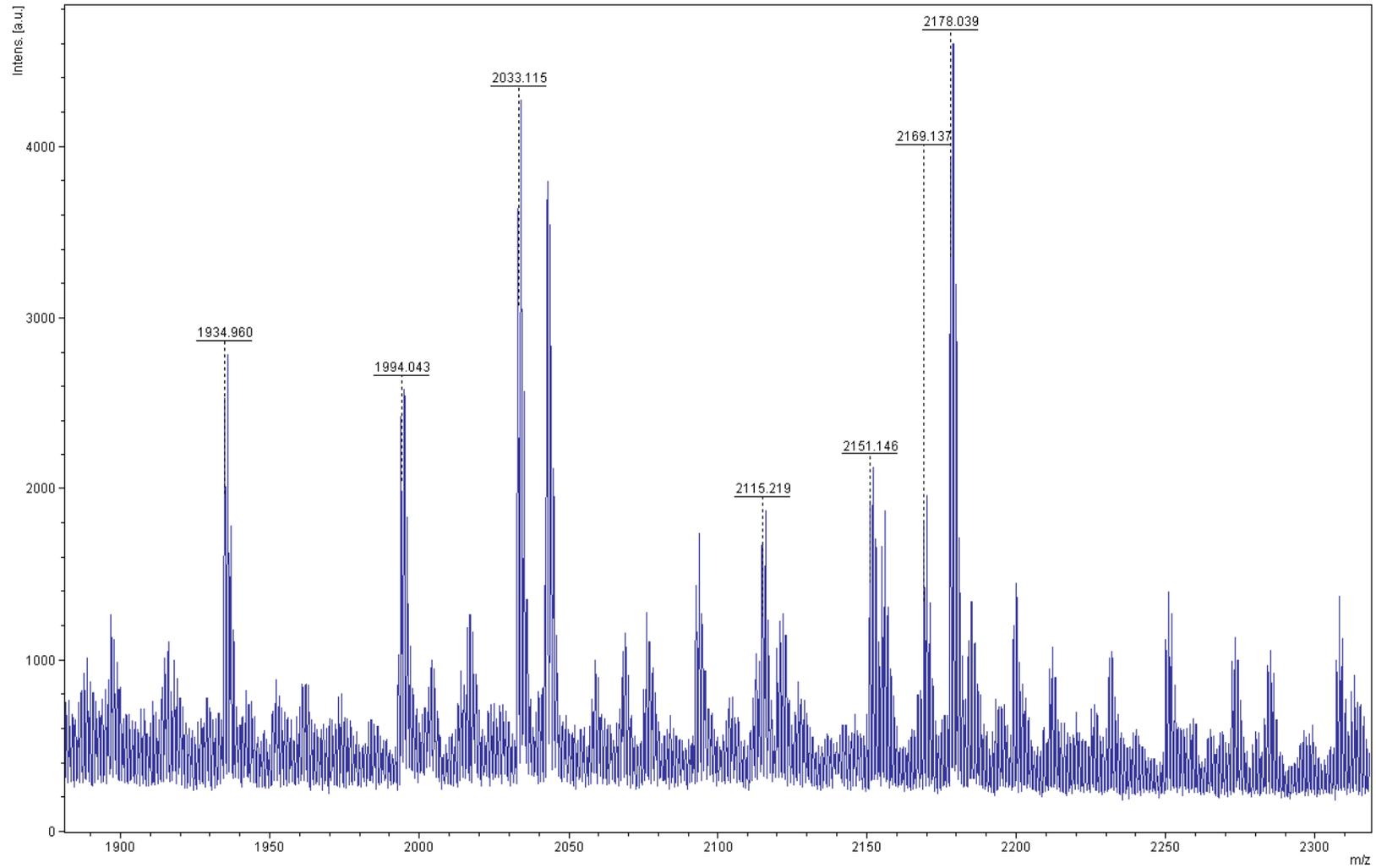


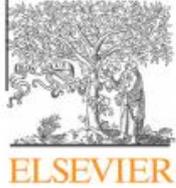
Espectro de massa por MALDI/TOF da banda T+P (Ss) -2.



Espectro de massa por MALDI/TOF da banda T+P (Ss) -3.

tro de massa por MALDI/TOF da banda T72h-2 evidenciando os demais espectros.





## Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp.



Alaerson Maia Geraldine<sup>a</sup>, Fabyano Alvares Cardoso Lopes<sup>b</sup>, Daniel Diego Costa Carvalho<sup>c</sup>, Elder Tadeu Barbosa<sup>d</sup>, Amanda Rafaela Rodrigues<sup>b</sup>, Renata Silva Brandão<sup>b</sup>, Cirano José Ulhoa<sup>b</sup>, Murillo Lobo Junior<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Graduate Program of Agronomy/Plant Protection, School of Agronomy and Food Engineering, Federal University of Goiás, Campus Samambaia, Rodovia GO-462 km 0, 74690-900 Goiânia, GO, Brazil

<sup>b</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Goiás, 74001-970 Goiânia, GO, Brazil

<sup>c</sup> Plant Pathology Department, University of Brasília, 70910-700 Brasília, DF, Brazil

<sup>d</sup> Embrapa Rice and Beans, 75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO, Brazil

Dear **Cirano Ulhoa**,

Thank you for your successful paper submission to Advances in Microbiology (AiM). Your paper information is as follows:

Login Name: [ulhoa@ufg.br](mailto:ulhoa@ufg.br)

Paper ID: 2270455

Paper Title: Analysis of *Trichoderma asperellum* (TR356) Secretome in response to Plant Pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*

Submission Time: 2014-10-08 22:17:55

Please be advised that without prior consent from AiM, this paper should not be submitted elsewhere for publication within three months of its submission to AiM

Furthermore, you are encouraged to recommend 4 reviewers with acknowledged expertise in the related research field(s). **Please send us a cover letter, including the basic information of the proposed reviewers (name, affiliation, E-mail) and the main reason(s) you recommend them. It will be great if you could also give a web page for each reviewer in the cover letter.**

Nomination of potential referees can be made via our paper submission system. You should hear from us within 30 days.

Best regards,

Editorial Assistant of AiM

Scientific Research Publishing

Email: [aim@scirp.org](mailto:aim@scirp.org)

<http://www.scirp.org/journal/aim>

Amanda R Rodrigues<sup>1</sup>, Marcelo HS Ramada<sup>2</sup>, Fabyano AC Lopes<sup>3</sup>, Cirano J Ulhoa<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás (ICB II), 74001-970, Goiânia, GO, Brasil.

<sup>2</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, PBI. Parque Estação Biológica, Asa Norte, 70910-90, Brasília, DF, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Biologia Celular, Instituto Central de Ciências Sul, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brasil.

<sup>4</sup>For correspondence: ulhoa@ufg.br; Tel (+62) 55 3521-1473

## ABSTRACT

The genus *Trichoderma* is represented by non-pathogenic soil fungi that have been studied by act as biological control agents against fungal pathogens, such as *Sclerotinia sclerotiorum*, the fungus that causes white mold, besides that, reduce environment and human health risks by being able to replace agrochemicals. Proteomic strategies with MS techniques have been important tools in studies of patterns identification for protein expression in different growth conditions. This work aims to development new strategies that enable the detection and identification of proteins secreted by *Trichoderma asperellum* (TR356) and *Sclerotinia sclerotiorum* when inoculated together and separated. The results obtained by MALDI / TOF analysis allowed the identification of a -1.3--glucanosiltransferase and -1.2-D-mannosidase, demonstrating the possibility of proteins identification for better comprehension about interaction between these organisms. It was therefore possible to identify the proteins through strategies used, but further analysis are required in order to elucidate the function and interaction of proteins secreted by the fungus *Trichoderma asperellum* TR356 against *S. sclerotiorum*.

**Keywords:** *Trichoderma asperellum*, *S. sclerotiorum*, MALDI/TOF, secretome.

## 1. Introduction

The genus *Trichoderma* is represented by non-pathogenic soil fungi, with few reports of plant diseases caused by this genus [1]. It has been studied because can act as biological control agents against fungal pathogens, such as *Sclerotinia sclerotiorum*, the fungus that causes white mold.

The potential of *Trichoderma* for biocontrol was first recognized in the 30s and since then, the genre has been extensively investigated. In recent years, the concern about the environment and health led to the need of develop more efficient methods for pathogens control, including through the biological control agents (BCAs) [2] [3] [4].

The use of *Trichoderma spp.* as biological control agent have been satisfactory, protecting plants, monocots and dicots [5] through different mechanisms of action and efficiently colonization of various species of plants. This genre is among the microorganisms more resistant to toxins synthesized by man. A positive correlation between the production of volatile metabolites and potential antagonism against *S. sclerotiorum* in studies with *Trichoderma* isolates, demonstrating that isolates that have efficient antagonism are also great producers of volatile metabolites [6].

Among many reports of antagonists against *S. sclerotiorum*, the genus *Trichoderma* has several species widely studied in biocontrol of plant pathogens [7]

Proteomic strategies have been used as a very important tool in the study of protein pattern expression under different growth conditions and interaction between *Trichoderma spp.* and pathogenic fungi [8] [9].

The research in filamentous fungi proteomics is limited due to the difficulties associated with efficient protein extraction and the lack of fungal genomic sequences in the databases. Therefore, advances in the techniques of electrophoresis and mass spectrometry, coupled with an increase in protein databases, have increased knowledge about the differential expression of proteins of fungi with biotechnological relevance to environmental variables [8] [10].

such as *Trichoderma* spp secrete proteins that are important for order to allow a greater knowledge about this protein arsenal. r demonstrating the changes occurring on protein secretion as

a result of cultivation under different conditions.

Many secreted proteins deserve attention for their potential use in industry and researches on genetic and enzyme secretion mechanisms. The secretome analysis of filamentous fungi are essential to know the identity and function of extracellular proteins that participate in pathogens cell wall degradation, aimed at biotechnological applications[11]

Currently, mass spectrometry (MS) is chosen for identification of proteins and studies of post-translational modifications under different conditions for allowing a better study of proteins and / or hundreds of proteins present in a complex mixture. In this context, the MS is analytical, identifying the chemical compound or composition of a sample by protein fragmentation and measuring charge and mass of resulting charged particles (ions), allowing identify proteins, particularly for organisms with sequenced genomes.

The potential application of MS in biological studies has been greatly extended due to the impressive advances in recent years in the areas of genomics, transcriptomics, metabolomics, proteomics, etc.[12][13]

Knowing the importance of fungi in the biological control, studies aim a better understanding of the interactions between species of *Trichoderma* and hosts, as well the understanding of the interaction of *Trichoderma* species / host plant / pathogen [14].

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Maintenance of Isolates

Were used *Trichoderma asperellum* (TR356), and *Sclerotinia sclerotiorum* collection belonging to Embrapa Rice and Beans (CPNAF). The fungi were maintained with periodic samplings in MYG medium [0.5% (w / v) malt extract, 0.25% (w / v) yeast extract, 1% (w / v) glucose and 2% (w / v) agar] and stored at 4°C.

### 2.2. Production Of Cell Wall of *S. Sclerotiorum*

For the production of cell wall, MYG discs,  $\pm 4$  mm, containing mycelium of *S. sclerotiorum* was inoculated into a 1 liter flask containing 500 mL of MYG liquid medium [0.5% (w / v) malt extract, 0.25% (w / v) yeast extract, 1% (w / v) glucose]. The flasks were incubated at 28 ° C at 180 rpm for 7 days. The mycelium from each flask was collected by filtration, autoclaved, frozen at - 20 ° C and lyophilized. At the end of lyophilization, the mycelia were macerated. Distilled water was added to the obtained powder, shaken and centrifuged at 12000 g for 15 minutes, repeated until no proteins detected.

### 2.3. Protein Production

MYG disc medium,  $\pm 4$  mm, *S. sclerotiorum* was inoculated into 250mL flasks containing 150mL of medium TLE [Bactopetona 1.0 g l-1, Urea 0.3 g l-1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0 g L 1 NH<sub>4</sub>) 2SO<sub>4</sub> 1.4 g l-1 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.3 g l-1 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0.2 g l-1, 2% (v / v) trace element solution, pH 5, 0]. The flasks were incubated in a rotary shaker at 28 ° C, speed of 180 rpm for 4 days. After this period were inoculated 5 discs,  $\pm 4$  mm, *Trichoderma asperellum* in medium containing discs of *S. sclerotiorum* by 72 h (T + Ss).

Were performed an inoculation containing *Trichoderma asperellum* alone. The flasks were incubated in a rotary shaker at 28 ° C, speed of 180 rpm for 72h (T72h). Supernatants collected from all inductions were obtained by vacuum filtration, dialyzed, centrifuged and frozen, and later used for analysis of secreted proteins. Two technical replicates and two biological replicates were made for all inductions.

### 2.4. Total Protein Dosage

Protein concentration was determined using the method described by Bradford [15] Was added 100uL of sample and 1 mL of Bradford reagent, and incubated at room temperature for 15 minutes. The reading was done on a spectrophotometer at 595nm.

### 2.5. Sample Preparation for Proteomic Maps Construction in Polyacrylamide Gel (1D).

ns, each sample carrying out 40µg protein, were lyophilized, ne to electrophoresis on polyacrylamide-dimensional (1D) in g methodology described by LaemmLi [16]. The run was for a period of 3 h at 110V. After completion, the gel was stained with Coomassie Blue for bands visualization and analysis of protein profile. The profile was determined through consideration of the molecular weight.

## 2.6. Sample Preparation From One-Dimensional Gels for Mass Spectrometry Analysis.

For mass spectrometry analysis, bands were extracted from one-dimensional gels. These bands were treated [17] with some modifications. The gels were removed from the strips and placed in 0.5 mL tubes. Then 200 µl of 25 mM ammonium bicarbonate pH 8.0 in 50% acetonitrile (v / v) were added, vortexed for 20 minutes and the supernatant discarded, procedure performed until gels pieces become completely transparent. After discarding supernatant, 100 µl acetonitrile were added to the samples and vortexed for 5 minutes. The supernatant was discarded and the samples were completely dried in a Speed-Vacuum.

To the same samples were added 40 µl of a 10 mM solution of DTT in 25 mM ammonium bicarbonate pH 8.0 and then incubated at 56 ° C for 60 minutes. After discarding the supernatant, were added 40 µl 55 mM iodoacetamide in 25 mM ammonium bicarbonate pH 8.0, these were incubated at room temperature in the dark. The supernatant was removed and 100 µl buffer 25mM ammonium bicarbonate pH 8.0 were added to each sample and stirred by vortexing for 10 minutes. After removing the supernatant, 100 µl ammonium bicarbonate 25 mM pH 8.0 in 50% acetonitrile (v / v) were added and the samples vortexed for 10 minutes. The supernatant was discarded and the samples were completely dried in a Speed-Vacuum.

Samples were stored on ice , and 15 µl a solution of trypsin-Mass V582A Gold (Promega), 10 ng / µl in buffer 25 mM ammonium bicarbonate pH 8.0 were added. After 15 minutes, 40 µl buffer 25mM ammonium bicarbonate pH 8.0 were added and the samples were incubated at 37 ° C for 16 h. The supernatant was transferred to new reaction tubes 0.5 mL. To the gel pieces were added 50 µl trifluoroacetic acid (TFA) 5% (v / v) acetonitrile and stirred by vortexing for 10 minutes. The supernatant was transferred to new tubes containing the supernatant from the previous step. This step was repeated again. The product from the trypsin digestion was completely dried in a Speed-vacuum.

The samples were resuspended in 20 µl MilliQ water and 3 µl were transferred to new tubes containing 9 mL of 0.5 µl matrix [5 mg of -cyano-4-hydroxycinnamic acid TFA 0 500 µl , 3% (v / v) / 50% acetonitrile (v / v)]. From this mixture, 0.7 µl of each sample were applied in separated spots in triplicate in a MALDI plate (Bruker Daltonics).

## 2.7. MALDI-TOF

The samples analyzed by mass spectrometry were performed in MALDI-TOF-TOF (UltraFlex III, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) controlled by FlexControl 3.0 software (Bruker Daltonics). At this stage, the sequences obtained from Flex Analysis were compared using Blast, for amino acid sequence identification. Positive reflected detection mode was used and detection range 700 - 5000 m / z, 200 rounds. The gels bands were trypsinized, mixed with a matrix solution acid -cyano-4-hydroxycinnamic acid, concentration of 10mg / mL in a ratio 1: 3 in a solid MTP AnchorChip 400/384 (Bruker Daltonics) plate and dried at room temperature environment.

The spectra of MS / MS were obtained by fragmentation via LIFT after analysis of MS spectra obtained and selection of precursor ions for fragmentation. These steps were carried out at the Laboratory of Mass Spectrometry, CENARGEN / EMBRAPA, Brasilia, DF.

## 3. Results

Supernatants were used for analysis were collected from inductions secretome. The samples were applied in a one-dimensional gel to check the protein profile. The apparent bands in the gel, were listed in ascending order (Figure 1).

Some differences were observed in the protein profiles shown in inductions T72h, T + Ss. The induction T72h corresponding proteins showed different molecular masses between 66 and 20 kDa with

was observed in the induction of T + Ss, suggesting the *Trichoderma asperellum* TR356, such as proteins of 35 kDa.

s), trypsinization was performed. Only the corresponding samples T72h-2, T + Ss-1 and T+Ss- 2 were identified. In the spectra obtained in MS T72h-2 (Figure 2) the most prominent ions have  $m/z$  1580.0 [M + H<sup>+</sup>], 1461.8 [M + H<sup>+</sup>], 1069.6 [M + H<sup>+</sup>] and 1364.7 [M + H<sup>+</sup>], and ions  $m/z$  1580.0 [M + H<sup>+</sup>] 2033.1 (Figure 4), used for analysis by MS / MS. The choice of those spectra occurred due to the fact that other ions fragmenting along, thus hampering the achievement of sequences.

The obtained spectra of T + Ss-1 (Figure 3) showed ions with higher intensities with  $m/z$  1174.6 [M + H<sup>+</sup>], 1508.7 [M + H<sup>+</sup>] and 957.4 [M + H<sup>+</sup>], but only ion with  $m/z$  1508.7 were used for analysis by MS / MS.

In the spectra T + Ss-2, the analysis identified some obvious ions. However, only the ion with  $m/z$  2393.2 [M + H<sup>+</sup>] was subject to interpretation (Figure 4). The bands T72h - 2 T + Ss -1 had proteins identified by MS / MS.

After fragmentation of ion  $m/z$  1580.2 [M + H<sup>+</sup>] from T72h-2, the sequence obtained after comparison with databases suggests a 1,3-  $\beta$ -glucanosiltransferase isolated from *T. viride*, but also not described in *Trichoderma asperellum*.

The ion with  $m/z$  1508.7 [M + H<sup>+</sup>] from T+Ss-1 was sequenced after fragmentation, and sequence obtained, after comparison with databases suggests a hypothetical protein from *S. sclerotiorum*. Ion with  $m/z$  2393.8 [M + H<sup>+</sup>] (Figure 5) from T+ Ss -2 was sequenced after fragmentation. The sequence compared with databases suggests a 1,3-  $\beta$ -glucanosiltransferase isolated from *T. viride* but not yet described in *Trichoderma asperellum*.

The sequence found from spectrum of ion  $m/z$  2033.1 [M + H<sup>+</sup>] from T72h-2 compared to databases is similar to the 1,2-  $\beta$ -D-mannosidase. The results of proteins identification can be observed in Table 1. Proteins were identified by the search software, that "find" the proteins in the databases.

#### 4. DISCUSSION

Among identified proteins, can be observed the presence of  $\beta$ -1,3-glucanosiltransferases which is a complex of proteins localized in the plasma membrane and participate in assisting biogenesis and elongation of the chain enzymes involved in cell wall integration process, and  $\beta$ -1,3-glucans, that are important to fungi growth [18]. These proteins were not related to mycoparasitism, with the need for better research so that you can understand the response mechanisms of *Trichoderma asperellum* TR356 in a stressful situation, such as when induced with *S. sclerotiorum*, and to evaluate the function of these and other proteins produced.

Protein  $\beta$ -1,2-D-mannosidase were also identified in this work, and these proteins are able to act in the degradation of the cell wall of pathogenic fungi. These enzymes are generally involved on removal of mannose residues of glycoproteins, cell wall components of fungi. This process usually leave the protein more susceptible to proteolytic action [19] and consequently generates more efficiency in degradation of fungal cell wall components.

The identified proteins comprising biologically important classes of proteins occurring in many organisms and in this case may be due to phytopathogenic fungi cell wall degradation or cases where the growth of other organisms was inhibited.

The technique of two-dimensional gel is considered the most important in studies of secreted proteins and peptides, but in the present study analyzes was performed using one-dimensional spectra to obtain test gels, which showed these various ions with  $m/z$  different allowing a comparison between the induction.

Aimed at biotechnological applications, the analyzes from one-dimensional gels assist in rapid procedures once requiring less time, less amount of protein (40 mg to one-dimensional gel and 600 mg for two-dimensional gel) and less material for fabrication. One dimensional gels can provide important and relevant to the application of *Trichoderma asperellum* TR356 information as a biological control agent. Importantly, this study is aimed at validating a method aiming at the efficient identification of secreted proteins when two organisms are inoculated together.

The present study addresses both living organisms, allowing analyzing the response of both *Trichoderma asperellum* as TR356 *S. sclerotiorum*, since most proteomic / secretome studies are conducted with cell wall of the pathogen. This methodology, therefore, allowed the identification of secreted proteins after induction with two living organisms, adds credibility to the studies about the interaction between the pathogen and biocontrol agent in the field, since there is a greater proximity to reality, taking into account possible variations that may occur in the interaction of the two microorganism, for example, inhibition of protein secretion.

While a number of publications have induced secretomas with fungal cell wall of pathogens, this study presents the induction of two living organisms for identification of secreted proteins.

Fungi of the genus *Trichoderma* are important biological control agents, so it is necessary more studies about its ability to act against pathogens.

Through more efficient methods of protein identification, the understanding of the interactions that occur in the process of mycoparasitism may add knowledge about the performance against pathogenic microorganisms.

Using MS techniques, could identify secreted proteins when the two organisms are driven together and separately, thus allowing less time and better understanding of the interaction of these organisms.

The work presents something innovative because it not only identification, but rather a method to check whether it is valid conducting the identifications of proteins under these conditions, since previous work used the cell wall of the pathogen.

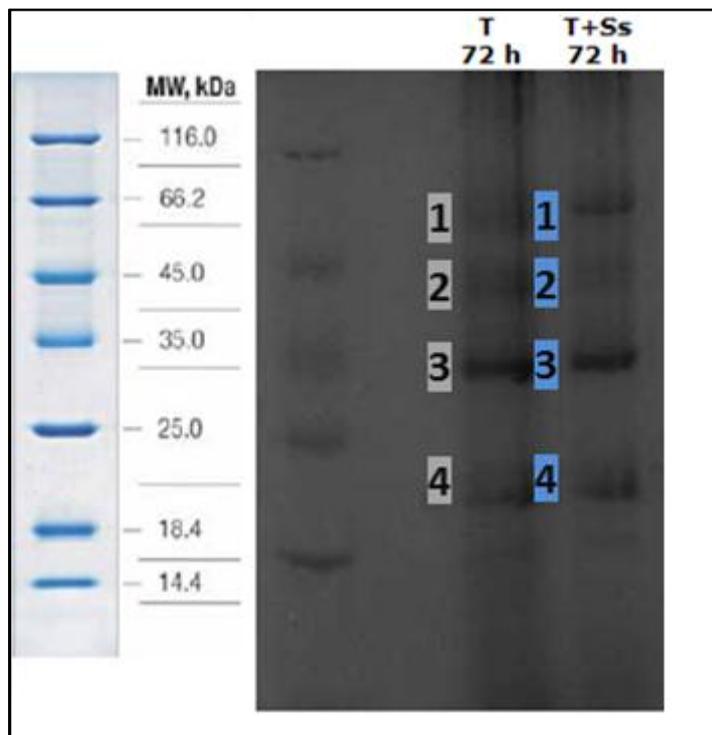


Figure 1. Protein profile of inductions among TLE in different conditions. 10% SDS PAGE. Induction of *Trichoderma asperellum* grown for 72 h in TLE medium (gray), T + Ss Induction of *Trichoderma asperellum* inoculated with *S. sclerotiorum* grown for 72 h in TLE medium (blue).



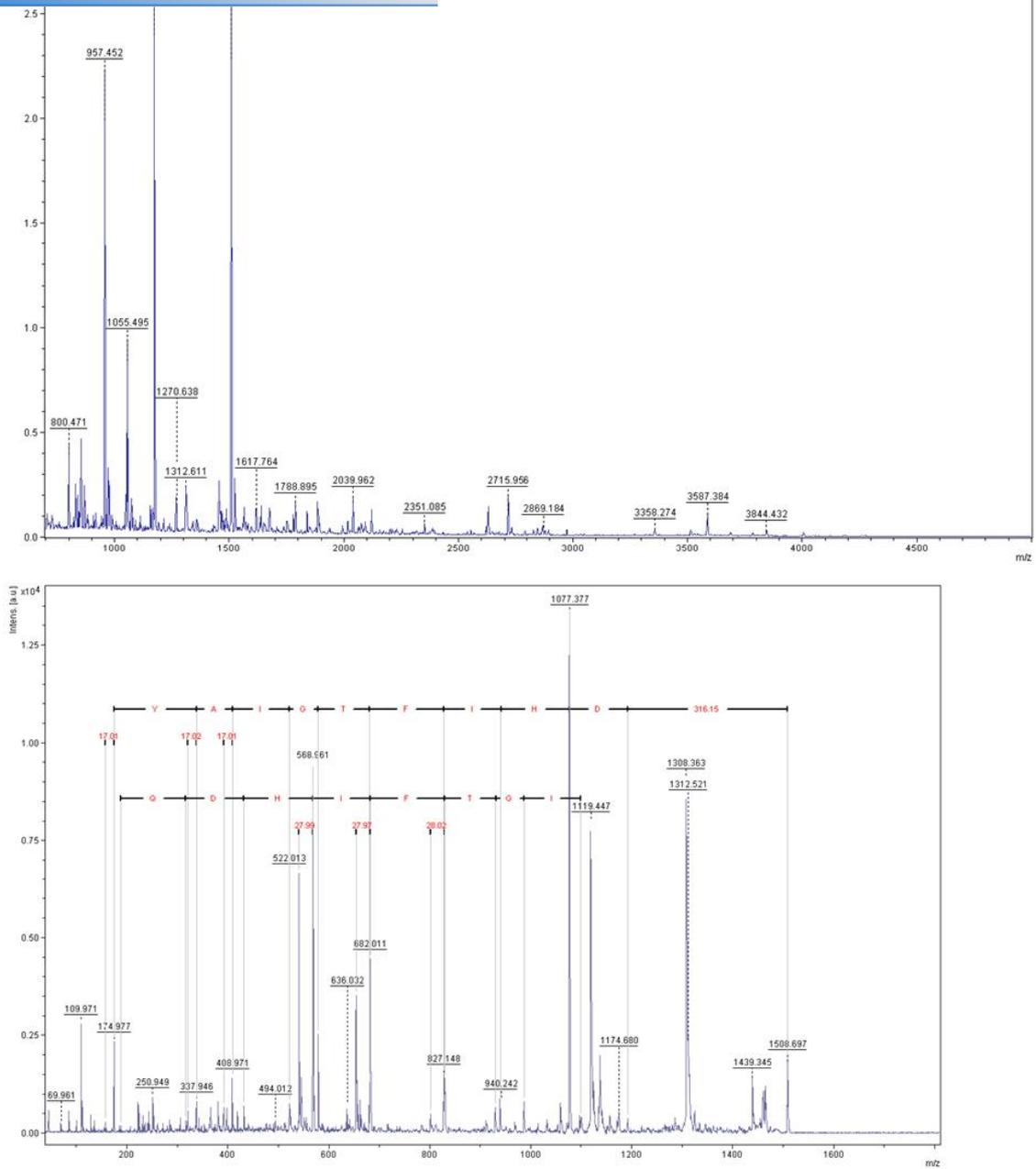


Figure 3. Ion  $m/z$  1508.6 from T+Ss-1 mass spectra interpretation, obtained by MALDI / TOF.

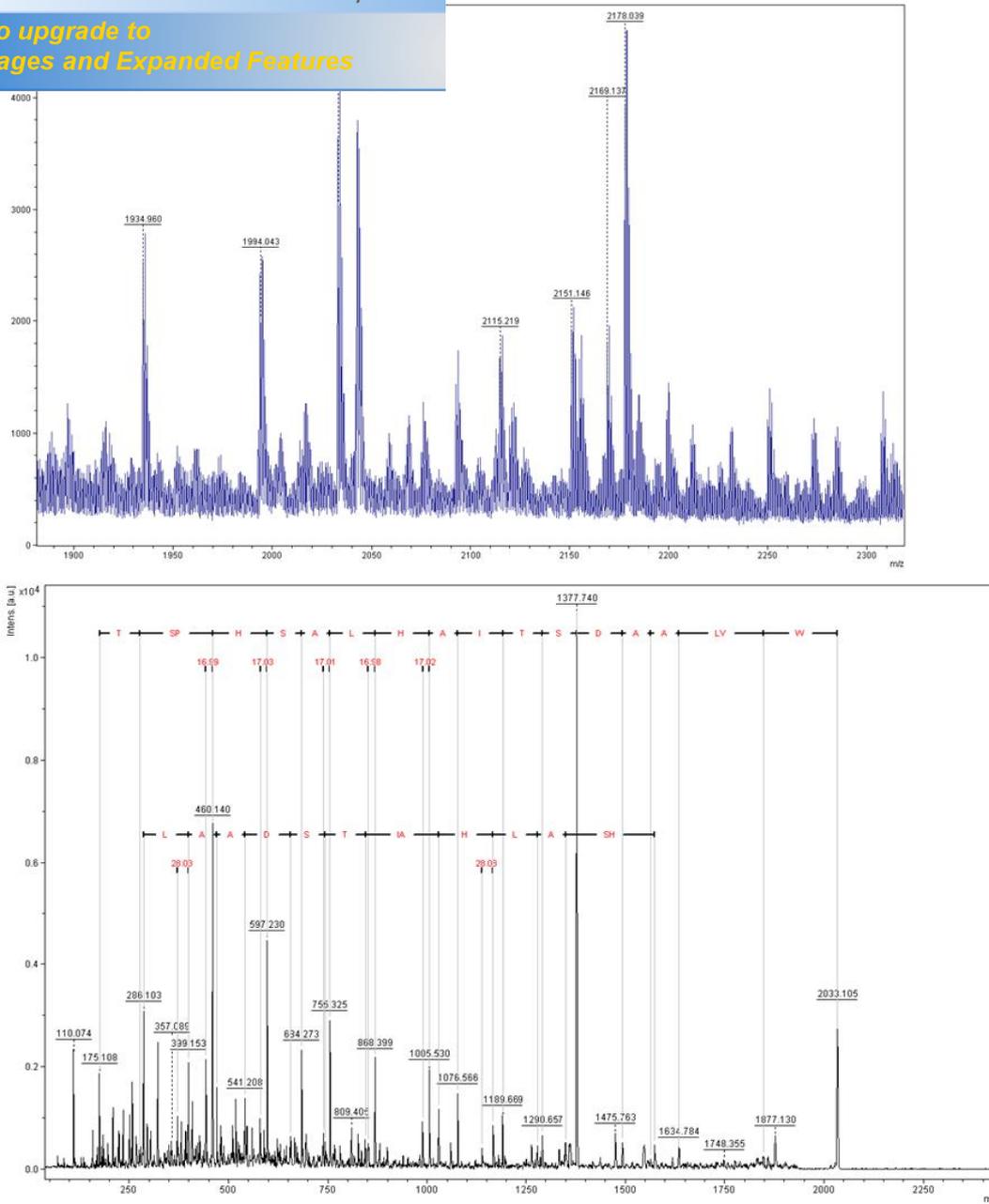


Figure 4. Ion  $m/z$  2033.1 from T72h-2 mass spectra interpretation, obtained by MALDI / TOF.

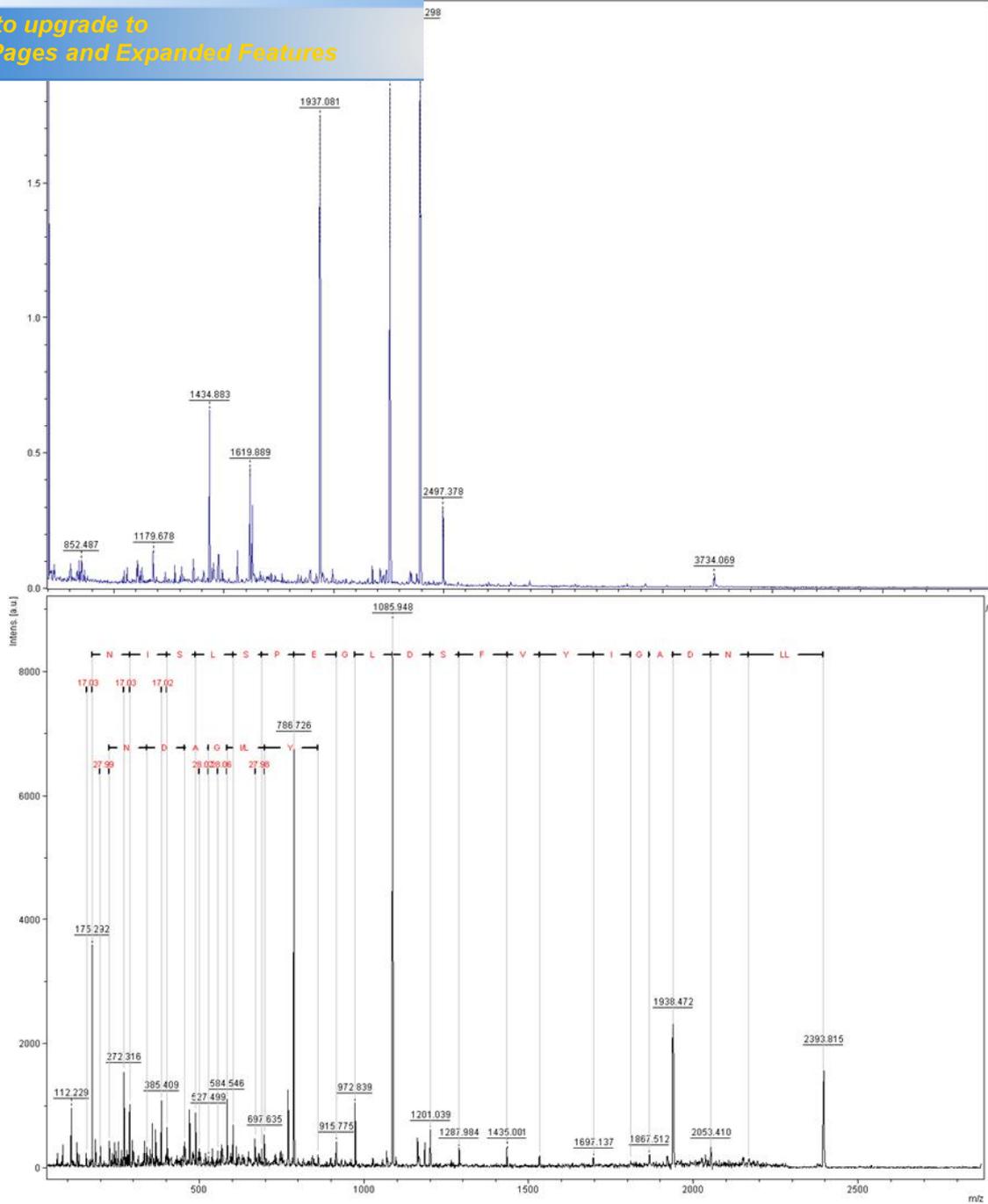


Figure 5. Ion  $m/z$  2393.8 from T+Ss-2 mass spectra interpretation, obtained by MALDI / TOF.

		Observed precursor ion [M+H <sup>+</sup> ] / Expected precursor ion [M+H <sup>+</sup> ]	Sequence	e-value	Theoretical IP and MW (kDa)	Sample	Protein Secreted
Proteína Hipotética SS1G 00730 ( <i>S. sclerotiorum</i> )	XP_001598641.1	957,46 / 957,46 1174,65 / 1174,65 1508,69 / 1508,73	NFMVYQR ALLGTSFGVPGR GMQDHIFTGIAYR	28 0,043 5,00E-05	66,45 / 4,73	T+Ss-1	Yes
Glycoside hydrolase family 72 protein - -1,3- glucanosiltransferase ( <i>T. virens</i> )	EHK19699.1	2393,81 / 2393,23	LLNDAGIYVFSDLGEP SLSINR	7,00E-13	57,15 / 4,54	T+Ss-2	Yes
Glycoside hydrolase family 72 protein - -1,3- glucanosiltransferase ( <i>T. virens</i> )	EHK19699.1	1580,27 / 1579,91	DIPLLQQLGTVNIR	0,01	57,15 / 4,54	T72h-2	Yes
Glycoside hydrolase family 47 protein - -1,2-D-mannosidase ( <i>T. virens</i> )	EHK21505.1	2033,10 / 2033,05	WVLAADSTIAHLASHPSTR	7,00E-10	55,65 / 5,37	T72h -2	Yes

Table 1. Additional information from identified proteins. The number of the NCBI access was obtained through the Protein Blast (blastp algorithm) using the database of non-redundant database (NCBIInr - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). [M + H +] Observed - ions precursors used for peptide fragmentation. [M + H +] Expected - precursor ions generated from the expected mass tools highlighting the accuracy of the obtained peptides ([http://web.expasy.org/peptide\\_mass](http://web.expasy.org/peptide_mass)). kDa - molecular masses. PI - theoretical isoelectric points observed from sequences obtained from the NCBIInr. Secretion signal peptide obtained by the SignalP tool

## REFERENCES

- [1] Kubicek, CP. *et al.*, (2001) *Trichoderma*: From genestobiocontrol. The Journal of Plant Pathology, 83(2):11-23.
- [2] Howell, CR. (2002) Cotton seedling pre emergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. Phytopathology, 92:177-180.
- [3] Verma, M., Brar, SK., Tyagi, RD., Surampalli, RY., Valéro JR. (2007) Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control.
- [4] Shuster A, Schmoll M. (2010) Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Applied Microbiology Biotechnology, 87:787-799.
- [5] Harman, GE., Howell, CR., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. (2004) *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology 2, 43-56.
- [6] Lopes, FAC. *et al.* (2012) Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. Fungal Biology 116, 815-824.
- [7] Menêzes, JE., Souza, RC., Marques, GAS., Silva, JBT., Mello, SCM. (2007) Avaliação de sementes de milho no cultivo de *Trichoderma* spp. . Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Circular Técnica.
- [8] Grinyer, J., Hunt, S., McKay, M., Herbert, BR., Nevalainen, H. (2005) Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. Current Genetics, 47: 381-388.
- [9] Marra, R. *et al.* (2007) Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. Current Genetics, 50:307-321.
- [10] Carberry, S., Neville, CM., Kavanagh, KA., Doyle, S. (2007) Analysis of major intracellular proteins of *Aspergillus fumigatus* by MALDI mass spectrometry: identification and characterisation of an elongation factor 1B protein with glutathione transferase activity. Biochemical and Biophysical Research Communications.
- [11] Bouws, H., Wattenberg, A., Zorn, H. (2008) Fungal secretomes--nature's toolbox for white biotechnology. Applied Microbiology Biotechnology.
- [12] Hoffmann, E.; Stroobart, V. (2007) Mass spectrometry: principles and applications. 3. Ed. West Sussex, England: Wiley-Interscience.
- [13] Feng, X., Liu, X., Luo, Q., Liu, B. F. (2008) Mass spectrometry in systems biology: an overview. Mass Spectrometry Reviews, v. 27, n. 6, p. 635-60.
- [14] Grinyer, J., McKay, M., Nevalainen, H., Herbert, B.R. (2004a) Fungal proteomics: initial mapping of biological control strain *Trichoderma harzianum*. Current Genetics, 45: 163-169.
- [15] Bradford, MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.



Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

uctural proteins assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature,

[17] Shevchenko, A., Thomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., Mann, M. (2007) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nature Protocols.

[18] Hurtado-Guerrero, R., Schuttelkopf, A.W., Mouyna, I., Ibrahim, A.F.M., Shepherd, S., Fontaine, T., Latgé, J.P., Van Aalten, D.M.F. (2009). Molecular mechanisms of yeast cell wall glucan remodeling. The Journal of Biological Chemistry, 284: 8461-8469.

[19] Barros, M.C. de, Silva, R.N., Ramada, M.H.S., Galdino, A.S., Moraes, L.M.P. de, Torres, F.A.G., Ulhoa, C.J. (2009) The influence of N-glycosylation on biochemical properties of Amy1, an  $\alpha$ -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. Carbohydrate Research, 344: 1682-1686.