



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

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DA FORMAÇÃO DE
ESCLERÓDIOS DO FUNGO *Sclerotinia sclerotiorum***

BRUNA SOUSA MELO

GOIÂNIA-GO

2019



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

Bruna Sousa Melo

3. Título do trabalho

Análise morfológica e molecular da formação de escleródios no fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Cirano José Ulhôa, Professor do Magistério Superior**, em 21/07/2020, às 15:44, conforme horário oficial de



Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **BRUNA SOUSA MELO, Discente**, em 21/07/2020, às 17:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1448976** e o código CRC **6AC6C812**.

Referência: Processo nº 23070.032475/2020-99

SEI nº 1448976

BRUNA SOUSA MELO

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DA FORMAÇÃO DE
ESCLERÓDIOS DO FUNGO *Sclerotinia sclerotiorum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica e Genética

Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

Co-orientadora: Prof.^aDra. Aline Raquel Voltan

GOIÂNIA-GO

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Melo, Bruna Sousa
Análise Morfológica e molecular da formação de escleródios do fungo
Sclerotinia sclerotiorum [manuscrito] / Bruna Sousa Melo, Aline
Raquel Voltan, Cirano José Ulhoa. - 2019.
7, 49 f.

Orientador: Prof. Cirano José Ulhoa; co-orientador Aline Raquel
Voltan.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia,
Goiânia, 2019.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, lista de figuras.

1. *Sclerotinia sclerotiorum*. 2. mofo branco. 3. fitopatígeno. 4.
controle. 5. melanina. I. Voltan, Aline Raquel. II. Ulhoa, Cirano José.
III. Ulhoa, Cirano José, orient. IV. Voltan, Aline Raquel, co-orient. V.
Título.

CDU 577.1



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

1 **ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 494**
2 Aos vinte e nove dias do mês de março do ano de dois mil e dezenove, às
3 treze horas e trinta minutos, no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas II
4 da Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os componentes da banca
5 examinadora: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa, Prof. Dr. Murillo Lobo Junior e Profa.
6 Dra. Raphaela de Castro Georg para, em sessão pública presidida pelo primeiro
7 examinador citado, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada
8 "Análise morfológica e molecular da formação de escleródios do fungo
9 *Sclerotinia sclerotiorum*", em nível de mestrado, área de concentração em
10 Bioquímica e Genética, de autoria de **Bruna Sousa Melo**, discente do
11 Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de
12 Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente, que fez a apresentação formal dos
13 membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora da dissertação
14 que em cerca de 40 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho.
15 Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada,
16 tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de
17 arguição, procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que
18 consta na Resolução nº1491 de 2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa,
19 Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação
20 em Ciências Biológicas, a dissertação foi aprovada, considerando-se
21 integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de
22 Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão
23 do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da dissertação na
24 Secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas pela banca
25 examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as
26 formalidades de pauta, às 16 horas e 05 minutos, encerrou-



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

27 se a sessão de defesa de dissertação e, para constar, eu, Renato César
28 Rodrigues, Assistente em Administração da Secretaria de Pós-graduação do
29 Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, lavrei a
30 presente ata que, após lida e aprovada, será assinada pelos membros da
31 banca examinadora em três vias de igual teor.

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45


Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

Presidente da Banca

Universidade Federal de Goiás


Prof. Dr. Murillo Lobo Junior

Embrapa Arroz e Feijão


Profa. Dra. Raphaela de Castro Georg

Universidade Federal de Goiás

UFG

BRUNA SOUSA MELO

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DA FORMAÇÃO DE
ESCLERÓDIOS DO FUNGO *Sclerotinia sclerotiorum***

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dra. Raphaela de Castro Georg
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Murillo Lobo Junior
Embrapa Arroz e Feijão

Aprovada em: ____/____/____

Agradecimentos

Primeiramente a Deus pelo dom da vida, pois sem ele nada seria possível! Gratidão a minha família, que sempre me incentivou, especialmente meus pais Juscelino e Nilda, meu irmão Matheus, minha avó Nice, minha madrinha Neide, meus primos Cássio e Amanda, aos meus padrinhos Nilva e Francisco.

As minhas amigas, que a faculdade me apresentou e que compartilhamos tantos momentos, Dryelle e Maingredy.

Agradeço ao professor Cirano, que abriu as portas do seu lab. para mim, um exemplo de ser humano. Obrigada por acreditar em mim, mesmo quando nem eu mesma acreditava. Obrigada por tanto incentivo, paciência e compreensão, por me ensinar tanto, o senhor é exemplo de profissional e humildade!

Gratidão imensa a Aline, compartilhamos muitos momentos juntas e sempre me auxiliando em tudo que precisava um exemplo de profissional. Uma amizade que sempre quero guardar comigo, obrigada por tantas palavras, pela paciência, pela acolhida, conselhos.

Não poderia deixar de agradecer a elas, compartilhamos muitos momentos no laboratório: Thuana, Érica, Leticia, Camila, Priscila, Marcela. Minha gratidão especial a Leticia e ao Sidnei que sempre com muita paciência e disposição, me auxiliaram. Obrigada por tudo!

Gratidão especial também ao Fabiano e a professora Valdirene, obrigada por toda disposição, pelos conselhos! Muito obrigada por sempre acreditarem em mim!

Agradeço à professora Raphaela, por ser exemplo de profissional. Obrigada por me ensinar tanto!

À professora Walkiria, por tanto auxílio e aprendizagem! Ao Murillo por todas as sugestões a esse trabalho. Aos professores Fernanda e Manoel, por permitir que parte dessa pesquisa fosse realizada em seu laboratório e também ao LabMic.

À Stephanie, que também se tornou uma amiga ao longo desse período, obrigada por tudo!

Ao PPGCB pela oportunidade, ao Renato pela disposição em ajudar sempre que precisamos, a CAPES, pelo apoio financeiro!

Enfim, a todos que fazem parte da minha vida e me acompanharam nessa trajetória. Gratidão a Deus por essa oportunidade e por ter me apresentado tantas pessoas especiais e que tanto me ensinaram e ensinam!

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | VII |
| LISTA DE FIGURAS | VIII |
| RESUMO..... | X |
| ABSTRACT | XI |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Sclerotinia sclerotiorum..... | 2 |
| 1.2 Formação de escleródio | 3 |
| 1.3 Ciclo de vida de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> | 4 |
| 1.4 A melanina em <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> | 7 |
| 1.5 Controle da Doença | 8 |
| 1.6 <i>Trichoderma</i> spp. como controle biológico..... | 10 |
| 1.7 Metabólitos secundários em <i>Trichoderma</i> spp. | 11 |
| 2. OBJETIVOS | 12 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 12 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 12 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 13 |
| 3.1 Microorganismos utilizados e condições de cultura..... | 13 |
| 3.2 Análise da morfologia e desenvolvimento dos escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> | 13 |
| 3.2.1 Processamento dos escleródios | 13 |
| 3.2.2 Técnicas Histoquímicas | 13 |
| 3.2.2.1 Coloração de PAS (Ácido Periódico de Schiff) | 13 |
| 3.2.2.2 Coloração de Lillie | 14 |
| 3.2.2.3 Coloração de Azul de Toluidina | 14 |
| 3.2.2.4 Coloração de Xylidine Ponceau..... | 14 |
| 3.2.2.5 Coloração de Azul de Bromofenol | 14 |
| 3.2.3 Microscopia de Fluorescência com Calcoflúor White | 14 |

| | |
|--|----|
| 3.2.4 Microscopia de Eletrônica de Varredura (MEV) | 15 |
| 3.3 Análise da Expressão gênica do desenvolvimento do escleródio em <i>S. sclerotiorum</i> | 15 |
| 3.3.1 PCR em tempo real | 16 |
| 3.3.2 Análise Estatística | 17 |
| 3.4 Ensaio de inibição do crescimento de <i>S. sclerotiorum</i> com filtrado de <i>Trichoderma harzianum</i> (ALL 42) e <i>Trichoderma Asperellum</i> (T00)..... | 18 |
| 4. RESULTADOS | 20 |
| 4.1 Análise morfológica dos escleródios | 20 |
| 4.2 Análise morfológica do desenvolvimento do escleródio por MEV | 23 |
| 5.0 Análise da expressão gênica do desenvolvimento do escleródio..... | 27 |
| 6.0 Análise do Ensaio de inibição do crescimento de <i>S. sclerotiorum</i> | 31 |
| 5.DISSCUSSÃO..... | 33 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 45 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 46 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - porcentagem
cDNAs - DNA complementares
 μg - micrograma
 μL – microlitro
dNTP's – Deoxinucleotídeos tri-fosfatados
M – Molar
mL – mililitro
 $^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius
RNA - ácido ribonucleico
rpm – rotações por minuto
PCR – Reação em cadeia da polimerase
AMPC ou cAMP - Adenosina monofosfato cíclico
ATP - Adenosina trifosfato
MEV - Microscópio eletrônico de varredura
DNase – Desoxirribonuclease
DNH – Dihidroinaftaleno
pks – Policetídeo sintase
lac – Laccase
qs – Quitina Sintase
S/D – Sem diluição
PAS – Ácido Periódico de Schiff
DOPA - Diidroxifenilalanina
hq- Histidina Quinase
tir - Tirosinase
ac - Adenilato Ciclase
chist – quitina sintase
glucst – glucana sintase
chit - quitinase

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Placa com crescimento de <i>S. sclerotiorum</i> com escleródios melanizados e não melanizados. | 3 |
| Figura 2. Ciclo de vida da <i>S. sclerotiorum</i> . Adaptado de Wharton e Kirk (2007)..... | 6 |
| Figura 3. Lesões por <i>S. sclerotiorum</i> em hastes de plantas, na forma de micélio e escleródios (A-B). Escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> em grãos colhidos (C)..... | 6 |
| Figura 4. Vias de síntese de melanina. A - Via de síntese DHN-melanina (dihidroxi-naftaleno)..... | 8 |
| Figura 5. Fotomicrografia do escleródio não melanizado e melanizado com coloração de Lillie, setas evidenciando a presença de melanina na superfície..... | 20 |
| Figura 6. Fotomicrografia do escleródio não melanizado e melanizado com coloração de PAS..... | 21 |
| Figura 7. Fotomicrografias do escleródio melanizado, com diferentes colorações para observação de proteínas..... | 22 |
| Figura 8. Figura. Microscopia de Fluorescência do corte de escleródio melanizado, corado com calcoflúor. | 23 |
| Figura 9. Fase precoce do desenvolvimento do escleródio de <i>S. sclerotiorum</i> , por microscopia eletrônica de varredura (MEV).. | 24 |
| Figura 10. Fase intermediária do desenvolvimento do escleródio de <i>S. sclerotiorum</i> , por microscopia eletrônica de varredura (MEV). | 25 |
| Figura 11. Fase intermediária avançada do desenvolvimento do escleródio de <i>S. sclerotiorum</i> , por microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... | 26 |
| Figura 12. Fase tardia não melanizada do desenvolvimento do escleródio de <i>S. sclerotiorum</i> , por microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... | 26 |
| Figura 13. Escleródio maduro melanizado de <i>S. sclerotiorum</i> , por microscopia eletrônica de varredura (MEV). | 27 |

| | |
|---|----|
| Figura 14. Análise da qualidade das amostras de RNA por eletroforese em gel de agarose 1,5%..... | 28 |
| Figura 15. Níveis de expressão dos genes de síntese de parede nos escleródios melanizados e não melanizados de <i>S. sclerotiorum</i> | 29 |
| Figura 16. Níveis de expressão dos genes de melanina nos escleródios melanizados e não melanizados de <i>S. sclerotiorum</i> | 30 |
| Figura 17. Níveis de expressão dos genes de desenvolvimento de escleródio nos escleródios melanizados e não melanizados de <i>S. sclerotiorum</i> | 31 |
| Figura 18. Placas com crescimento de <i>S. sclerotiorum</i> . Placas controle, sem o filtrado de <i>Trichoderma</i> spp..... | 32 |
| Figura 19. Placas com crescimento de <i>S. sclerotiorum</i> em 7 dias de crescimento... | 32 |

RESUMO

Sclerotinia sclerotiorum, é um fungo causador do mofo branco ou podridão branca, atinge cerca de 400 espécies de plantas. Atualmente sua incidência, vem se tornando, cada vez mais prejudicial à agricultura de diversas regiões do mundo. Esse fungo produz estruturas, denominadas de escleródios que garantem a sobrevivência do fungo no solo, por um longo período. No presente estudo, foi avaliada a formação e o desenvolvimento morfológico dessas estruturas de resistência, através da microscopia de luz e eletrônica de varredura. Observações morfológicas indicaram que todo processo de crescimento, envolve um entrelaçamento de hifas, além de possíveis formas de armazenamento de nutrientes e água. Além da presença de melanina, que confere proteção ao escleródio. Expressões de genes relacionados ao desenvolvimento desses escleródios também foram avaliados, permitindo sugerir diferentes vias de melanização através da DOPA melanina. Além de genes de parede e desenvolvimento esclerodial, que estariam relacionados à morfologia dessas estruturas, como a *histidina quinase*, fatos que são discutidos ao longo do trabalho, permitindo um maior conhecimento dessas estruturas e seus mecanismos. Através do filtrado de espécies de *Trichoderma* spp. (T00 e All-42), também foi possível avaliar a inibição do crescimento do fungo de *Sclerotinia sclerotiorum*, permitindo inferir outras possíveis formas de controle desse fitopatógeno.

Palavras-Chave: *Sclerotinia sclerotiorum*, mofo branco, fitopatógeno, controle, melanina, *Trichoderma* spp.

ABSTRACT

Sclerotinia sclerotiorum, is a fungus that causes white mold or white rot, about 400 species of plants. Currently, its incidence has been becoming increasingly harmful to agriculture in various regions of the world. This fungus acquires structures, called sclerotia that guarantee the survival of the soil, for a long period. In the present study, the formation and morphological development of resistance structures was evaluated through light microscopy and scanning electron microscopy. Morphological observations indicate the entire growth process, involve an interweaving of hyphae, in addition to allowing the storage of nutrients and water. In addition to the presence of melanin, which gives protection to the sclerotia. Expressions of genes related to the development of sclerotia were evaluated, suggesting different pathways of DOPA melanin melanization. In addition, sclerotial genes, which are related to the morphology of structures, such as *histidine kinase*, facts that are discussed throughout the work, are able to improve structures and their mechanisms. Through the filtration of species of *Trichoderma* spp. (T00 and ALL 42), it was also possible to evaluate the growth inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* fungus, allowing to infer the forms of control of the phytopathogen.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*, white mold, phytopathogen, control, melanin, *Trichoderma* spp.

INTRODUÇÃO

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é o agente causador do mofo branco ou podridão branca, umas das principais doenças de plantas, já que atinge muitas espécies cultivadas, incluindo feijão, soja, batata, entre outras. Mofo Branco é utilizado para caracterizar os sinais externos, evidenciado por lesões nos órgãos afetados por coloração parda e consistência mole (1).

As plantas desde a antiguidade, com suas folhas e os seus frutos se tornaram alimentos, porém mudanças anormais nos seus processos fisiológicos provocam danos ou até mesmo a morte da planta. À medida que os seres humanos se estabeleceram e se tornaram agricultores, veio a necessidade de um controle de patologias, já que há perdas significativas de safras devido a esses agentes patogênicos, que afetam os mais variados tipos de plantas (2). Segundo Garcia *et al* (2015) (3) cerca de 6,8 milhões de hectares da área de cultivo de soja foi atingido pelo mofo branco, na safra de 2013/2014, um grande prejuízo econômico.

O ciclo biológico do fungo *S. sclerotiorum*, tem como principal fator de sobrevivência a produção de estruturas de resistência, denominadas de escleródios, que sob condições desfavoráveis germinam de forma carpogênica (produzindo apotécio) ou miceliogênica (produzindo micélio), emergem na superfície dos solos infectando as mais variadas espécies de plantas (4). Os escleródios podem também serem colhidos com as sementes, fato que os disseminam por longas distâncias. Há relatos da literatura que demonstram que essas estruturas podem permanecer viáveis no solo por um longo período. Nos Estados Unidos há relatos dessas estruturas permanecerem viáveis até oito anos no solo (5,6).

O uso de sementes contaminadas, devido à falta de uma análise de qualidade sanitária antes do cultivo, a suscetibilidade dos hospedeiros ao fungo, a falta de um controle químico e o período de permanência de escleródios viáveis no solo, são fatores que prejudicam o cultivo e favorecem a incidência da doença (1,5,6). Atualmente a incidência de mofo branco nos cultivos vem aumentando e tem se tornado preocupante no âmbito econômico do país. Em um contexto mundial o cultivo de soja é um dos mais prejudicados, já que as regiões onde a mesma é cultivada possuem condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do fungo (6).

De acordo com o exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar a expressão gênica do desenvolvimento do escleródio de *S. sclerotiorum*, demonstrando

também, através de técnicas de microscopia, detalhes da estrutura desse escleródio, identificando futuros alvos de inibição nessas estruturas e possível eliminação da doença.

1.1 *Sclerotinia sclerotiorum*

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) De Bary. (Figura 1) ficou assim conhecida e oficialmente nomeada, pois observou-se que De Bary utilizou a nomenclatura do fungo pela primeira vez, em 1884. O fungo *S. sclerotiorum* pertence ao Filo Ascomycota, classe Discomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae, gênero *Sclerotinia*. Pertence ao grupo de fungos mitospóricos (fungos assexuais, cuja a fase sexuada não é conhecida), com distribuição mundial, é um fungo polífago, que causa doença em muitas espécies vegetais na América do Norte e América do Sul, principalmente, devido às condições climáticas favoráveis (6,7). No Brasil há relatos de que este fungo foi visto pela primeira vez em 1921, em São Paulo, em um cultivo de batata e posteriormente sendo detectado também em cultivos de feijão e soja na região do Cerrado em Minas Gerais e Distrito Federal (8).

A presença de um hospedeiro, com a variedade de plantas de 75 famílias, 278 gêneros e 408 espécies, aliados a temperatura, pH e presença de luz, cria condições favoráveis para a formação do escleródio e posteriormente liberação dos ascósporos, que infecta as partes superiores das plantas (1). Inicialmente na base das folhas, não apresentam sintomas perceptíveis, porém no decorrer do progresso da doença, elas murcham e secam.

Há então a formação dos escleródios, que são estruturas formadas por um condensado de hifas. Composta por três camadas distintas sendo: uma parede grossa coberta por melanina, uma parede fina, denominada como: córtex e por último a medula branca, composta pelo micélio do fungo. A forma e tamanho dos escleródios variam conforme a planta infectada (9,10).



Figura 1. Placa com crescimento de *S. sclerotiorum* com escleródios melanizados e não melanizados.

Esses escleródios no decorrer de sua maturação vão alterando sua coloração de branco para preto, conforme a melanização. A melanina confere resistência dos escleródios quando na presença de condições desfavoráveis de clima e solo, além de desempenhar um papel muito importante na sobrevivência do fungo, portando no ciclo de vida (11,12).

1.2 Formação de escleródio

Os escleródios são formados após o crescimento do micélio, em um ambiente limitado de nutrientes no solo. São as principais estruturas de sobrevivência a longo prazo e podem variar de tamanho dependendo do hospedeiro, em girassol, por exemplo, os escleródios têm o mesmo tamanho e peso das sementes, o que dificulta a separação e remoção dessas estruturas no processo de limpeza (11,13).

Segundo Ordóñez-Valencia *et al* (2014) (17) a formação do escleródio se baseia em três fases sendo elas: iniciação, desenvolvimento e maturação. Todas essas fases podem sofrer influências de fatores externos, que podem atingir diretamente o desenvolvimento desse escleródio. A fase de iniciação ocorre com a agregação das hifas, iniciando a formação de uma estrutura mais compactada, a fase de desenvolvimento é caracterizada por crescimento dessas hifas e aumento

de tamanho dessa estrutura já visualmente formada e por último a maturação, que envolve a consolidação da matriz interna e melanização (7,14).

O crescimento micelial normal envolve hifas dispersas, de modo uniforme, porém com a falta de nutrientes essas hifas se agregam. Além disso, Erental *et al* (2008) (15), indicaram que este processo fúngico é acompanhado por secreção de uma substância semelhante a mucilagem, que pode servir como um agente de cimentação para as hifas. Durante o período de crescimento, os nutrientes armazenados no micélio do fungo, são metabolizados, para a formação do escleródio (16).

No córtex, região que acumula materiais de reserva, as células se tornam espaçadas, devido a função de armazenar nutrientes. Na medula do escleródio há um agregado de hifas e uma camada fibrilar, onde há a presença da mucilagem, que preenche os espaços da medula, na no decorrer da maturação dessa estrutura, há a formação de uma camada, composta por células que vão se pigmentando através da melanina (16).

Segundo Le Tourneau (1979) (12), a porção interna dos escleródios, a medula, é composta por carboidratos, principalmente beta-glucanas e proteínas. Além dessas observações, Rollins e Dickman (2001) (17), relataram a influência do pH no desenvolvimento do escleródio de *S. sclerotiorum*. Em condições de pH neutro ou alcalino, a formação de escleródios é inibida. É sabido que o fungo produz ácido oxálico, e essa produção permite a formação de escleródios pela redução de pH (20).

Além do pH, a temperatura tem uma grande influência no desenvolvimento de escleródio, a temperatura ideal para a formação do micélio está entre cerca de 20-25°C. No entanto, o escleródio só é produzido quando o fungo se encontra em condições desfavoráveis para o crescimento micelial, assim a temperatura ideal, no campo, é cerca de 15°C, temperatura que possivelmente haverá a formação do escleródio (11). Segundo Willets e Wong (1980) (18), a luz também apresenta influência sobre a formação dessas estruturas, sendo que o comprimento do fotoperíodo parece induzir a quantidade e o tamanho dos escleródios formados em uma cultura (11).

Existem diversos fatores envolvidos na formação de escleródios, entre eles, vias de sinalização que também podem ser diferencialmente expressas no desenvolvimento esclerodial. Uma delas é a via para a produção de AMP cíclico

(AMPc). O AMPc é formado pela conversão do ATP pela enzima adenilato ciclase e apresenta papel na transição inicial entre o crescimento micelial e desenvolvimento de escleródios. Jurick e Rollings (2007) (19), encontraram baixos níveis intracelulares de cAMP e um aumento no desenvolvimento de escleródios em comparação com o tipo selvagem de *S.sclerotiorum* (19).

1.3 Ciclo de vida de *Sclerotinia sclerotiorum*

A formação de escleródios está totalmente ligada com o ciclo de vida do fungo (Figura 2), primeiramente ocorrendo o processo de disseminação de *S. Sclerotiorum*, através de germinação miceliogênica, onde ocorre a formação de hifas diretamente dos escleródios, que ao germinar colonizam toda matéria orgânica e posteriormente tecidos sadios das plantas. Podendo ocorrer também a germinação carpogênica, com o desenvolvimento de apotécio, pequena estrutura semelhante a um cogumelo, que pode liberar mais de dois milhões de pequenos ascósporos. Quando dispersos pelo ar durante um período de 5 a 10 dias, depois de formado, inicia uma nova infecção, surgindo com um micélio branco (11,21).

Uma substância conhecida como: mucilagem é liberada juntamente com esses ascósporos, auxiliando na adesão aos tecidos do hospedeiro. Já os escleródios produzidos, retornam ao solo após a colheita, garantindo a sobrevivência e propagação do fungo, todos esses fatos asseguram o potencial de infecção desse fitopatógeno (22,23). A figura 2 demonstra o ciclo de vida de *S. sclerotiorum*.

A figura 3 mostra a infecção na soja, por *S. sclerotiorum* onde os sintomas ocorrem geralmente no terço médio das plantas, atingindo o caule principal, pecíolos, folhas e por fim as vagens. *S. sclerotiorum* apresenta uma ampla gama de hospedeiros, incluindo culturas cultivadas, como comestíveis, feijão, canola, colheitas (repolho, brócolis), outras culturas (ervilha, grão-de-bico e lentilhas), girassol e batata (24).

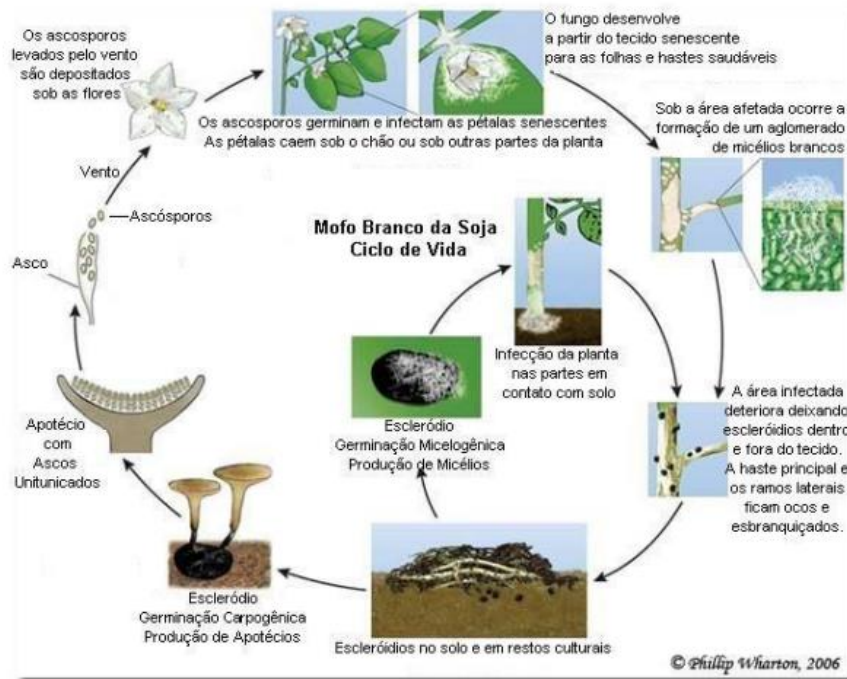


Figura 2. Ciclo de vida da *S. sclerotiorum*. Adaptado de Wharton e Kirk (2007).

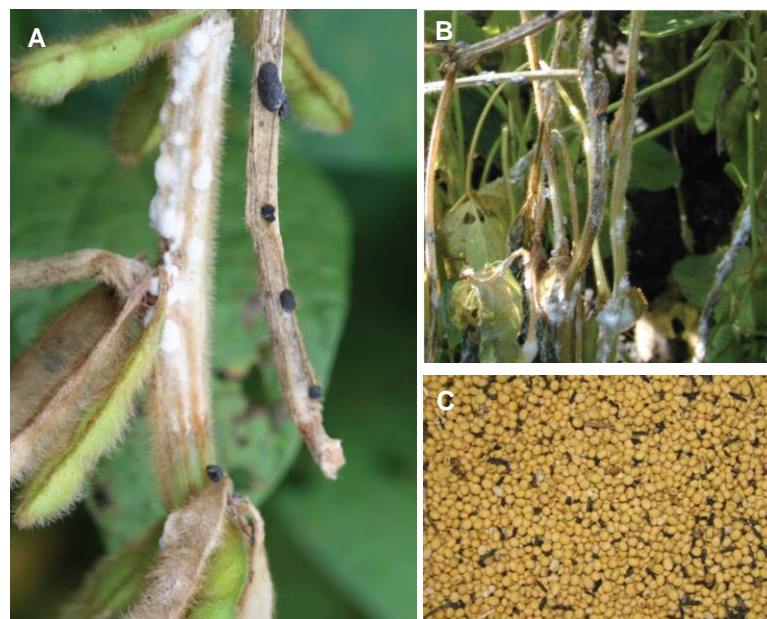


Figura 3. Lesões por *S. sclerotiorum* em hastes de plantas, na forma de micélio e escleródios (A-B). Escleródios de *S. sclerotiorum* em grãos colhidos (C). Adaptado de Peltier *et al.* (2012) (25).

Segundo Purdy (1979) (26), em um campo com 2.000 pés de alface doentes, a produção de escleródios pode chegar a 17.000. No entanto, o micélio que resulta diretamente dos escleródios não é tão infeccioso quanto à germinação através de

ascósporos, devido a quantidade que é liberado e a distância que pode acometer a planta, levando a perdas de grande importância na agricultura, devido a epidemias dessa doença. (27).

Apenas escleródios pré-condicionados e maduros podem produzir o apotécio, condições essas, ainda não conhecidas, podendo variar conforme a espécie. Sabe-se que escleródios de *S. sclerotiorum*, podem produzir apotécio, através da germinação carpogênica, em um período de 13 a 208 dias, conforme as condições que o mesmo se encontra (11).

Uma das fontes de infecção de *S. sclerotiorum* é através das flores, local que funciona como uma fonte de energia e garante a infecção de tecidos saudáveis do hospedeiro. Tendo condições favoráveis ao seu desenvolvimento, esse patógeno pode colonizar as partes saudáveis da planta entre 16 e 24 horas após a infecção do tecido floral, paralisando sua ação ao se deparar com clima não favorável. Podendo permanecer viável até encontrar condições ideais para seu desenvolvimento, novamente (28).

1.4 A melanina em *Sclerotinia sclerotiorum*

A pigmentação escura em fungos deve-se a presença de melanina. Descrita como pigmento preto ou marrom de alto peso molecular, sua composição química, ainda não é bem conhecida. Em fungos são encontrados duas classes de melanina, formada pela via policetídeo sintase é denominada de dihidroxinaftaleno (DHN), ou pela via das fenoloxidasas ou laccases (29).

Na vida de formação da DHN-melanina (Figura 4), a rota inicia-se com o acetil-CoA em malonil-CoA, por ação da enzima policetídeo sintase (PKs) ele sofre ciclização e gera 1,3,6,8-THN. Logo há uma série de reações até formar 1,8-DHN, o qual dará origem à DHN-melanina. Em fungos demáceos como *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladosporium carrioni* há a síntese de melanina pela DHN-melanina (30).

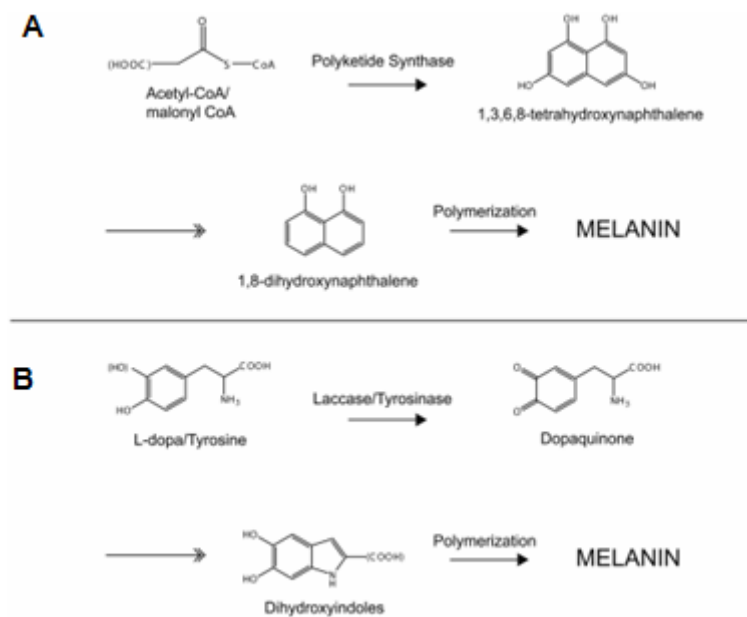


Figura 4. Vias de síntese de melanina. A - Via de síntese DHN-melanina (dihidroxi-naftaleno). B – Via DOPA- melanina (dopaquinona). Na via DHN o precursor, malonil CoA ou acetil CoA, é um substrato da poliketídeo sintase. Na via L-dopa, o precursor, tirosina ou L-dopa, é um substrato da tirosinase ou laccase. Adaptado Casadevall e Eisenman (2012) (31).

Na síntese de DOPA-melanina (Figura 4), há duas moléculas que iniciam a síntese, podendo ser a L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) ou a tirosina. Se a molécula precursora for a L-Dopa ela será oxidada pela enzima laccase em dopaquinona, já se for a tirosinase a precursora, ela própria é convertida em L-DOPA, para depois se tornar dopaquinona, nesse caso nas duas reações a enzima tirosinase tem seu papel fundamental (30).

Segundo Erental *et al* (2008) (15) a deposição da melanina no escleródio reduz a permeabilidade celular e protege essas estruturas dos agentes ambientais como UV e degradação por enzimas, produzidos pelo próprio fungo ou outro microorganismo. Há relatos de que as hifas fúngicas produzem naturalmente DHN melanina, porém os escleródios teriam essa síntese pela via da DOPA melanina, um produto de oxidação da tirosinase (15).

1.5 Controle da Doença

O uso intensivo de agrotóxicos para o controle de doenças e pragas na agricultura vem trazendo preocupações para toda a comunidade. A aplicação

desses produtos vem aumentando, com o objetivo principal de aumentar a produção, porém o uso destes pode causar um grande desequilíbrio biológico. Diante de todo contexto de mudança climática, problemas ambientais, econômicos e sociais, a procura por produtos e sistemas mais sustentáveis, ganham espaço na sociedade (32).

Atualmente, são utilizadas como medidas de controle de fungos fitopatogênicos, práticas agrícolas tradicionais como: queimadas para eliminar o excesso de resíduos pós-colheita, drenagem do solo, tratamento térmico da água, solarização, rotação de culturas e aplicação de fungicidas (33,34). Estas medidas nem sempre são totalmente eficientes principalmente em função da elevada taxa de sobrevivência de formas resistentes dos patógenos de solo em condições ambientais adversas, além da sua permanência em outras plantas hospedeiras, que podem funcionar como reservatórios. Os produtos químicos utilizados são tóxicos e poluentes, causando grande impacto ambiental e à saúde dos produtores agrícolas e consumidores. Outra desvantagem no uso de fungicidas está relacionada à sua inespecificidade, podendo eliminar microrganismos já estabelecidos no solo e benéficos às plantas, aumentando assim sua suscetibilidade aos patógenos de solo.

Uma maneira sustentável para a agricultura no combate de doenças em lavouras no Brasil e no mundo é através da utilização do controle biológico. O controle biológico consiste no uso de organismos vivos para suprimir a densidade populacional ou o impacto de um organismo patogênico específico, tornando-o menos abundante ou menos prejudicial do que ele seria sem a presença do agente de biocontrole. Um bom agente de biocontrole deve apresentar um grupo de características comuns, como por exemplo, alta capacidade reprodutiva, habilidade de sobreviver sob condições desfavoráveis, eficiência na utilização de nutrientes, agressividade e antagonismo contra diferentes hospedeiros (35). Desta forma, a eficiência do biocontrole está associada às propriedades antagonistas e aos mecanismos de ação que o agente de biocontrole apresentar.

Diferentes espécies de fungos de solo já foram descritos como biocontroladores de fungos causadores de doenças vegetais, como por exemplo, *Chaetomium globosum*, *Ch. cochlioides* e *Ch. cupreum* que inibem o crescimento dos fitopatógenos *Curvularia lunata*, *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia oryzae*, *F. oxysporum .sp. lycopersici*; *Aspergillus niger* (36–38). Dos organismos que já foram identificados como agente de controle biológico de fungos fitopatogênicos, alguns

são comercialmente viáveis, em função de sua efetividade em condições de campo (39).

Espécies de *Trichoderma*, principalmente, *Trichoderma harzianum* foram comercialmente utilizados como agentes de controle biológico contra os fungos fitopatogênicos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora palmivora* e *Pythium spp*, no mamão, tabaco, mamona e culturas de feijão (40–43). Eles são capazes de reduzir a colonização de plantas e o crescimento do fungo hospedeiro usando uma combinação de mecanismos específicos, tais como micoparasitismo, antibiose e competição por espaço e nutrientes no ambiente rizosfera (44).

1.6 *Trichoderma spp.* como controle biológico

Pertencente ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Ascomycetes, Ordem Hypocreales, Família Hypocreaceae. O gênero *Trichoderma* foi proposto por Persoon (1794) para fungos que possuem um conjunto de características bem definidas, porém com espécies pouco delimitadas com base na morfologia. Tem crescimento rápido, colônias dispersas, flocosas, ou compactadas em tufo; tamanho e formato dos conídios variados; clamidósporos, às vezes presentes; coloração varia de verde a amarelo, ou até mesmo hialino, algumas espécies têm dependência da luz para a esporulação (27).

Espécies do gênero *Trichoderma* são de grande interesse da biotecnologia; no entanto a sua utilização no biocontrole requer uma maior análise dos princípios biológicos da sua ação, tendo assim um menor uso. No Brasil, dentre os aspectos que justificam esta baixa aplicabilidade, está a limitada disponibilidade de produtos comerciais à base de *Trichoderma spp.* legalmente registrados e a falta de conceitos e vantagens envolvidos na utilização de bioprodutos, a falta de conhecimento e as consequências para a saúde pública e ambiental do uso intensivo de agrotóxicos também são fatores que dificultam o uso desse controle sustentável (45).

Espécies de *Trichoderma spp.* tem potencial como agentes de controle biológico por induzir a expressão de genes em plantas envolvidos na resistência, por competirem por nutrientes ou espaço com outros fungos, por produzir antibióticos voláteis e não voláteis e enzimas líticas (46). O sucesso de espécies de *Trichoderma spp.* como agentes de controle biológico, é devido à sua elevada capacidade de

reprodução, a capacidade de sobreviver sob condições severas, com alta eficiência na utilização de nutrientes, grande capacidade em parasitar fungos, inclusive fungos patogênicos de plantas e eficiência na promoção de mecanismos de defesa da planta. É sabido que o gênero *Trichoderma* spp apresenta espécies de elevado potencial para utilização como agentes de controle de doenças causadas por fitopatógenos como a *S. sclerotiorum* (47). As doenças de plantas, entre elas a cultura de soja, por *S. sclerotiorum*, tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, com perdas de até 50% da área cultivada (8,48) o que demonstra a importância de buscar formas de controlar o desenvolvimento dessas estruturas, já que ele se mantém viável no solo por longos períodos.

1.7 Metabólitos secundários em *Trichoderma* spp.

Metabólitos constituem um variado grupo de compostos naturais, porém quimicamente diferentes relacionados à sobrevivência do organismo produtor. No caso de espécies de *Trichoderma* spp., já são conhecidos por produzirem metabólitos voláteis e não voláteis, capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos. Os metabólitos secundários são produzidos durante um estágio do ciclo celular ou um estágio específico morfológico do fungo (49).

Esses compostos estão diretamente envolvidos na habilidades do fungo de competição e proteção, além de atuar como um fator de patogenicidade. Metabólitos secundários como *peptaibols*, harzianolides são conhecidos, tanto pela atividade antifúngica, quanto pela atividade promotora de crescimento da planta. Ethur *et al* (2001) (50), relatam que o fungo *Trichoderma* spp. é capaz de parasitar e destruir escleródios de *S. sclerotiorum*.

Um composto denominado de gliotoxina foi descoberta em *T. virens* e mostrou inibir o crescimento do patógeno *Rhizoctonia solani* da planta. Vargas *et al* (2014) (51) mostrou que um mutante com ausência de produção de gliotoxina, afetou não apenas o parasitismo da hifa, mas também a capacidade de degradar escleródios de *S. sclerotiorum*, revelando a importância desses compostos como agente de biocontrole (51).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Esse trabalho teve como objetivo geral identificar características da estrutura do escleródio de *S. sclerotiorum*, por meio do uso de microscopia de luz e eletrônica de varredura. Além de analisar a expressão de genes que participam do desenvolvimento dessas estruturas.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar e caracterizar as diferentes fases de formação do escleródio de *S. sclerotiorum* por microscopia de luz;
- Identificar e caracterizar as diferentes fases de formação do escleródio de *S. sclerotiorum* por microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar através da técnica PCR em tempo real a expressão de genes de melanina, parede e desenvolvimento do escleródio expressos durante as diferentes fases do desenvolvimento do escleródio de *S. sclerotiorum*;
- Identificar possíveis formas de inibição desse fitopatógeno, utilizando filtrado de cultivo de espécies de *Trichoderma* spp. (ALL 42 e T00) como biocontrole.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismos utilizados e condições de cultura

Foram utilizados isolados de *S. sclerotiorum*, *T. harzianum* (ALL 42) e *T. asperellum* (T00), obtidos da coleção do Laboratório de Enzimologia (ICB/UFG) e da coleção Embrapa Arroz e Feijão. Cultivados em meio MYG (0,5% de extrato de malte; 0,25% de extrato de levedura, 1% de glicose e 2 % de ágar) à temperatura ambiente por 7 a 10 dias e estocados a 4°C.

3.2 Análise da morfologia e desenvolvimento dos escleródios de *S. sclerotiorum*

3.2.1 Processamento dos escleródios

Os escleródios foram emblocados em resina e parafina, os cortes histológicos foram realizados através do micrótomo e submetidos às técnicas histoquímicas. Os escleródios emblocados em resina, foram fixados em glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,1M pH 7.2. Após a fixação, foram lavados no tampão cacodilato e desidratados em uma sequência de álcool de 30, 50, 70, 80, 90 e 100% por 15 minutos em cada álcool. O processo de inclusão foi realizado em resina 1:2, 1:1 e por último 2:1 por 6 horas ou overnight e por fim em resina pura overnight.

Os escleródios foram emblocados e depois submetidos aos cortes histológicos. Os cortes de escleródios melanizados e não melanizados foram submetidos a diferentes reações histoquímicas. Específico para detecção de melanina, através da coloração de Lillie, para detecção de polissacarídeos reação de PAS e detecção de proteínas totais colorações de Xylidine Ponceau, Azul de Toluidina e Azul de Bromofenol. Foi realizada também a microscopia de fluorescência com Calcoflúor para análise de quitina e melanina.

3.2.2 Técnicas Histoquímicas

3.2.2.1 Coloração de PAS (Ácido Periódico de Schiff)

Para serem evidenciados polissacarídeos, cortes de escleródios melanizados foram oxidados com ácido periódico 1% por 20 min. Após esse período foram

lavados rapidamente e tratados com reativo de Schiff por 5 minutos e lavados em água destilada corrente por 10 min. Alguns cortes foram tratados com α -amilase 1%, para reação da diástase, onde há a remoção do glicogênio (quebra de ligações alfa 1-4 glicosídicas de polissacarídeos, através da ação da alfa amilase), antes de fazer a reação histoquímica. Após este procedimento, as lâminas foram deixadas em repouso para secar e, em seguida, analisadas em microscópio de luz.

3.2.2.2 Coloração de Lillie

Para visualização de melanina, cortes de escleródios melanizados e não melanizados foram corados com azul de Nilo sulfúrico por 20 min e lavados em água corrente destilada, também por um período de 20 min, secados e observados em microscópio de luz.

3.2.2.3 Coloração com Azul de Toluidina

Para detecção de proteínas totais, cortes de escleródios melanizados foram corados com azul de toluidina por 1 min e lavados em água corrente, secados e observados em microscópio de luz.

3.2.2.4 Coloração Xylidine Ponceau

A detecção de proteínas totais foi feita através da coloração dos cortes de escleródio melanizado pelo Xylidine Ponceau a 0,1% em ácido acético a 2,5. Corados por 20 min, seguido de lavagem com água destilada, secados e montados para análise em microscópio de luz (Cortelazzo & Vidal 1991).

3.2.2.5 Coloração de Azul de Bromofenol

Os cortes foram corados por azul de Bromofenol, também para detecção de proteínas totais, por 2 horas a temperatura ambiente, posteriormente lavados por 5 minutos em solução de ácido acético a 0,5%, passados no álcool butílico terciário.

3.2.3 Microscopia de Fluorescência com Calcoflúor White

Foi adicionado uma solução de Calcofluor *White* (CFW) 0,01% (Sigma®) sobre os cortes esclerodiais (escleródio melanizado) e analisados na objetiva de 100x em microscópio de fluorescência Olympus BX 43 (Olympus, Japan). As imagens foram feitas através do programa Image-Pro Plus 6.0.

3.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram realizadas análises dos escleródios em diferentes estágios de crescimento (escleródio precoce, escleródio intermediário, escleródio intermediário avançado, escleródio tardio não melanizado e escleródio maduro melanizado), para uma melhor análise de desenvolvimento dessas estruturas, por MEV. Para esse processo, *S. sclerotiorum* foi crescido às mesmas condições do item 3.1. até a formação dos escleródios.

Os escleródios foram retirados do meio de cultura, com o auxílio de bisturi e realizada a fixação, lavagem e desidratação dessas amostras. Foram fixados em glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, em tampão cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,2), em seguida colocadas as amostras, deixando overnight em geladeira. Após a fixação o material foi retirado do fixador e foi realizado a lavagem (quatro vezes) em tampão cacodilato (0,05M, pH 7,2), por 15 min. cada. Em seguida todas as amostras foram desidratadas com etanol 30% (v/v), 50% (v/v), 70% (v/v), 80% (v/v), 90% (v/v), deixando agir por 15 minutos, finalizando a desidratação com etanol 100%, por 10 minutos, duas vezes.

Em seguida, estas amostras foram transferidas para a câmara de secagem ao ponto crítico do CO₂ (Autosamdri – 815), seguido de recobrimento por deposição de filmes de ouro (Deton Vacuum, Desk V, equipado com o acessório de carbono). Completando-se assim o preparo do material para observação ao MEV, com o aparelho Jeol JSM – 6610, equipado com EDS, Thermo scientific NSS Spectral Imaging. E as amostras foram analisadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução da Universidade Federal de Goiás (LabMic/UFG).

3.3 Análise da expressão gênica do desenvolvimento do escleródio em *S. sclerotiorum*

3.3.1 PCR em tempo real

O RNA total foi extraído dos escleródios melanizados e não melanizados, de forma separada, através da quebra pela ação do nitrogênio líquido e adicionados 1 mL de Trizol® seguindo o procedimento do fabricante (Invitrogen). Logo em seguida o macerado dos escleródios foram transferidos para tubos de 2mL, essa mistura foi passada pelo vortex a fim de homogeneizar a reação. Posteriormente a esta etapa foi adicionado 200 µl de clorofórmio que foi agitado por 15 segundos. Incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente foi centrifugado por 15 minutos a 4 °C a 12000 rpm, e logo em seguida o sobrenadante foi transferido para tubos de 2mL e foi adicionado isopropanol. Após a adição de 500 µl de isopropanol as amostras foram homogeneizadas por inversão suave e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente a essa etapa as amostras foram centrifugadas novamente na mesma condição anterior, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 1000 µl de etanol 75%, agitado em vortex para lavagem do precipitado e centrifugado a 7500 rpm por 5 minutos a 4 °C. Depois foi removido o sobrenadante por inversão e secado no fluxo por aproximadamente 15 minutos e ressuspendido com 50 µl de água DEPC e conservado a -20 °C.

As preparações foram quantificadas por espectrofotometria DO 260nm/280 nm e verificadas quanto à integridade utilizando eletroforese em gel de agarose 1,5%. Para visualização dos fragmentos o gel foi exposto à luz ultravioleta em um fotodocumentador Gel Doc TM EZ System (Bio-Rad). O tratamento com DNase I foi utilizado em 5 µg de RNA total e seguindo os procedimentos indicados pelo fabricante (Fermentas). Foi utilizado 2 µg de RNA tratado, 1 µl de Randon primer e 3 µl de água DEPC, a reação foi incubada à 65°C por 5 minutos, em seguida em gelo por 1 minuto. Adicionou-se 4 µl de *reaction buffer* 5x, 2 µl de dNTP mix 10 mM, e 1 µl de ribolock (inibidor de RNase) e 1 µl de transcriptase reversa para um volume final de 20 µl da reação. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 5 minutos à 25 °C e seguidos por 1 hora à 45 °C e aquecidos a 70 °C por 5 minutos. Posteriormente foi feita a diluição do cDNA para a reação de q-PCR-RT utilizando 20 µl do cDNA e 60µl de água DEPC. As reações de RT-qPCR foram realizadas no termociclador IQ5 real-time PCR system (Bio-Rad). Cada reação foi composta de 10 µL de MAXIMA SYBER Green PCR Master Mix (Fermentas), 5 µL de mix de primers Forward e Reverse (10 µM) e 5 µL de cDNA diluído em água (1:4). As condições de

ciclagem foram: 1 ciclo de 10 min a 95 °C e 40 ciclos de 15 seg a 95 °C seguido de 1 min a 60 °C com leitura de fluorescência. Para a verificação da existência de dímeros de primers ou amplificação inespecífica foi realizada a coleta contínua de dados.

O transcrito actina foi usado como controle interno para normalização da quantidade do RNA total presente em cada reação. O nível de expressão dos genes foi calculado de acordo com o C_t pelo método $2^{-\Delta C_t}$ (52).

Tabela 1: Sequência de nucleotídeos dos primers

| Genes | Sequência |
|----------------------------|--|
| Actin | F-CCCCAGCGTTCTACGTCT R-CATGTCAACACGAGCAATG |
| Polyketide synthase | F-TGCTGCCTTAGGTGACACAG R-AAACCCGGCTGGAATAGACT |
| Precursor laccase | F-GGGGAATCAACTGATGCTGT R-CGATACACCTGTCGTTGTCG |
| Tirosinase | F-CTACATTCCCCACAGCCACT R-ATCAAGGGCTGTCCAACAAC |
| Chitin synthase 1 | F-AGATGCGCCATATGGAAGAC R-CACAGATGGCTGAGGCTGTA |
| Chitin synthase 2 | F-TGTTGCAGGTCAGAACTTCG R-TCCCATGATAGCTCGGAATC |
| Chitin synthase 3 | F-ATGTATCTGGCGGAAGATCG R-ACTTACCCGGCACATCAGTC |
| Chitinase A | F-ACCTTGATTCTGGCACTTG R-CCCTTTGTGTCGAGAATGGT |
| Chitinase B | F-CCATGACCGATGTGATCAAG R-AAGCAGGGGTACCTCCAAGT |
| Chitinase C | F-CTGCAGGAAAACCTCGAGTC R-GACACCCAAGAGCATTCCAT |

| | |
|---------------------------|--|
| Glucan synthase | F-ATCCCGAAGTCGTTCAAATG R-TCGGTGTTTTCCATCTCCTC |
| Endo 1,4 Glucanase | F-CAAGGCAGCTTAACCGCTAC R-GATCCATCGGAGTCGAGGTA |
| Exo 1,3 Glucanase | F-ACCCCGATACTGCTGTTGTC R-TGCCTCCATGAAATATGCAA |
| 1,6 Glucanase | F-GGCGATTACGAAAAGGATGA R-ACTTCGGGATTTTCAACACG |
| Histidine kinase | F-CGACGGTACATGGAAGGAGT R-CTTGGTCGGTGAGGTTTTGT |
| Adenilato ciclase | F-CACCTCCCTGGACATCATCT R-CCACCCTTCGTTGTTGACT |

3.3.2 Análise Estatística

O transcrito *actin* foi usado como controle interno para normalização da quantidade do RNA total presente em cada reação. O nível de expressão dos genes foi calculado de acordo com o C_t pelo método $2^{-\Delta C_t}$ (52). Os dados obtidos das reações foram organizados em planilhas do programa Microsoft Office Excel 2007. Posteriormente, os mesmos foram submetidos ao teste de análise de variância, teste t, no programa estatístico Graph Pad Prism 7.

3.4 Ensaio de inibição do crescimento de *S. sclerotiorum* com filtrado de *Trichoderma harzianum* (ALL 42), *Trichoderma Asperellum* (T00)

Os isolados de *Trichoderma harzianum* (ALL42), *Trichoderma Asperellum* (T00) foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 500mL, contendo 250 mL de meio líquido MYG (0,5% de extrato de malte; 0,25% de extrato de levedura e 1% de glicose). Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 180 rpm, a 28 °C, durante 72 horas. Após esse período, a parte líquida foi coletada por filtração á vácuo. Os filtrados foram diluídos em série nas proporções de 1: 4 e 1: 9 v/v (v/v: água esterilizada /filtrado) e s/d (sem diluição), seguindo a metodologia de Yulong *et*

al. (2017) (53), porém adaptado e misturado em 45 mL de meio MYG (0,5% de extrato de malte; 0,25% de extrato de levedura, 1% de glicose e 2 % de ágar).

Em seguida esses frascos contendo o filtrado e o meio MYG foram autoclavados a 120°C, por 20 minutos. Posteriormente colocados em placas de Petri até solidificar. O experimento foi realizado em triplicata para cada diluição. Discos de ágar (5mm) do crescimento de *S. sclerotiorum* foram depositados na placa contendo meio MYG, suplementado com filtrado de cultura em diferentes diluições (.s/d, 1: 4 e 1: 9).

As placas foram incubadas a 25 °C. A testemunha consistiu do fitopatógeno cultivado na ausência de filtrados de culturas do *Trichoderma* spp. As avaliações do crescimento micelial foram realizadas no decorrer de 7 dias, para o acompanhamento da possível inibição.

4. RESULTADOS

4.1 Análise morfológica dos escleródios

A figura 5 representa um corte do escleródio corado pela coloração de Lillie, importante para observação de melanina. Observamos por essa coloração, a melanização da estrutura no decorrer do seu desenvolvimento. A figura 5A representa um corte do escleródio antes da melanização, onde pode ser observado que na região da superfície (seta) ainda não há a presença de melanina, já na figura 5B observa-se essa mesma região com uma coloração mais escura na superfície do escleródio (seta), evidenciando a presença de melanina.

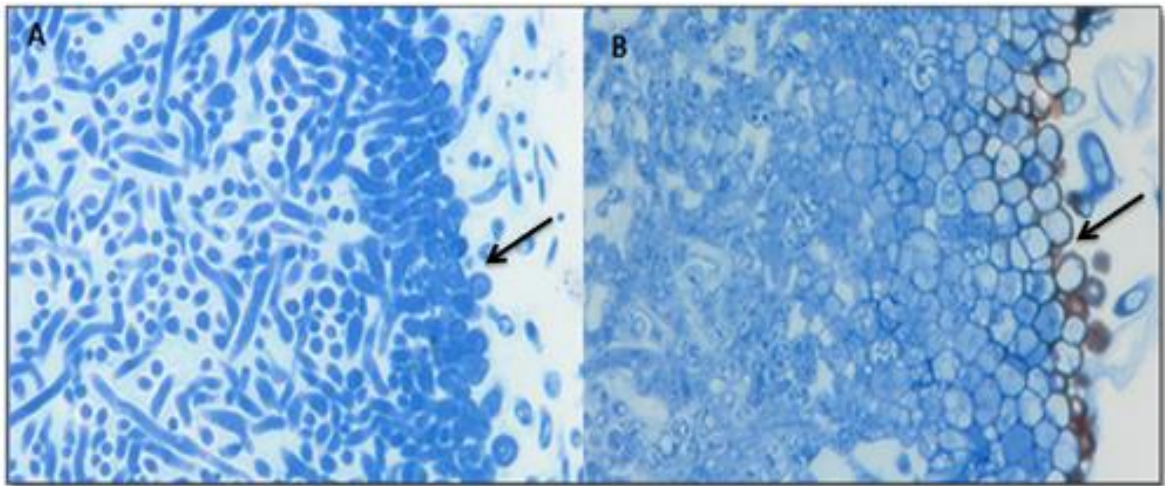


Figura 5. Fotomicrografia do escleródio não melanizado e melanizado com coloração de Lillie, setas evidenciando a presença de melanina na superfície. A - Corte de escleródio não melanizado; B - Corte de escleródio melanizado.

A figura 6A representa um corte de escleródio sem melanina com coloração de PAS não tratado com amilase, já a figura 6B o mesmo corte e coloração, porém com tratamento de amilase (diástase). Já a figura 6C representa um corte de escleródio com melanina, corado por PAS sem o tratamento de amilase, enquanto que na figura 6D o mesmo corte com diástase.

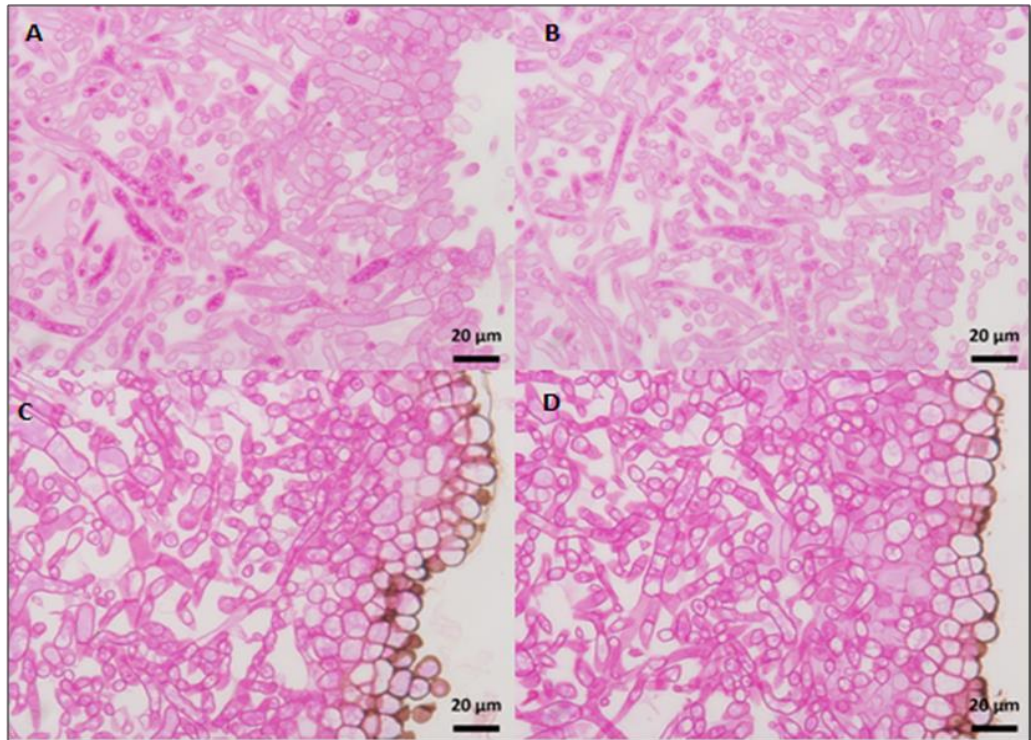


Figura 6. Fotomicrografia do escleródio não melanizado e melanizado com coloração de PAS. A - Corte de escleródio não melanizado sem tratamento com amilase; B - Corte de escleródio não melanizado com diástase. C - Corte de escleródio melanizado sem tratamento com amilase; D - Corte de escleródio melanizado com diástase.

Foram realizadas colorações que evidenciam a presença de proteínas nos cortes do escleródio. Entre elas o Azul de Toluidina, Azul de Bromofenol e Xylidine Ponceau. As figuras 7A e 7B apresentam um mesmo corte do escleródio, porém em diferentes dimensões corado por Azul de Toluidina, 7C e 7D Azul de Bromofenol e 7E e 7F Xylidine Ponceau.

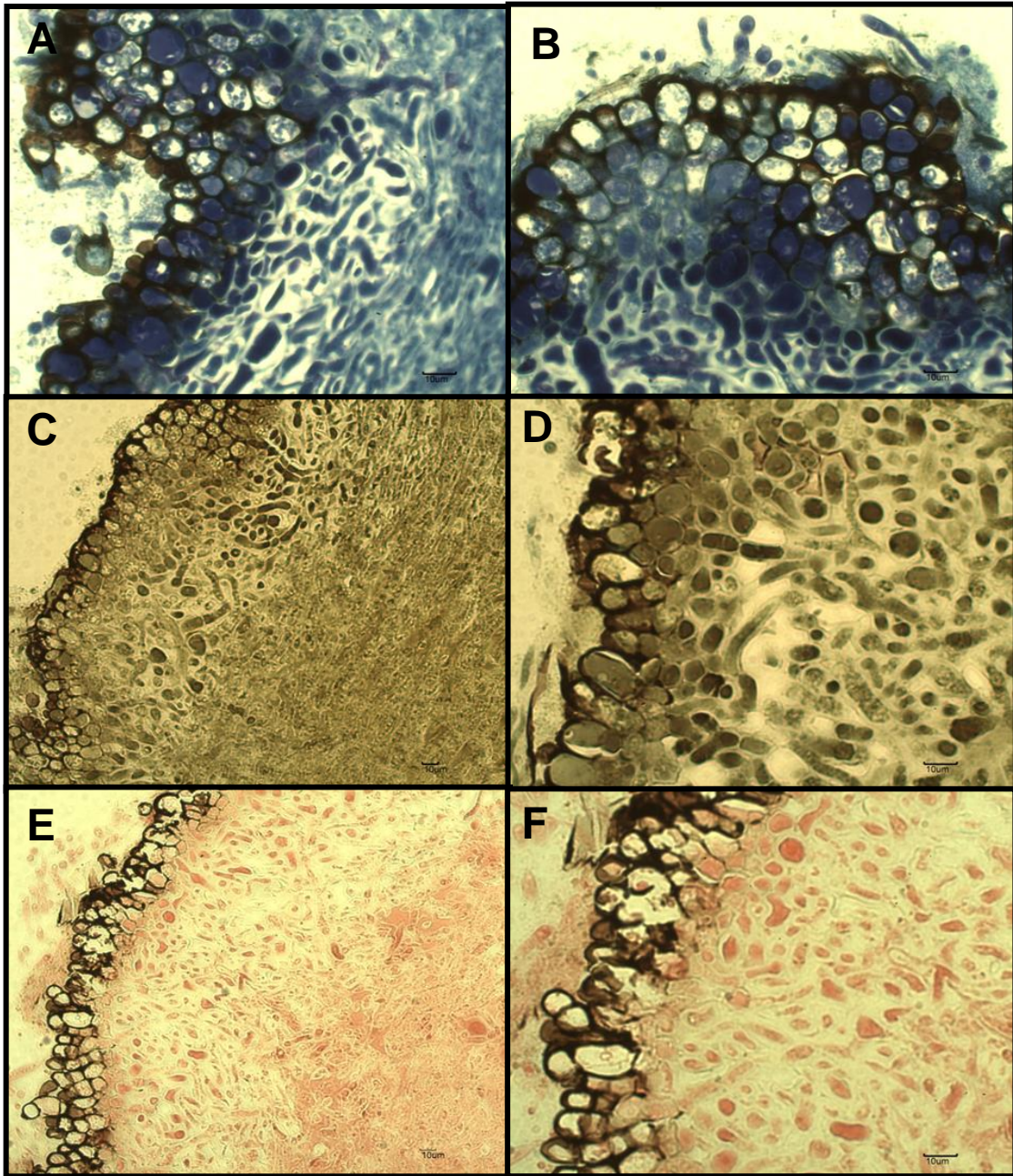


Figura 7. Fotomicrografias do escleródio melanizado, com diferentes colorações para observação de proteínas. A e B – Azul de Toluidina (Aumento de 40x); C – Azul de Bromofenol (Aumento de 20x); D – Azul de Bromofenol (Aumento de 40x); E – Xylidine Ponceau (Aumento de 20x); F – Xylidine Ponceau (Aumento de 40x).

Os cortes dos escleródios também foram analisados por fluorescência através do corante fluorescente - calcofluor (Figura 8). A figura 8A demonstra o corte do escleródio, evidenciando a superfície com fluorescência mais intensa. A figura 8B representa a região interna da estrutura do escleródio.

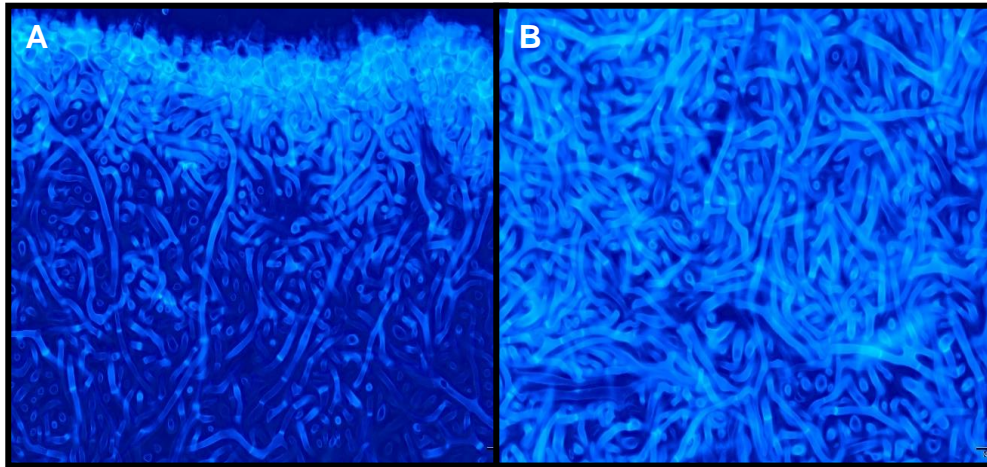


Figura 8. Figura. Microscopia de Fluorescência do corte de escleródio melanizado, corado com calcoflúor. A – Região superficial do escleródio; B – Região interna do escleródio.

4.2 Análise morfológica do desenvolvimento do escleródio por MEV

Nas figuras 9A e 9B, pode ser observado o enovelamento inicial das hifas do fungo *S. sclerotiorum* para a formação do escleródio. Essas estruturas são formadas quando o micélio cobre totalmente a superfície do ágar, devido à disponibilidade limitada de nutrientes ou como uma resposta por metabólitos produzidos pelo micélio, ou quando a colônia fúngica atinge um estado fisiológico específico (14). Cooke (1970) (63), descreveu que o início da formação do escleródio é caracterizado pela presença de massas de hifas que irão originar essas estruturas.

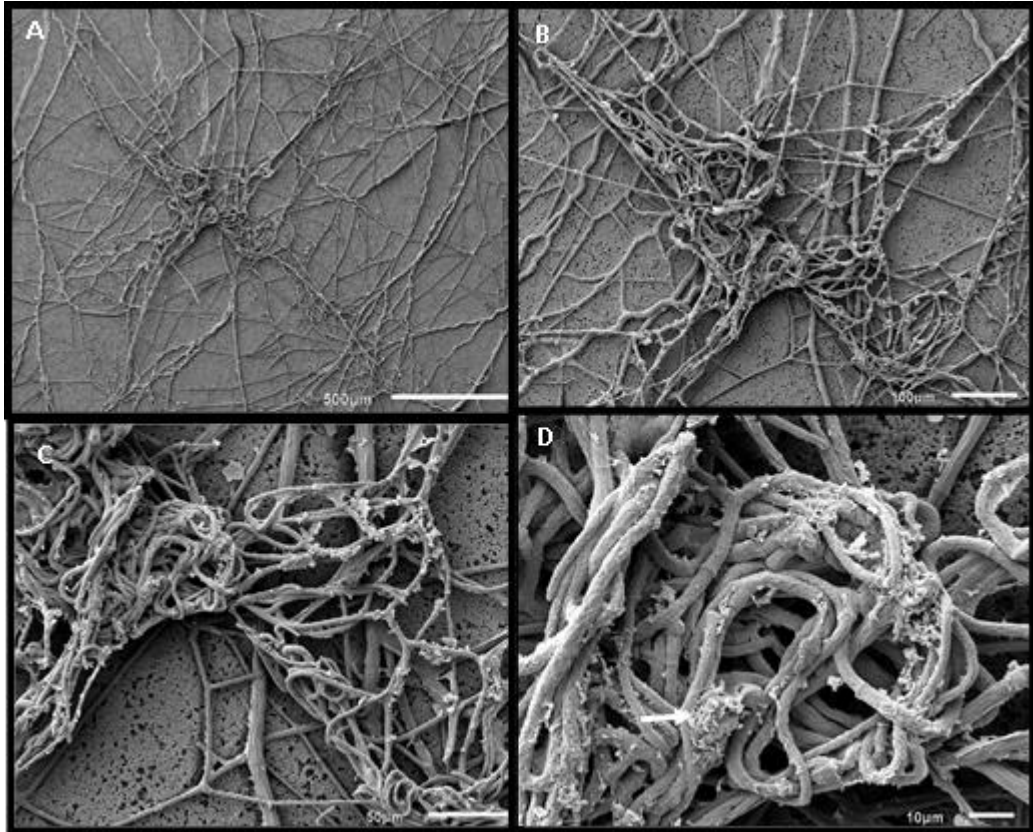


Figura 9. Fase precoce do desenvolvimento do escleródio de *S. sclerotiorum*, por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A – Escleródio precoce com 500µm. B – Escleródio precoce 100µm. C – Escleródio precoce 50µm. D – Escleródio precoce 10µm, seta evidenciando possíveis produtos metabólicos.

A figura 10 pode ser observado a fase intermediária do desenvolvimento do escleródio por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em diferentes tamanhos, chamando atenção para figura 10F, onde se observa um material secretado pelas hifas e permitindo a interação entre elas, sugerindo ser uma substância gelatinosa como mucilagem. Segundo Willets (1971) (60), essa mucilagem, é composta por mucopolissacarídeos, tendo como funções a rápida absorção, proteção e retenção de água, principalmente antes da germinação. Além disso, Erental (2008) (15), descreve que esse processo fúngico é acompanhado por secreção de uma substância, que pode servir como um agente de cimentação para as hifas.

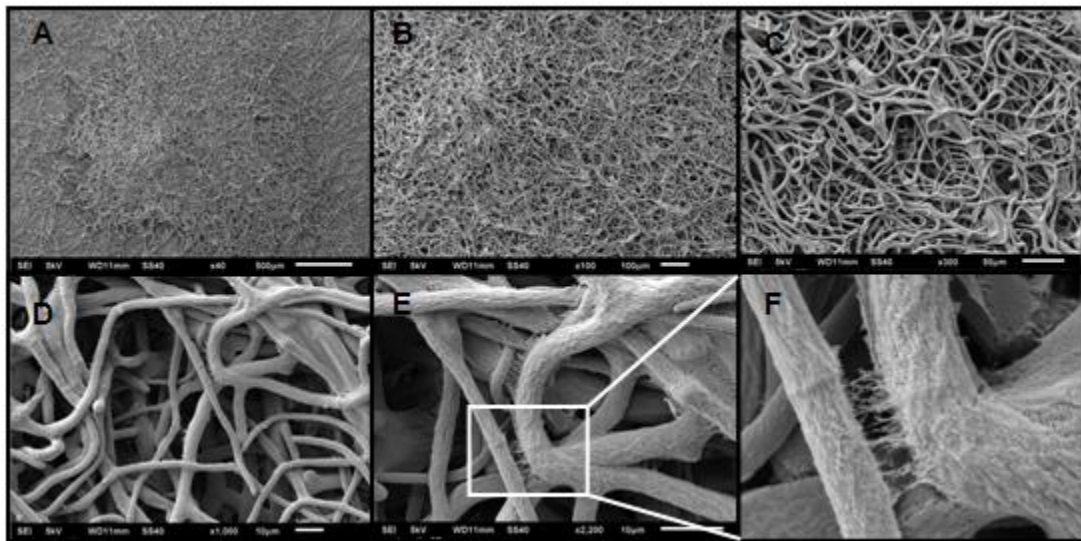


Figura 10. Fase intermediária do desenvolvimento do escleródio de *S. sclerotiorum*, por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A – Escleródio intermediário 500µm. B – Escleródio intermediário 100µm. C – Escleródio intermediário 50µm. D – Escleródio intermediário 10µm. E - Escleródio intermediário 10µm. F – Zoom da imagem E, evidenciando possível secreção.

A figura 11 observa-se a fase intermediária avançada de formação do escleródio, com um entrelaçamento maior entre as hifas, a fim de compactar ainda mais essa estrutura de resistência. A figura 11F nota-se, mais uma vez uma substância presente nas hifas, agora já em uma fase mais avançada do desenvolvimento.

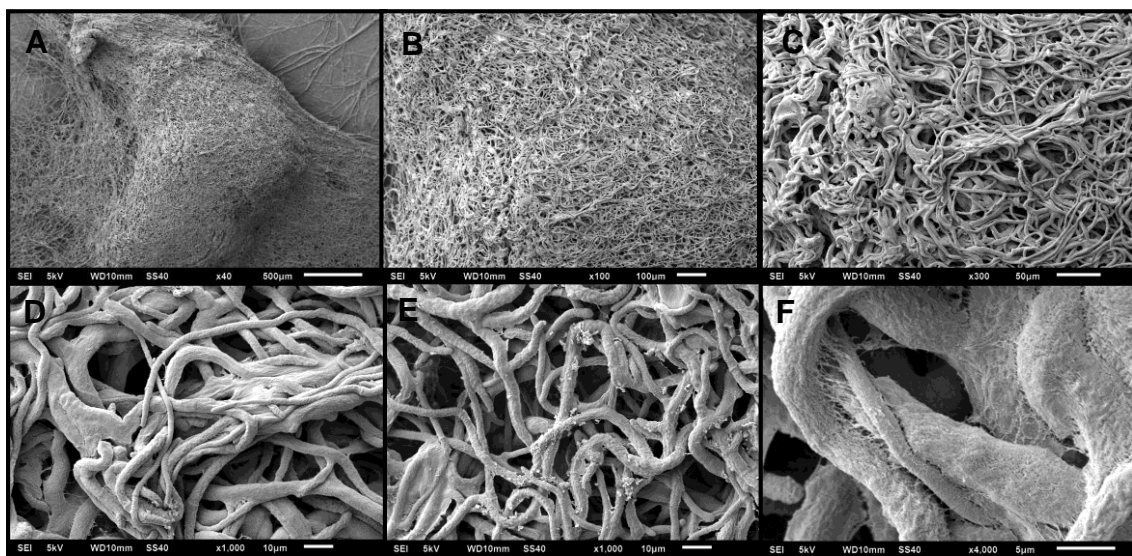


Figura 11. Fase intermediária avançada do desenvolvimento do escleródio de *S. sclerotiorum*, por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A – Escleródio intermediário avançado 500 μ m. B – Escleródio intermediário avançado 100 μ m. C – Escleródio intermediário avançado 50 μ m. D – Escleródio intermediário avançado 10 μ m. E - Escleródio intermediário avançado 10 μ m. F – Escleródio intermediário avançado 5 μ m.

Na figura 12 observa-se a fase tardia de desenvolvimento do escleródio, porém ainda não melanizado. Nota-se o tão compactada as hifas estão (Figuras 12C, D e E), resultando em uma estrutura arredondada (Figura 12A).

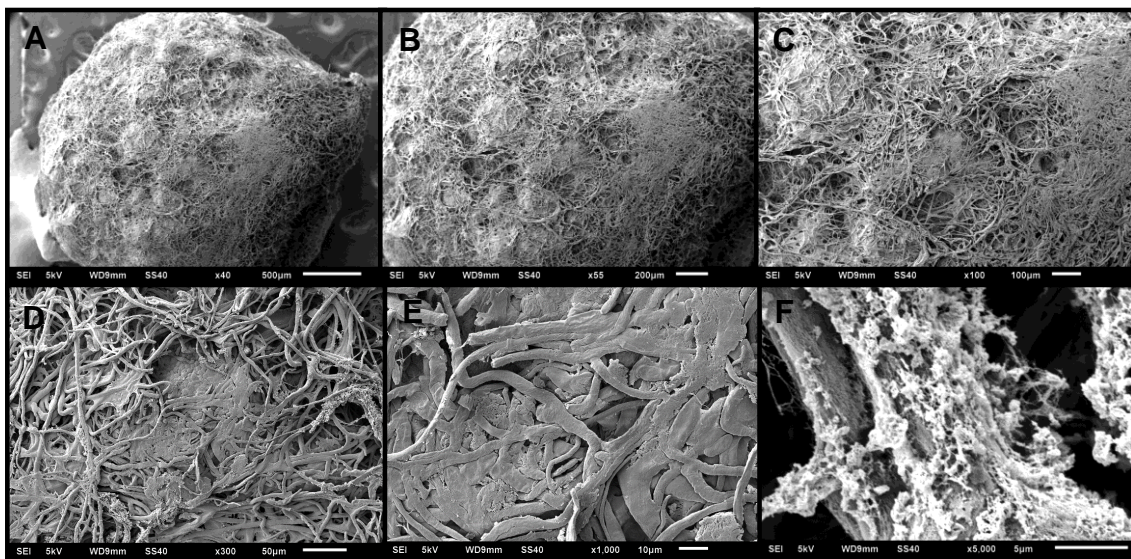


Figura 12. Fase tardia não melanizada do desenvolvimento do escleródio de *S. sclerotiorum*, por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A – Escleródio tardio não melanizado 500 μ m. B – Escleródio tardio não melanizado 200 μ m. C – Escleródio tardio não melanizado 100 μ m. D – Escleródio tardio não melanizado 50 μ m. E - Escleródio tardio não melanizado 10 μ m. F – Escleródio tardio não melanizado 5 μ m.

A figura 13 representa uma microscopia eletrônica (MEV) do escleródio maduro melanizado. Na figura 13A observa-se uma estrutura irregular do escleródio maduro melanizado, já as figura 13B e 13C revelam a estrutura do interior do escleródio, formado por hifas e por matriz extracelular.

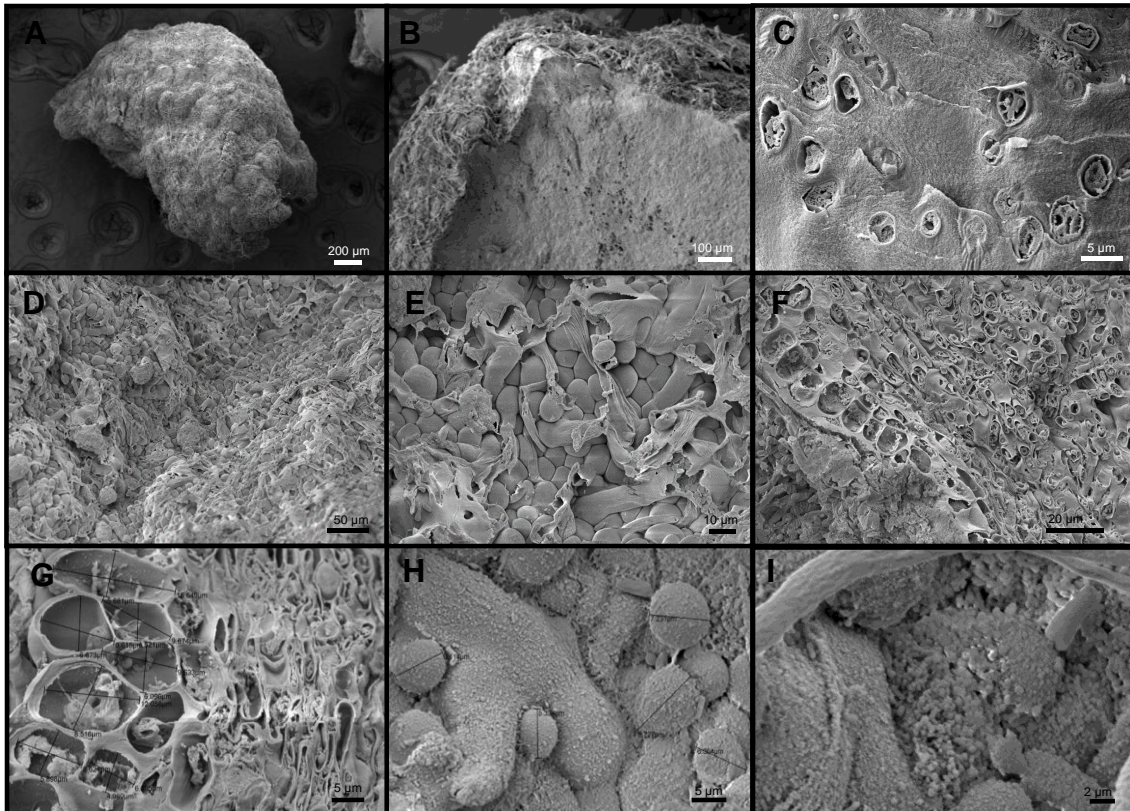


Figura 13. Escleródio maduro melanizado de *S. sclerotiorum*, por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A – Forma do escleródio com 200µm. B – Escleródio fraturado 100µm. C – Escleródio fraturado 5µm. D – Superfície do escleródio 50µm. E - Superfície do escleródio 10µm. F – Escleródio fraturado 200µm. G – Interior do escleródio 200µm. H - Superfície do escleródio 10µm. I - Superfície do escleródio fraturado 2µm.

5.0 Análise da expressão gênica do desenvolvimento do escleródio

As extrações de RNA realizadas dos escleródios melanizados e não melanizados resultaram em produtos íntegros, que foram avaliados através da eletroforese em gel de agarose 1,5%. Observamos então as bandas correspondentes às frações de RNA indicando que os mesmos não estão degradados.

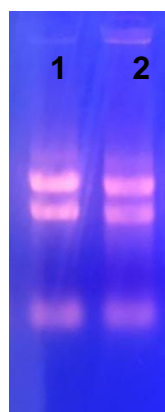
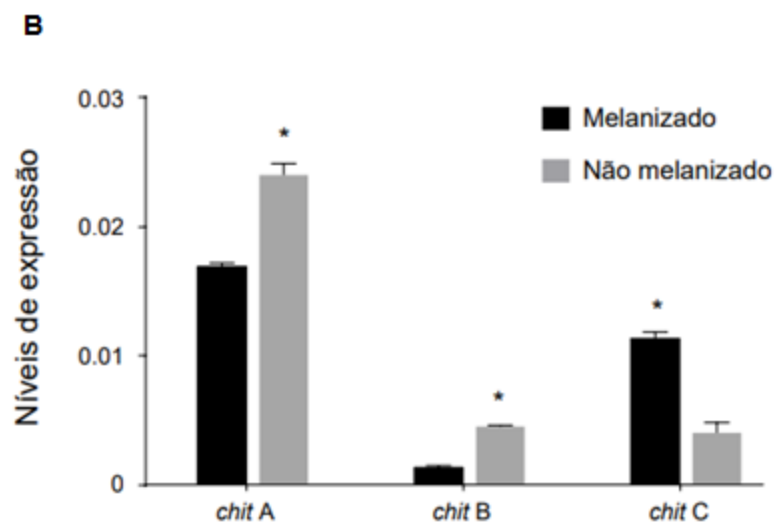
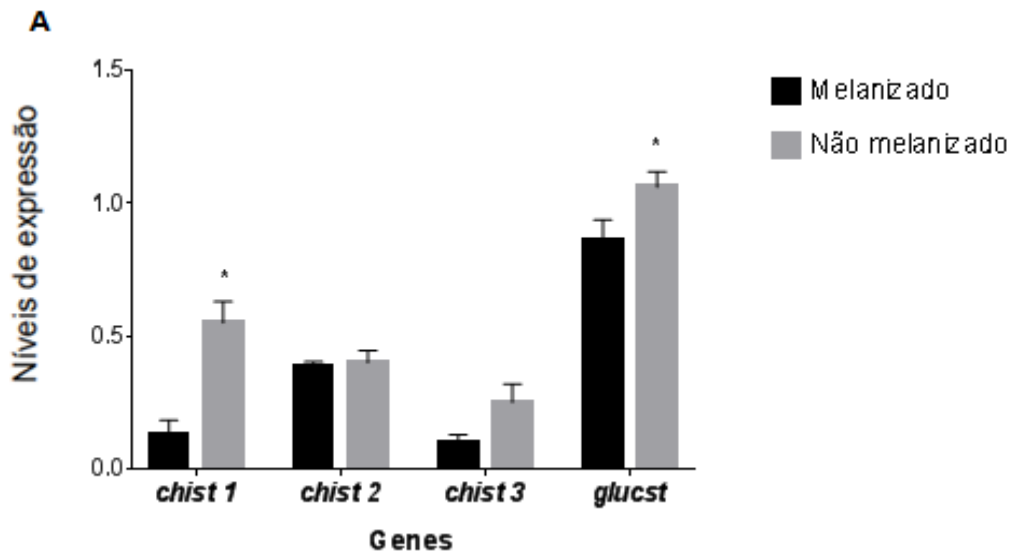


Figura 14. Análise da qualidade das amostras de RNA por eletroforese em gel de agarose 1,5%. (1) Amostra de RNA do escleródio melanizado; (2) Amostra de RNA do escleródio não melanizado.

A partir disso, as reações de PCR em tempo real que foram realizadas com escleródios de *S. sclerotiorum*. Foi possível observar aumento da expressão das diferentes *quitinas sintase* no escleródio não melanizado como demonstra a figura 15A.



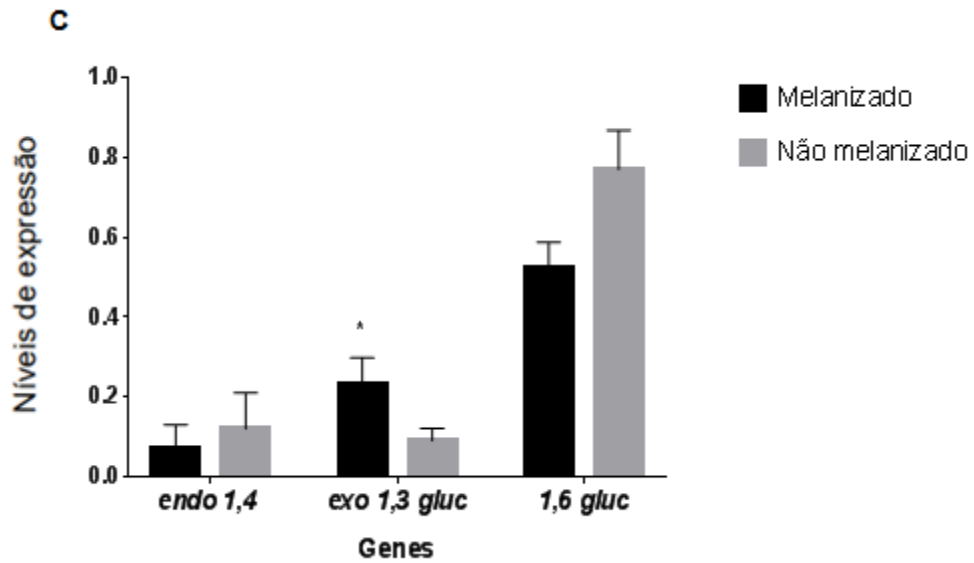
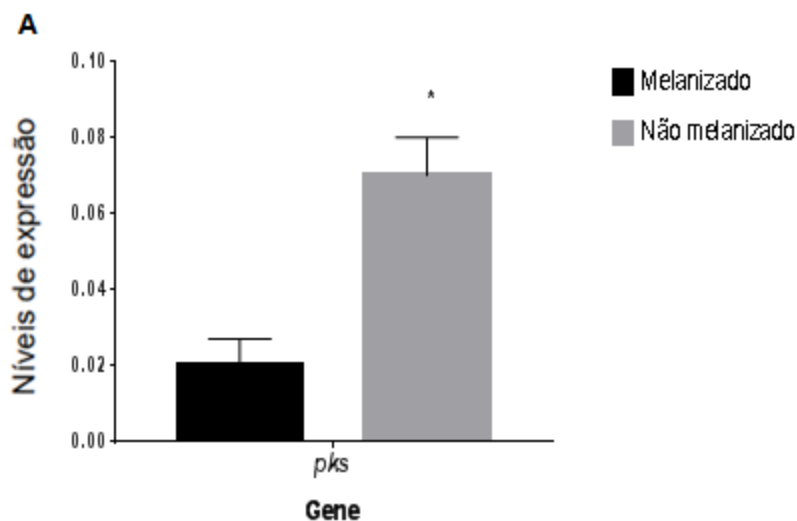


Figura 15. Níveis de expressão dos genes de síntese de parede nos escleródios melanizados e não melanizados de *S. sclerotiorum*. A - Expressão de genes *chist 1* (*quitina sintase 1*), *chist 2* (*quitina sintase 2*), *chist 3* (*quitinas sintase 3*) e *glucst* (*glucana sintase*). B - Expressão de genes *chit A* (*quitinase A*), *chit B* (*quitinase B*), *chit C* (*quitinase C*). C - Expressão de genes *endo 1,4* (*endo 1,4 beta-glucanase*), *exo 1,3* (*exo 1,3 glucanase*), *1,6 gluc* (*1,6 glucanase*). O gene da β -actina foi usado como gene de referência, Teste T ($p < 0.05$).

Foi observada a expressão de genes relacionados a melanização do escleródio. Entre eles *lac*, *pks* e *tiro*.



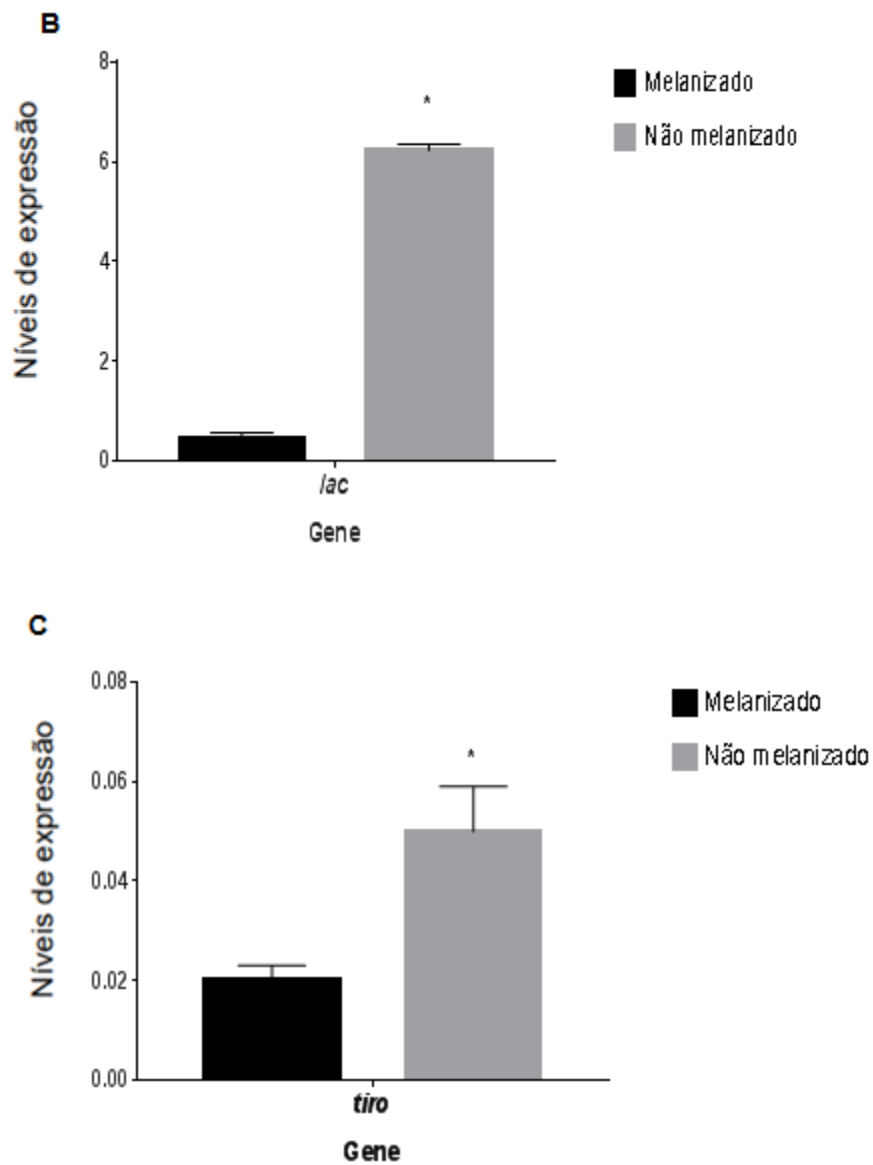


Figura 16. Níveis de expressão dos genes de melanina nos escleródios melanizados e não melanizados de *S. sclerotiorum*. A - Expressão do gene *pks* (*poliketídeo sintase*). B - Expressão do gene *lac* (*laccase*). C - Expressão do gene *tiro* (*tirosinase*). O gene da β -actina foi usado como gene de referência, Teste T ($p < 0.05$).

Foi observada a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento do escleródio. Entre eles *hk* e *ac*.

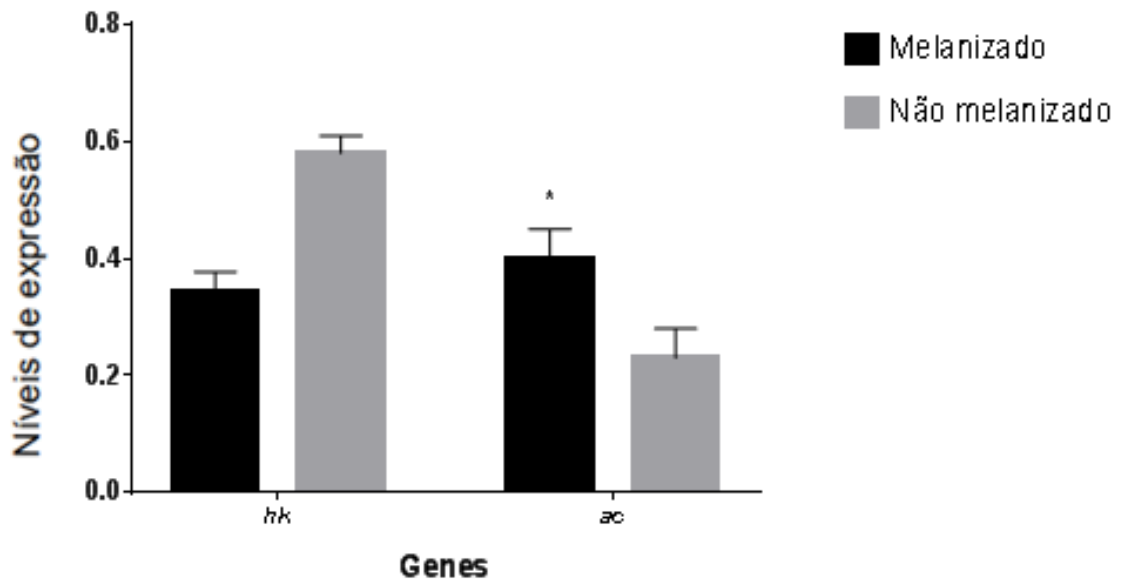


Figura 17. Níveis de expressão dos genes de desenvolvimento de escleródio nos escleródios melanizados e não melanizados de *S. sclerotiorum*. Expressão dos genes *hk* (*histidina quinase*) e *ac* (*adenilato ciclase*). O gene da β -actina foi usado como gene de referência, Teste T ($p < 0.05$).

6.0 Análise de Ensaio de Inibição do crescimento de *S. sclerotiorum*

No ensaio de inibição de *S. sclerotiorum*, com filtrado de espécies de *Trichoderma* spp. (ALL 42 e T00), foi possível observar a inibição do crescimento do fitopatógeno, em meio de cultura contendo filtrado de *Trichoderma* spp.

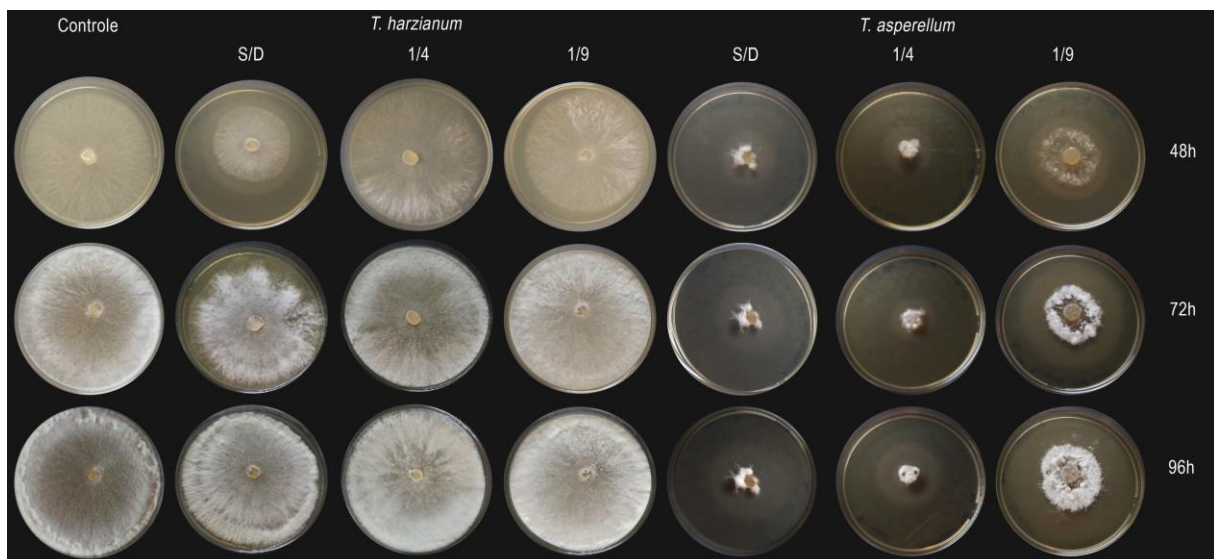


Figura 18. Placas com crescimento de *S. sclerotiorum*. Placas controle, sem o filtrado de *Trichoderma* spp. S/D – Sem diluição do filtrado. 1/4, 1/9 – diluições do filtrado de All-42 e T00. Nos tempos apresentados de modo horizontal na figura (48, 72 e 96 horas).

Na figura 18 se observa que o filtrado de T00, consegue inibir o crescimento de *S. sclerotiorum*.

A figura 19 demonstra o ensaio de inibição do crescimento de *S.sclerotiorum* com filtrado de ALL 42 e T00 no sétimo dia, neste ensaio pode ser observado além da inibição de crescimento o número de escleródios formados.

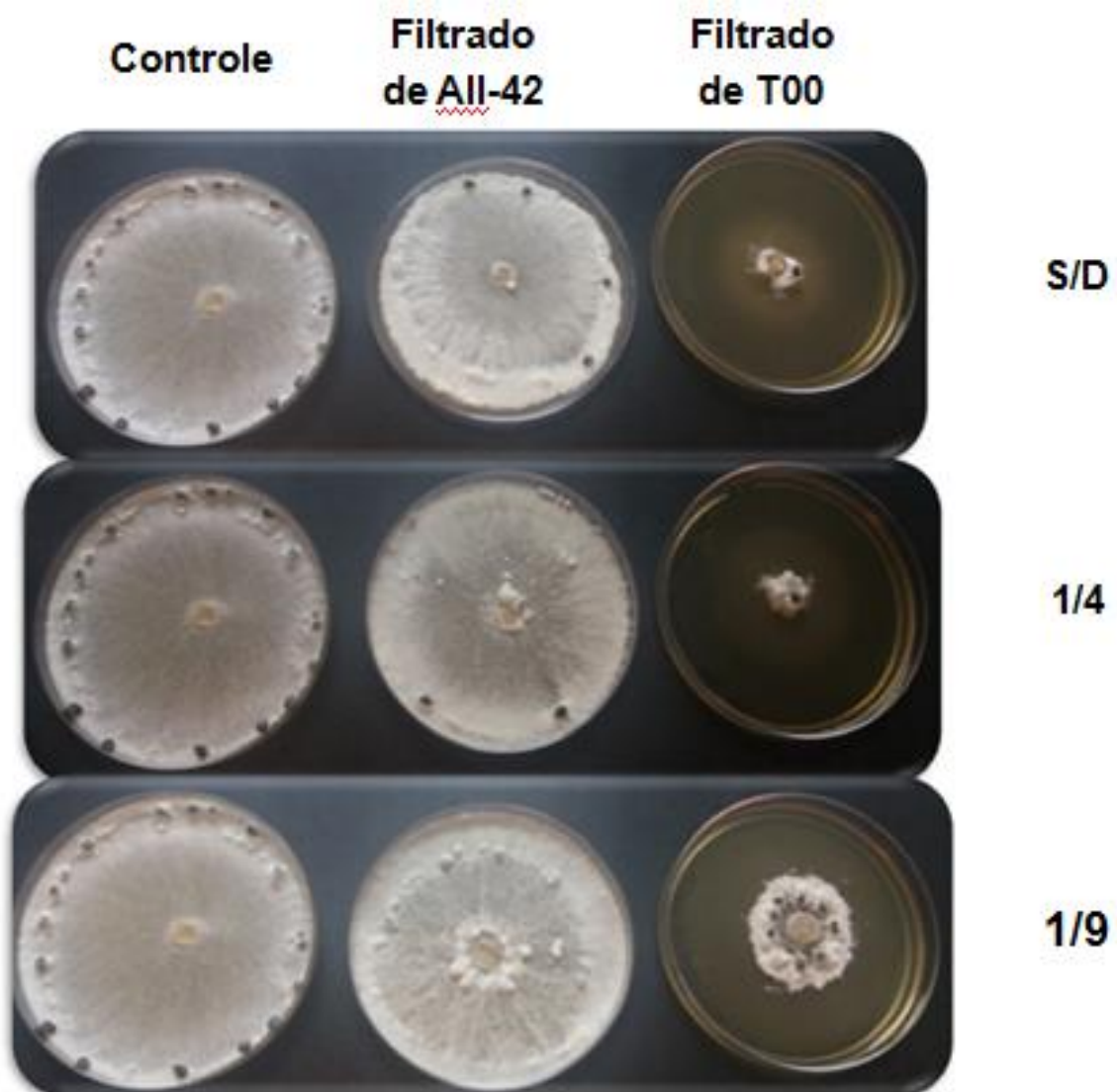


Figura 19. Placas com crescimento de *S. sclerotiorum* em 7 dias de crescimento. Placas controle, sem o filtrado de *Trichoderma* spp. S/D – Sem diluição do filtrado. 1/4, 1/9 – diluições do filtrado de All-42 e T00.

5. DISCUSSÃO

Segundo Willets e Bullock (1992) (54), a periferia do escleródio, região da superfície, é intensamente melanizada, enquanto o interior é hialino, sendo considerada por vários autores como sendo um mecanismo de resistência do próprio escleródio para sobreviver no ambiente. As melaninas são tipicamente de cor escura (geralmente preto ou marrom), acumula-se entre e sobre a superfície das células e muitas vezes na própria matriz extracelular, ela está envolvida no processo de redução da permeabilidade da parede, preenchendo os espaços e contribuindo também para a resistência a fatores do meio ambiente. A melanina juntamente com a quitina das paredes fúngicas, aumenta a proteção contra enzimas do próprio fungo e de outros microrganismos (16).

Nos cortes do escleródio não melanizado e melanizado pode ser observado no interior uma coloração azulada na região do córtex e medula, dentro das hifas. A coloração de Lillie permite diferenciar lipofuscinas de melanina, segundo Lillie (1956), lipofuscinas coram de azul ou verde-azulado, enquanto que melanina verde escuro, tons que podem variar.

Segundo Georgiu e Zees (2001) (55), lipofuscinas de origem lipídica e protéica foram detectadas em algumas espécies de *Rhizoctonia* spp. e *Sclerotinia* spp. entre elas *S. sclerotiorum*. Experimentos realizados mostraram que à medida que formava o escleródio, níveis de lipofuscinas aumentavam e depois com a degradação, esses mesmos níveis diminuía. Sugerindo que pigmentos de lipofuscinas estariam relacionados com o estresse oxidativo e a formação de escleródios, além da presença nessas estruturas (55).

Além da coloração para melanina, foi realizada a coloração de PAS (Ácido Periódico de Schiff) dos escleródios para detecção de conteúdo polissacarídeo. A coloração de PAS, formulada por McManus (1946), revela radicais 1,2-glicol presentes nos açúcares em resíduos de aldeído, pelo reagente de Schiff, que produz uma coloração púrpura a cor magenta nos locais do corte em que há muitos polissacarídeos.

As imagens da Figura 6 revelam que o tecido corado é PAS positivo, ou seja, apresenta constituição polissacarídica, no interior das hifas coradas, assim como descrito por Bullock et al. (1980) (56), porém em *Sclerotinia minor*. As reações revelam que o principal polissacarídeo presente no citoplasma das hifas é o

glicogênio, sendo detectado nas hifas da medula e córtex, principalmente. Na superfície do escleródio, onde irá formar a camada de melanina Bullock et al (1980) (57) observou pouca quantidade de glicogênio, onde também pode ser observado na imagem (Figura A e B).

No entanto, após tratamento com amilase (Figura B), enzima que remove glicogênio, não foi possível observar alteração na coloração. Assim, provavelmente a composição do escleródio de *S. sclerotiorum*, envolve a presença de glicogênio, porém não em grande quantidade, assim como outros polissacarídeos PAS positivo. Como já descrito anteriormente, o glicogênio está presente nas hifas, em praticamente todos os estágios do desenvolvimento. No entanto, segundo Bullock (1980) (57), no decorrer da maturação do escleródio a quantidade de glicogênio, no citoplasma dessas hifas, diminuía, à medida que essas células se pigmentavam.

Bullock et al (1980) (57) relata que além do glicogênio, β 1, 3 glucana, polifosfato estão presentes nas hifas de *Sclerotinia minor* e que durante o processo de germinação do escleródio são removidos do seu local de armazenamento e são metabolizados. Willets e Bullock (1992) (58) relatam que em *S. sclerotiorum* e *S. minor* a composição química da matriz extracelular é semelhante.

Shafie et al (2014) detectaram glicogênio em células mononucleares com PAS, porém observaram algumas limitações dessa coloração, como a insensibilidade da coloração da membrana a ação da amilase e que nem toda substância PAS positiva da membrana é conhecida. Ainda, que o glicogênio é uma estrutura ramificada complexa, tornando-se muito difícil a ação da amilase por completo, ou seja, a diástase pode não ocorrer. Nas figuras B e D a região da membrana da hifa também não sofreu alteração de coloração pela ação da amilase.

Foram realizadas colorações que evidenciam a presença de proteínas nos cortes do escleródio. Entre elas o Azul de Toluidina, Azul de Bromofenol e Xylidine Ponceau. As figuras 7A e 7B apresentam um mesmo corte do escleródio, porém em diferentes dimensões corado por Azul de Toluidina, 7C e 7D Azul de Bromofenol e 7E e 7F Xylidine Ponceau.

Ambos os cortes mostram uma coloração nas bordas do escleródio, composta por melanina. Willets e Bullock (1992) (16) descrevem essa camada com células espessas e pigmentadas, onde as hifas nessa superfície estão envolvidas com o desenvolvimento do escleródio através do transporte de nutrientes. Nos experimentos de Bull (1970) (59), foi observado uma relação entre a melanina e a

lise das células fúngicas. Utilizando *Aspergillus nidulans*, ele observou que o grau de lise da célula dependia da extensão da melanização (60).

Quando os cortes foram corados pelo Azul de Toluidina e Xylidine Ponceau é possível observar de forma mais acentuada a intensa coloração, principalmente, nessa superfície, bem como nas áreas adjacentes, sendo compatível com o direcionamento de melanina para superfície do escleródio (Figuras 7B e 7F), já que este é uma estrutura de resistência do fungo e a melanina confere proteção quando o mesmo se encontra no ambiente.

É possível observar nas figuras 7B e 7F a presença de um conteúdo proteico sendo secretado pelo escleródio, através de hifas que parecem emergir dessa camada. Sugerindo que esse conteúdo protéico seja secretado através de vesículas por este fungo. A literatura relata a presença de vesículas por diversos fungos, Ghugtyal et al (2015) (60), descreve essas vesículas em *Candida albicans*, Fisher e Roberson (2016) (59) relata também entre os zigomicetos *Mortierella verticillata* e *Gilbertella persicaria* (61).

Willetts e Bullock (1992) (16) descreve que em escleródios maduros, ou seja onde já ocorreu o processo de melanização, há corpos protéicos, sendo a maior reserva citoplasmática. Nas figuras 7D e 7F, pode ser observada a presença de proteínas, pela coloração no interior dessas hifas. No entanto no processo de germinação desse escleródio, segundo Bullock *et al* (1983) (62) todo esse material de reserva energética presente nessas células parece ser removido e metabolizado, restando apenas a camada mais externa.

O processo de infecção de *S. sclerotiorum* e *S. minor* em feijão, segundo Willetts e Wong (1980) (18) acontece por meio da ação de vesículas presentes nos escleródios, que emergem hifas e através delas ocorre o processo de invasão na planta. Uma vez, dentro do hospedeiro, o micélio se desenvolve, com hifas de diferentes tamanhos e formas, e então são formadas as lesões com 48-72 horas após a infecção (11,18).

Ambos os cortes mostram uma coloração nas bordas do escleródio, composta por melanina. Willetts e Bullock (1992) (16) descrevem essa camada com células espessas e pigmentadas, onde as hifas nessa superfície estão envolvidas com o desenvolvimento do escleródio através do transporte de nutrientes. Nos experimentos de Bull (1970) (59), foi observado uma relação entre a melanina e a

lise das células fúngicas. Utilizando *Aspergillus nidulans*, ele observou que o grau de lise da célula dependia da extensão da melanização (60).

Quando os cortes foram corados pelo Azul de Toluidina e Xylidine Ponceau é possível observar de forma mais acentuada a intensa coloração, principalmente, nessa superfície, bem como nas áreas adjacentes, sendo compatível com o direcionamento de melanina para superfície do escleródio (Figuras 7B e 7F), já que este é uma estrutura de resistência do fungo e a melanina confere proteção quando o mesmo se encontra no ambiente.

É possível observar nas figuras 7B e 7F a presença de um conteúdo proteico sendo secretado pelo escleródio, através de hifas que parecem emergir dessa camada. Sugerindo que esse conteúdo protéico seja secretado através de vesículas por este fungo. A literatura relata a presença de vesículas por diversos fungos, Ghugtyal et al (2015) (60), descreve essas vesículas em *Candida albicans*, Fisher e Roberson (2016) (59) relata também entre os zigomicetos *Mortierella verticillata* e *Gilbertella persicaria* (61).

Willettts e Bullock (1992) (16) descreve que em escleródios maduros, ou seja onde já ocorreu o processo de melanização, há corpos protéicos, sendo a maior reserva citoplasmática. Nas figuras 7D e 7F, pode ser observada a presença de proteínas, pela coloração no interior dessas hifas. No entanto no processo de germinação desse escleródio, segundo Bullock et al (1983) (62) todo esse material de reserva energética presente nessas células parece ser removido e metabolizado, restando apenas a camada mais externa.

O processo de infecção de *S. sclerotiorum* e *S. minor* em feijão, segundo Willettts e Wong (1980) (18) acontece por meio da ação de vesículas presentes nos escleródio, que emergem hifas e através delas ocorre o processo de invasão na planta. Uma vez, dentro do hospedeiro, o micélio se desenvolve, com hifas de diferentes tamanhos e formas, e então são formadas as lesões com 48-72 horas após a infecção (11,18).

A figura 8 apresenta a região da superfície com fluorescência mais intensa, onde provavelmente se encontra uma quantidade maior de melanina que floresce na luz ultravioleta. Segundo Tamler et al. (2009), o pigmento melânico é detectado pela lâmpada wood, que detecta fluorescência, o mesmo acontece quando cortes dos escleródios são corados com calcoflúor. A figura 8B mostra o corte do interior do escleródio de *S. sclerotiorum*. Assim como descrito por Bullock et al (1980) (57), que

estudaram a morfologia do escleródio do fungo *S. minor*, descreveram que a parede apresenta intensa coloração por calcoflúor e a matriz uma coloração mais moderada, assim como nas imagens (Figura 8).

Em relação às imagens de microscopia de varredura, pode ser observado que no primeiro estágio de desenvolvimento do escleródio, a iniciação, observa-se a ramificação e a fusão das hifas, entrelaçando e aderindo umas as outras (figuras 9A, 9B e 9C). Erental *et al* (2008) (15) descrevem como um processo de fusão de hifas iniciais, anastomose, que relata ser comum em estágios durante o ciclo de vida dos fungos filamentosos. Além da função comunicativa entre as hifas, ocorre também para a passagem de água e nutrientes, através desse processo (15,64).

Na Figura 9D a seta sinaliza possíveis produtos desse entrelaçamento de hifas. Vários produtos metabólicos produzidos pelo fungo, no meio ou no micélio, tem total influência na produção do escleródio. No seu desenvolvimento ele é coberto por gotículas de exsudato e por uma membrana que no decorrer do seu amadurecimento e pigmentação tende a desaparecer (11).

Nas figuras 10A, B, C e D, através de um aumento das imagens, pode ser observado um maior entrelaçamento das hifas, desenvolvendo ainda mais o escleródio. Willetts e Bullock (1982) (57) relatam ter dois tipos diferentes de hifas em *S. rolfsii*, hifas do tipo translocais e laterais. Descreve também que para o início da formação do escleródio as hifas do tipo laterais passam a ofertar nutrientes e água para as demais hifas do escleródio. Assim passa a ter um rearranjo para passar esses nutrientes, porém no decorrer da maturação do escleródio essa necessidade e busca por nutrientes parece diminuir, já que há um acúmulo de reserva de material na região do córtex.

Willetts e Wong (1980) (57), descrevem que a formação do escleródio em *S. sclerotiorum* com mecanismos fisiológicos e bioquímicos não são conhecidos. Sabem se que os nutrientes para o desenvolvimento dessas estruturas, são passados através de algumas hifas e descrevem o aparecimento de pequenas gotículas, que sugerem estar envolvido no desenvolvimento do escleródio. Segundo o estudo de Liang (2010) (65), onde foi avaliada a composição proteica do exsudato de *S. sclerotiorum*. O maior número de proteínas encontradas está relacionado ao metabolismo de carboidratos, principalmente a síntese da parede fúngica. *S. sclerotiorum* demonstrou conter grandes quantidades de 1,3 -glucana e quitina. Foi

observado também a presença da laccase, enzima, responsável pelo processo de melanização.

Enzimas também relacionadas à patogenicidade desse fungo como arabinofuranosidases, responsável pela degradação da parede vegetal. Além de proteínas responsáveis pelo metabolismo de aminoácidos e 32%, com atividades desconhecidas (65). Segundo Willets (1980) (57) para ocorrer o processo de colonização de uma planta, há uma série de enzimas envolvidas e mudanças de permeabilidade na membrana, resultando numa infecção. As fosfolipases, por exemplo, apresentam atividade crescente no decorrer do desenvolvimento da doença em feijão (57).

Na figura 12 observa-se a fase tardia de desenvolvimento do escleródio, porém ainda não melanizado. Nota-se o tão compactada as hifas estão (Figuras 12C, D e E), resultando em uma estrutura arredondada (Figura 12A).

É possível notar, principalmente na figura 12D, o quanto essas hifas apresentam-se unidas. Estando de acordo com Ordonez-Valencia *et al.* (2014) (14), que também observaram que durante a fase de desenvolvimento, as hifas se uniram e se tornaram compactadas, resultando assim numa estrutura ligeiramente arredondada e os micélios que cobrem sua superfície dessa estrutura, irão constituir a camada de melanina dos escleródios. Também na figura F, observa-se uma quantidade de material secretado por essas hifas durante o processo de formação do escleródio, também já descrito na Figura 10.

Na figura 13E nota-se um material membranoso envolvendo a superfície do escleródio, segundo Ordonez-Valencia *et al.* (2015) (14) essa membrana é originada dos exsudatos liberados durante a formação do escleródio (17). Descrevem também, que nessa fase o escleródio passa por um processo de deposição de polissacarídeos e pigmentação de melanina.

Com o escleródio já maduro, pigmentado, observa-se uma textura mais áspera (Figura 13C e D) com a presença de várias cavidades (Figuras 13G, H e I). Segundo Ordonez-Valencia *et al.* (2014) (14), o micélio pode absorver nutrientes essenciais para o fungo, incorporando esse material como um componente de reserva. No entanto nessa fase, já não apresenta gotículas na superfície, como na Figura 9, ainda no início do seu desenvolvimento, nesse estágio os autores, descritos acima, relatam o escleródio com aparência desidrata.

Bolton *et al* (2006) (67), descrevem que nesse último estágio de maturação do escleródio, a superfície torna-se pigmentada devido a produção de melanina. Fator que vem sendo alvo de estudos para um possível controle desse fitopatógeno, já que a melanina desempenha um papel importante na proteção do fungo contra raios UV e possíveis enzimas de ataque de outros microorganismos

Na análise de expressão gênica, através das reações de PCR em tempo real que foram realizadas com escleródios de *S. sclerotiorum*. Foi possível observar aumento da expressão das diferentes *quitinas sintase* no escleródio não melanizado como demonstra a figura 15A.

A composição química da parede celular dos fungos é bastante complexa, constituída principalmente por polissacarídeos, ligados ou não a proteínas ou lipídeos, polifosfatos e íons inorgânicos. Quitinas, glucanas, galactomananas e proteínas são os compostos mais frequentes, variando entre as diferentes espécies de fungos. Segundo Fukuda *et al* (2009) (68), a parede celular de *S. cerevisiae* é constituída por glucanas e mananas sendo organizada em duas camadas formadas por quatro classes de macromoléculas como proteínas de parede celular β -(1 \rightarrow 6)-D-glucana, β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana e quitina, com estes componentes interconectados através de ligações covalentes (68).

Já em fungos filamentosos como *Aspergillus fumigatus* a parede é desprovida de β -1,6-glucana, mas rica em α -1,3-glucana, β -1,3-glucana/1,4-glucana e proteínas modificadas com galactomananas N- e O ligadas.(69). A quitina, um homopolímero linear longo, formado por resíduos de N-acetilglucosamina β -(1 \rightarrow 4) ligados, compõe a parede celular de leveduras embora seja encontrada em maior proporção em fungos filamentosos (68,69).

As quitinas sintases são responsáveis pela polimerização de quitina, Shaw *et al.* (1991) (70), estudaram a função da quitina sintase 1 (*Chs 1*) e quitina sintase 2 (*Chs 2*) no fungo *Saccharomyces cerevisiae*, relatando que a *Chs 1* foi a primeira a ser caracterizada e tem função ligada ao reparo, durante a separação celular. Enquanto que a *Chs 2* é essencial para formação dos septos e também divisão celular. Já *Chs 3* é relatada como responsável pelo crescimento normal das hifas e o depósito da quitina na parede celular no fungo *A. fumigatus* por Wang *et al.* (1999) (71).

No gráfico é possível observar um aumento de expressão dos genes codificantes das quitinas sintase no escleródio não melanizado, logo se correlaciona

com dados da literatura que remete ao fato da presença de quitina, β -1, 3 glucana em células da medula do escleródio. No decorrer que há o amadurecimento desse escleródio, as hifas continuam a ter quitina e glucanas, além da presença da melanina (11). Porém a expressão do gene codificante de quitina sintase parece diminuir, com a melanização do escleródio, isso acontece com os três genes no gráfico A.

Segundo Walker *et al.* (2010) (72), utilizando a levedura *Candida albicans* demonstraram que a produção de melanina foi impulsionada pela adição de N-acetilglucosamina ao meio de cultura, indicando uma possível associação entre a produção de melanina e a síntese de quitina. A quitina sintase inibe a melanização ao longo da parede celular com acúmulo de melanina dentro das células. Os mutantes nulos de *quitina sintase* no caso *chs2* e *chs3* foram grosseiramente defeituosos na presença de melanina na parte exterior da célula (72). Podendo relacionar com os resultados do gráfico, já que as expressões dos genes codificantes das quitinas diminuíram à medida que houve a melanização do escleródio.

No gráfico B observa uma expressão do gene que codifica a quitinase A. Nos fungos a quitinase degrada a parede celular, além de atuar no crescimento de hifas e integração da quitina. A família 18 das quitinases são encontradas em fungos e subdivididas em grupos. Esses grupos, como A e C apresentam como exoquitinases, enquanto o B como uma endoquitinase (30). No gráfico sugere uma maior atividade de exoquitinases no escleródio não melanizado.

As β -1,3- glucanas compõem 30- 80% da estrutura da parede celular dos fungos, mas outros polímeros como a α -1,3-glucana, α - 1,4-glucana, β -1,3-1,4-glucana e β -1,6-glucana, quitosanas, mananas, galactomananas também são encontrados, porém em uma menor proporção (73). A síntese de β -1,3- glucanas envolve a ação da enzima glucana sintase. Gil *et al* (2001) relata que as glucanas auxiliam nos estágios iniciais de infecção de *Botrytis cinerea* introduzindo enzimas hidrolíticas, além de proteger o fungo contra as respostas do hospedeiro. No gráfico A pode ser observado um aumento de expressão do gene *glucst* no escleródio não melanizado, indicando uma possível maior produção de glucana antes do processo de melanização.

Enquanto que as β -glucanases, pode ser tanto exo quanto endo, degradam β -glucanos da parede, liberando moléculas de glicose. White *et al* (2002), relata que

na ausência de glicose terá uma maior produção de β -glucanases. No Gráfico C pode ser observada uma maior expressão dos genes de 1,6 glucanase e endo 1,4 β -glucanase em escleródio não melanizado, enquanto que exo 1,3 glucanase tem uma maior expressão em escleródio melanizado.

Foi observada a expressão de genes relacionados a melanização do escleródio. Entre eles *lac*, *pks* e *tiro*. Butler *et al.* (2009) (29), relatam que há poucos dados na literatura a respeito da produção de melanina pelo fungo *S. sclerotiorum*, enquanto que há muitos detalhes na biossíntese dos precursores de melanina fúngica, especialmente aqueles de origem pela via de policetídeo. Apesar das hifas fúngicas sintetizarem naturalmente DHN melanina (74), há evidências de que a melanina esclerodial é produzida através de outro caminho da biossíntese de L-dihidroxifenilalanina (DOPA), sendo ele um precursor exógeno e sofre oxidação pela enzima laccase. A literatura relata diferentes espécies de que utilizam a via da tirosinase também para síntese de melanina, como *Aspergillus terreus* (75), *Aspergillus nidulans* (76), entre outros.

A expressão dos genes da via de síntese de melanina demonstrou diferença na via do policetídeo e laccase, demonstrando uma maior expressão de *laccase* no escleródio não melanizado (gráfico B), já que é por ação dessa enzima que há a melanização por uma DOPA Melanina, como produto final, tendo uma menor expressão no escleródio melanizado.

Se a L-DOPA for a molécula precursora, ela é oxidada pela enzima laccase em dopaquinona, então é adicionada de um grupo amino e produz a ciclodopa, a qual é oxidada, em seguida, há um rearranjo dessa molécula formando di-hidroxi-indol (DHI) e ácido DHI carboxílico (DHICA), os quais são polimerizados para formar a DOPA melanina (77). No entanto se a tirosinase for a precursora da via é primeiro convertida em L-DOPA e depois em dopaquinona, nesse caso a enzima tirosinase realiza as duas etapas da via, tendo também sua expressão (Gráfico C).

Foi observada expressão elevada de *hk* nos escleródio não melanizado em relação ao escleródio melanizado (Figura 17).

Um fator importante para o desenvolvimento de escleródio é o papel do receptor acoplado à proteína G, um complexo heterotrimérico dividido em subunidades de cadeias polipeptídicas diferentes, denominadas α , β e γ (78). A subunidade α da proteína-G está ligada à uma molécula de guanina difosfato (GDP) e, uma vez ativada a proteína-G ativa outras proteínas. Este processo de ativação

da Proteína-G possui como moduladora a própria subunidade α que se torna uma GTPase, hidrolizando GTP à GDP, voltando a proteína para a sua forma inativa. A adenilato ciclase, enzima que faz parte dessa cascata de sinalização, que ao ser ativada é responsável pela utilização energética de moléculas de adenosina trifosfato (ATP) com formação de adenosina 5'- monofosfato cíclico (AMPc), um conhecido mensageiro celular intracitoplasmático.

O AMPc sofre a ação de uma fosfodiesterase AMPc específica, por hidrólise, produzindo adenosina monofosfato (AMP). Isolados mutantes de *Sclerotinia sclerotiorum* com deleção de *adenilato ciclase* mostraram alterações tanto morfológicas quanto de patogenicidade, além da formação anormal de escleródios, também relatam que a germinação dos escleródios em apotécio não ocorreu (19).

Segundo Chen *et al* (2004) (79) a concentração de AMPc elevada inibe a iniciação e maturação dos escleródios, sugerindo mais uma vez a importância dos níveis de AMPc para a formação e maturação dos escleródios de *S. sclerotiorum* (79,80). Foi evidenciado baixa expressão de *adenilato ciclase* nos escleródios não melanizados, o que corrobora para a maturação dos escleródios.

O gene de *histidina quinase*, está relacionado a sinalização celular e a ação das proteínas quinases, no caso dos fungos filamentosos, foi classificado em 11 grupos com base nessas proteínas. As histidinas quinase da classe III estão envolvidas na virulência dos fungos fitopatogênicos, em respostas ao estresse osmótico e demais processos fisiológicos. Segundo Duan *et al.* (2013) (20), no seu estudo foi realizado a exclusão de um gene de *histidina quinase*, *shk1*, comparando o crescimento desse fungo mutante e selvagem de *S. sclerotiorum*. Os dados obtidos relatam diminuição da taxa de crescimento, incapacidade de produção de escleródios e alteração da morfologia colonial (82).

Nesse mesmo estudo Duan *et al.* (2013) (20) também relatou que o *shk1* controla a resistência de *S. sclerotiorum* aos fungicidas Fenilpirrol e Dicarboximidas. Caracterizando a importância desse gene também no controle ao estresse osmótico e oxidativo. Logo percebemos o aumento da expressão de *hq* nas fases iniciais do escleródio, corroborando com os dados relatados da literatura, já que o escleródio ainda esta em fase de maturação e desenvolvimento, ao contrário do escleródio melanizado, onde a expressão desse gene diminuiu e já ocorreu a maturação, demonstrando a ação desse gene a resposta ao estresse e desenvolvimento do escleródio.

No ensaio de inibição de *S. sclerotiorum*, com filtrado de espécies de *Trichoderma* spp. (ALL 42 e T00), foi possível observar a inibição do crescimento do fitopatógeno, em meio de cultura contendo filtrado de *Trichoderma* spp.

Na figura 18 se observa que o filtrado de T00, consegue inibir o crescimento de *S. sclerotiorum*. A literatura desde 1932 vem relatando o papel do *Trichoderma* spp. contra os fitopatógenos. Entretanto o nível de controle pode variar, dependendo do isolado e das condições que ele se encontra. Dennis e Webster (1971) (81) observaram que espécies de *Trichoderma* podem ter “preferências” ao agir com diferentes fungos.

A figura 19 demonstra o ensaio de inibição do crescimento de *S. sclerotiorum* com filtrado de ALL 42 e T00 no sétimo dia, neste ensaio pode ser observado além da inibição de crescimento o número de escleródios formados. De acordo com esses resultados apresentados, foi observado maior inibição nas placas com o filtrado puro, quando comparado com as diluições realizadas, em relação a espécie de T00, porém se observa uma maior inibição de produção de escleródios, com filtrado de ALL 42.

Diversas enzimas atuam no micoparasitismo, como as proteases que atuam degradando a parede celular do fitopatógeno, facilitando a colonização do *Trichoderma*. Segundo Ait-Lahsen *et al.* (2001), o fungo *T. harzianum* é capaz de secretar α -1,3 glucanase, enzimas que mostram atividade antifúngica. Enzimas essas denominadas mutanases, extracelulares capazes de degradar polímeros de glicose ligada por ligações α -1,3-glicosídicas (82).

A lise das hifas dos fungos fitopatogênicos envolve além de β -glucanases, quitinases e proteases. Garcia *et al.* (1994) relata que genes *chit42* e *chit33* codificam quitinases no *T. harzianum*. Seild *et al.* (2009) demonstrou que nos estágios iniciais da interação *Trichoderma* com fitopatógenos, os genes que codificam hidrolases também é expresso.

Segundo Jhon *et al.* (2015) (83), uma espécie de *T. harzianum*, Tr9, conseguiu reduzir a incidência da doença *Sclerotinia rolfsii* em 85%, diferentemente do ocorrido em nosso estudo, eles relatam que Tr10, *T. asperellum*, inibiu em 66% o crescimento do fitopágeno, sob condições de confronto. Vale ressaltar que as condições de cultivo foram outras e as espécies também, sugerindo que as espécies de *Trichoderma*, podem apresentar mecanismos de biocontrole diferentes, como já relatava Wells *et al.* (1972) (84).

No entanto o filtrado foi autoclavado, sugerindo que a ação dessa inibição seja por meio de metabólitos secundários. Um estudo de Oliveira *et al.*(2014) (85), mostra a ação de metabólitos do *Trichoderma* spp. com fitopatógenos, em uma metodologia bem semelhante, ele destaca a ação de alguns metabólitos envolvidos na inibição, como 6-Pentil-Alfa-Pirona (6PP), pertencente ao grupo das 2-pironas, um dos compostos mais estudadas produzidas pelo *Trichoderma* spp., participando da defesa contra outros microorganismos.

Vale ressaltar, que a capacidade de produção de metabólitos secundários por espécies de *Trichoderma* spp. são conhecidas desde de 1930, porém a importância de cada composto e sua função, ainda é alvo de estudos (51). Sabe-se que os potenciais desses metabólitos devem ser estudados e analisados, para a produção de substâncias, que venham a auxiliar na destruição de doenças de plantas, como por exemplo, o mofo branco.

6. CONCLUSÃO

Embora a formação de escleródios e todos os mecanismos que regulam essa produção pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, seja ainda alvo de muitos questionamentos. Neste trabalho, foi apresentado com mais detalhes as fases de desenvolvimento dessas estruturas, através de técnicas de microscopia juntamente com a técnica de PCR em tempo real, onde observou-se o processo morfológico de desenvolvimento das hifas, desde a iniciação até a fase de maturação.

A análise molecular através de PCR em tempo real permitiu avaliar alguns genes que estariam envolvidos nesse desenvolvimento e maturação. Permitindo analisar com mais clareza os processos metabólicos envolvidos no desenvolvimento dessas estruturas, principalmente em relação ao processo de melanização, processo esse que poderia ser alvo de inibição.

Este estudo permitiu sugerir possíveis vias de melanização, através da expressão gênica de *laccase* e *tirosinase*. Além de sugerir, também genes que estariam relacionados a síntese de parede no processo de melanização do escleródio como a *quitina sintase 1* e *glucana sintase*. Além das *quitinases A* e *C*, que apresentou diferentes expressões, no escleródio não melanizado e melanizado.

Além de possíveis formas de inibição de *Sclerotinia sclerotiorum* através do filtrado de T00, que mostrou inibir de forma mais acentuada o crescimento desse fitopatógeno. No entanto, o filtrado de ALL 42 revelou de algum modo, inibir a produção de escleródios e sua melanização, fatos que podem contribuir para possíveis estudos futuros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Leite RM. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. *Comun Técnico*, no 76 - Embrapa. 2005;1–3.
2. Teixeira RA. Mecanismos de Resistências a Fitodoenças.. Universidade Federal de Goiás; 2011.
3. Garcia RÁ, Meyer MC, Aparecida K, Barbosa G. Métodos de inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* para triagem de cultivares de soja resistentes ao mofo - branco. *Pesq agropec bras*. 2015;50:726–9.
4. Garcia RÁv, Juliatti FC, Cassemiro TA. Produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) de Bary em meio de cultura. *Biosci J*. 2012;28(1):1–7.
5. Reis EM, Casa RT, Gava F, Moreira ÉN, Sachs C. Indução da germinação carpopêgica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes substratos. 2011;145–50.
6. Silva LB da. Detecção, transmissão e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja. Universidade Federal de Lavras; 2011.
7. Bolton MD, Thomma BPHJ, Nelson BD. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Mol Plant Pathol*. 2006;7(1):1–16.
8. Luis W, Zancan A. Sensibilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* a fungicidas em sementes. Universidade Federal de Lavras; 2011.
9. Aguiar RA DE. Manejo do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* L.) em tomateiro industrial. UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS; 2011.
10. Townsend BB, Willetts HJ. The development of sclerotia of certain fungi. *Trans Br Mycol Soc* [Internet]. 1954;37(3):213–21. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0007153654800039>
11. Mehta N, Saharan GS. *Sclerotinia Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management*. India; 2008. 1-531 p.
12. Tourneau D Le. Morphology, Cytology and Physiology of *Sclerotinia* species in culture. Vol. 69, Symposium on *Sclerotinia*. 1979. p. 887–90.
13. Leite RMVB de C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. Embrapa. 2009;
14. Ordóñez-Valencia C, Ferrera-Cerrato R, Quintanar-Zúñiga RE, Flores-Ortiz CM, Guzmán GJM, Alarcón A, et al. Morphological development of sclerotia by

- Sclerotinia sclerotiorum*: a view from light and scanning electron microscopy. *Ann Microbiol.* 2014;65(2):765–70.
15. Erental A, Dickman MB, Yarden O. Sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum*: awakening molecular analysis of a “Dormant” structure. *Fungal Biol Rev.* 2008;22(1):6–16.
 16. Willetts HJ, Bullock S. Developmental biology of sclerotia. *Mycol Res.* 1992;96(10):801–16.
 17. Rollins JA, Dickman MB. pH Signaling in *Sclerotinia sclerotiorum* : Identification of a *pacC* / RIM1 Homolog pH Signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: Identification of a *pacC* / RIM1 Homolog. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(1):75–81.
 18. Willetts HJ, Wong J a.-L. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S.trifoliorum*, and *S.minor* with emphasis on specific nomenclature. *Bot Rev.* 1980;46:101–65.
 19. Jurick WM, Rollins JA. Deletion of the *adenylate cyclase (sac1)* gene affects multiple developmental pathways and pathogenicity in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Genet Biol.* 2007;44(6):521–30.
 20. Duan Y, Ge C, Liu S, Wang J, Zhou M. A two-component *histidine kinase Shk1* controls stress response, sclerotial formation and fungicide resistance in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mol Plant Pathol.* 2013;14(7):708–18.
 21. Tobergte DR, Curtis S. MOFO BRANCO (*Sclerotinia sclerotiorum*): ESTUDO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS E DA MODULAÇÃO DE LESÕES DE DNA E PRÉ-NEOPLÁSICAS in vivo. Vol. 53, *Journal of Chemical Information and Modeling.* Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL - MG; 2013.
 22. GIACHINI RM. EPIDEMIOLOGIA, CONTROLE QUÍMICO E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM MATO GROSSO. Universidade Federal de Mato Grosso; 2013.
 23. Clarkson JP, Staveley J, Phelps K, Young CS, Whipps JM. Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycol Res.* 2003;107(2):213–22.
 24. Boland GJ, Hall & R, Hall R. Canadian Journal of Plant Pathology Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum* Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiommm*. *Can J Plant Pathol.* 1994;16(January 2013):93–108.
 25. Peltier AJ, Bradley CA, Chilvers MI, Malvick DK, Mueller DS, Wise KA, et al. Biology, Yield loss and Control of *Sclerotinia* Stem Rot of Soybean. *J Integr*

- Pest Manag. 2012;3(2):1–7.
26. Purdy LH. : History, Diseases and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution, and Impact. *Phytopathology*. 1979;69(8):875.
 27. Kamal MM, Savocchia S, Lindbeck KD, Ash GJ. Biology and biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in oilseed Brassicas. *Australas Plant Pathol*. 2016;45(1):1–14.
 28. Arruda JH. Ação de agroquímicos no controle de mofo branco em soja. Universidade Tecnológica Federal do Paraná; 2014.
 29. Butler MJ, Gardiner RB, Day AW. Melanin synthesis by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia*. 2009;101(3):296–304.
 30. Akio KK. ESTUDO DA BIOGÊNESE DOS MELANOSSOMAS E O TRICICLAZOL NOS FUNGOS DEMÁCEOS FONSECAEA. Centro Universitário Estadual da Zona Oeste; 2009.
 31. Casadevall A, Eisenman HC. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;93(3):931–40.
 32. Bettiol W, Morandi M a. B. Biocontrole de Doenças de Plantas. Embrapa Meio Ambiente. 2009. 10-334 p.
 33. Ambrósio MMDQ, Bueno CJ, Padovani CR, Souza NL De. Controle de fitopatógenos do solo com materiais vegetais associados à solarização. *Summa Phytopathol*. 2008;34(4):354–8.
 34. Tolêdo-Souza ED, Júnior ML, Silveira PM, Café Filho AC. INTERAÇÕES ENTRE *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* E *Rhizoctonia solani* NA SEVERIDADE DA PODRIDÃO RADICULAR DO FEIJOEIRO. *Pesqui Agropecuária Trop*. 2009;39(1):13–7.
 35. Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol*. 2004;7(4):249–60.
 36. Punja ZK, Utkhede RS. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotechnol*. 2003;21(9):400–7.
 37. Fravel DR. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu Rev Phytopathol*. 2005;43:337–59.
 38. Kaewchai S, Soyong K. Application of biofungicides against *Rigidoporus microporus* causing white root disease of rubber trees. *J Agric Technol*. 2010;6(2):349–63.
 39. Khalifa RKM, Haggag HE. Effect of *Trichoderma* species on damping off

- diseases incidence , some plant enzymes activity and nutritional status of bean plants. *Plant Pathol.* 2010;6(9):486–97.
40. LORITO MR · PA · FV · SLWOO · RC · SL · SF · IS · SG · DT · F. SM. Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach *Current. Curr Genet.* 2006;50(5).
 41. Raquel González-Fernández Elena Prats, Jorrín-Novo J V. Proteomics of plant pathogenic fungi. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010.
 42. MONTERO-BARRIENTOS, M.; HERMOSA, R.; CARDOZA, R. E.; GUTIERREZ, S.; MONTE E. Functional analysis of the *Trichoderma harzianum* nox1 gene, encoding an NADPHoxidase, relates production of reactive oxygen species to specific biocontrolactivity against *Pythium ultimum*. *Appl Env Microbiol.* 2011;77:3009–16.
 43. SMITHA C.; FINOSH GT. RR. APK. Induction of hydrolytic enzymes of phytopathogenic fungi in response to {*Trichoderma*} viride influence biocontrol activity. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2014;3(9):1207–17.
 44. Shores M, Harman GE. Differential expression of maize chitinases in the presence or absence of *Trichoderma harzianum* strain T22 and indications of a novel exo- endo-heterodimeric chitinase activity. *BMC Plant Biol.* 2010;10:136.
 45. Machado DFM, Parzianello FR, Silva ACF da, Antonioli ZI. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. *Rev Ciências Agrárias.* 2012;35(1):274–88.
 46. RAMADA MHS. ANÁLISE DO SECRETOMA DO FUNGO *Trichoderma harzianum* CRESCIDO EM PRESENÇA DE GLICOSE OU PAREDE CELULAR DE *Fusarium solani*. UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS; 2010.
 47. TROIAN RF. ANÁLISE DO SECRETOMA DA INTERAÇÃO ENTRE *Trichoderma Harzianum* E OS ESTAGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO FITOPÁTOGENO *Sclerotinia Sclerotiorum*. R. Universidade de Brasília; 2014.
 48. Meyer MC, Campos HDC, Godoy C V, Ultiamada CM. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco *Sclerotinia sclerotiorum* em soja, na safra 2013/2014 – resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. 2014;(Tabela 1):1–4.
 49. Mukherjee M, Mukherjee PK, Horwitz B a., Zachow C, Berg G, Zeilinger S. *Trichoderma-Plant Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control.* *Indian J Microbiol.* 2012;52(4):522–9.
 50. Ethur LZ, Cembranel CZ, Silva ACF da. SELEÇÃO DE *Trichoderma* spp .

- VISANDO AO CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum*, in vitro. *Ciência Rural*, St Maria. 2001;31:885–7.
51. Vargas WA, Mukherjee PK, Laughlin D, Wiest A, Moran-diez ME, Kenerley CM. Role of gliotoxin in the symbiotic and pathogenic interactions of *Trichoderma virens*. *Microbiology*. 2014;1944:2319–30.
 52. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
 53. Li Y, He F, Lai H, Xue Q. Mechanism of in vitro antagonism of phytopathogenic *Sclerotium rolfsii* by actinomycetes. *Eur J Plant Pathol*. 2017;149(2):299–311.
 54. Bullock S, Willetts HJ. Ultrastructural and histochemical studies on mycelial germination of sclerotia of *Sclerotinia minor*. *Mycol Res*. 1996;100(5):561–70.
 55. Georgiou CD, Zees A. Lipofuscins and sclerotial differentiation in phytopathogenic fungi. *Mycopathologia*. 2001;203–8.
 56. BULLOCK, G.L., GRIFFIN, B. R.; STUCKEY HM. Detection of *Corynebacterium salmoninus* by direct fluorescent antibody test. *Can J Fish AquatSci*. 1980;37:719–21.
 57. BULLOCK S, ASHFORD AE, WILLETTS HJ. The Structure and Histochemistry of Sclerotia of *Sclerotinia minor* Jagger. *Protoplasma*. 1980;26:333--351.
 58. Willetts HJ, Bullock S. Developmental biology of sclerotia. *Mycol Res* [Internet]. 1992;96(10):801–16. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81027-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81027-7)
 59. Bull AT. Inhibition of polysaccharases by melanin: Enzyme inhibition in relation to mycolysis. *Arch Biochem Biophys*. 1970;137(2):345–56.
 60. Willetts HJ, Wong a. L. Ontogenetic diversity of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* and related species. *Trans Br Mycol Soc*. 1971;57(3):515-IN21.
 61. Fisher KE, Roberson RW. Hyphal tip cytoplasmic organization in four zygomycetous fungi. *Mycologia* [Internet]. 2016;108(3):533–42. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3852/15-226>
 62. Bullock S, Willetts HJ. Ultrastructural and histochemical studies on mycelial germination of sclerotia of *Sclerotinia minor*. *Mycol Res*. 1996;100(5):561–70.
 63. COLEY-SMITH JR, COOKE RC. Surviv Al and Germination of Fungal Sclerotia. *Annu Rev Phytopathol*. 1971;9:65–92.
 64. Glass NL, Rasmussen C, Roca MG, Read ND. Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. *Trends Microbiol*. 2004;12(3):135–41.

65. Liang Y, Strelkov SE, Kav NN V. The proteome of liquid sclerotial exudates from sclerotinia sclerotiorum. *J Proteome Res.* 2010;9(6):3290–8.
66. Colotelo N. A scanning electron microscope study of developing sclerotia of *Sclevotinia sclevotiorum*. *Can J Bot.* 1974;5:1127–30.
67. Bolton MD, Thomma BPHJ, Nelson BD. *Sclerotinia sclerotiorum* Lib de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Mol Plant Pathol.* 2006;7(1):1–16.
68. Fukuda EK, Vasconcelos AFD, Matias AC, Barbosa A de M, Dekker RFH, Silva M de LC da. Fungal cell wall polysaccharides: purification and characterization. *Semin Ciências Agrárias* [Internet]. 2009;30(1):117–34. Available from: <http://www.cabdirect.org/abstracts/20093125711.html>
69. Karkowska-Kuleta J, Kozik A. Cell wall proteome of pathogenic fungi. *Acta Biochim Pol.* 2015;62(3):339–51.
70. Shaw JA, Mol PC, Bowers B. The Function of *Chitin Synthases 2 and 3* in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle J. *J Cell Biol.* 1991;114(1):111–23.
71. Wang Z, Zheng L, Hauser M, Becker JM, Szaniszlo PJ. WdChs4p, a homolog of *chitin synthase 3* in *Saccharomyces cerevisiae*, alone cannot support growth of *Wangiella* (*Exophiala*) *dermatitidis* at the temperature of infection. *Infect Immun.* 1999;67(12):6619–30.
72. Walker CA, Gómez BL, Mora-Montes HM, Mackenzie KS, Munro CA, Brown AJP, et al. Melanin externalization in *Candida albicans* depends on cell wall chitin structures. *Eukaryot Cell.* 2010;9(9):1329–42.
73. RIBEIRO MS. Caracterização funcional do gene gluc31 que codifica uma β -1 , 3-glucanase da família GH16 de *Trichoderma harzianum* Caracterização funcional do gene gluc31 que codifica uma β -1 , 3-glucanase da família GH16 de *Trichoderma harzianum*. Universidade Federal de Goiás; 2017.
74. Henson JM, Butler MJ, Day AW. THE DARK SIDE OF THE MYCELIUM: Melanins of Phytopathogenic Fungi. *Annu Rev Phytopathol.* 1999;37(85):447–71.
75. Geib E, Gressler M, Viediarnikova I, Hillmann F, Jacobsen ID, Nietzsche S, et al. A Non canonical melanin biosynthesis pathway protects *A terreus* conidia from environmental stress. *Cell Chem Biol.* 2016;23:1–11.
76. Pardo-Planas O.; Prade RA. MM. AHK. WMR. Prevention of melanin formation during aryl alcohol oxidase production under growth-limited conditions using an

- Aspergillus nidulans* cell factory. *Bioresour Technol.* 2017;243:874–82.
77. BERTOLAZ A. MELANINA FÚNGICA ATUA NA SINALIZAÇÃO DE ADAPTAÇÕES PRÉ-SIMBIÓTICAS PARA A INTERAÇÃO PLANTA-FUNGO ECTOMICORRÍZICO. UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO; 2016.
 78. Kleuss C, Raw AS, Lee E, Sprang SR, Gilman AG. Mechanism of GTP hydrolysis by G-protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(21):9828–31.
 79. Chen C, Harel A, Gorovoits R, Yarden O, Dickman MB. MAPK regulation of sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum* is linked with pH and cAMP sensing. *Mol Plant Microbe Interact.* 2004;17(4):404–13.
 80. MOURA ALD DE. EFEITO DA CAFEÍNA SOBRE A REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE POLIGALACTURONASES EM *Sclerotinia sclerotiorum*. Universidade Federal de Goiás; 2008.
 81. Dennis C, Webster J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. *Trans Br Mycol Soc [Internet].* 1971;57(1):41--IN4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0007153671800785>
 82. Sanz L, Montero M, Grondona I, Vizcaíno JA, Llobell A, Hermosa R, et al. Cell wall-degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma* biocontrol strains show correlation with rDNA taxonomic species. *Curr Genet.* 2004;46(5):277–86.
 83. John NS, Anjanadevi IP, Nath VS, Sankar SA, Jeeva ML, John KS, et al. Characterization of *Trichoderma* isolates against *Sclerotium rolfsii*, the collar rot pathogen of *Amorphophallus*. *Biol Control.* 2015;90:164–72.
 84. Wells HD, Bell DK, Jaworski C a. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology.* 1972;62:442–7.
 85. Oliveira Isaias C, Martins I, Tavares JB, Silva D, Padilha J, Corrêa S, et al. Ação antagonista e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. *Summa Phytopathol.* 2014;40(1):34–41.
 86. Gartner, Leslie P.; HIATT, James L. Tratado de histologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

