

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

**ANÁLISE DO SECRETOMA DO FUNGO *Trichoderma harzianum*  
CRESCIDO EM PRESENÇA DE GLICOSE OU PAREDE  
CELULAR DE *Fusarium solani***

*MARCELO HENRIQUE SOLLER RAMADA*

GOIÂNIA - 2010

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

**ANÁLISE DO SECRETOMA DO FUNGO *Trichoderma harzianum*  
CRESCIDO EM PRESENÇA DE GLICOSE OU PAREDE  
CELULAR DE *Fusarium solani***

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás por Marcelo Henrique Soller Ramada para obtenção do grau de mestre em Biologia

Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valdirene Neves Monteiro

GOIÂNIA - 2010

## **BANCA EXAMINADORA**

### **Titulares:**

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa – Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Octavio Luiz Franco – Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia / Universidade Católica de Brasília

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvana Petrofeza da Silva – Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Goiás

### **Suplentes:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Ferreira Noronha – Instituto de Ciências Biológicas / Universidade de Brasília

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosália Santos Amorim Jesuíno - Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Goiás

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, em especial a minha mãe e meu pai, por todo suporte, conselhos, amor e carinho recebidos, mesmo que por distância, por me darem a educação necessária para conseguir tomar minhas decisões e estar aqui hoje. Agradeço também a Lorena por todo o companheirismo, por ter me agüentado durante esta etapa final, o que, com certeza, não foi fácil e por tudo que ela significa para mim.

Agradeço muito ao Prof. Cirano pela oportunidade dada, pela grande contribuição em minha formação e pela paciência, calma e confiança depositada mesmo nas adversidades. Espero corresponder à altura ajudando nos projetos que vem pela frente. Agradeço também ao Roberto e a Val pela ajuda, dicas e assuntos aleatórios.

Agradeço muito ao Dr. Carlos Bloch Jr., Dr. Luciano Paulino da Silva, Guilherme, Flávio, Éder e a todas as pessoas do Laboratório de Espectrometria de Massas do CENARGEN/EMBRAPA por toda a ajuda, disponibilidade que eu encontrei quando precisei. Sem a ajuda deles, esse trabalho não seria defendido em um futuro próximo. Agradeço também a ajuda da Ana Flávia, Renata e da Prof. Célia do Laboratório de Biologia Molecular da UFG pela ajuda em um dos experimentos.

Agradeço ao Andrei pela amizade, confiança, piadas e disposição para ajudar sempre quando precisei, e ao Saulo pela ajuda e dicas na hora de escrever, além da diversão. Agradeço a todos os colegas do Laboratório: Amanda “Mestrado”, Amanda “Raphaella”, Fabyano, Patrícia, Rachel, Rogério,

Vanessa, etc., pela ajuda, conversas e bom humor para agüentar minhas piadas. Agradeço também aos meus grandes amigos Fernando, Pará, Wyllian, Kobra, Toka, Markin..., amigas, Ray, Maíra, Claryana... pelas horas de diversão, risadas e companheirismo.

A todos aqui citados e a muitos não citados, por terem contribuído de alguma forma para a minha formação, como pessoa e/ou profissional, meu MUITÍSSIMO OBRIGADO.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. OBJETIVOS GERAIS.....	24
2.1. Objetivos específicos.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. Manutenção dos isolados.....	25
3.2. Avaliação da capacidade antagonista de <i>Trichoderma harzianum</i> ALL42.....	25
3.3. Produção da parede celular de <i>Fusarium solani</i> .....	25
3.4. Induções em meio líquido.....	26
3.5. Dosagem de proteínas totais.....	27
3.6. Ensaio enzimáticos.....	27
3.6.1. $\beta$ -1,3-glicanase.....	27
3.6.2. Fosfatase ácida.....	28
3.6.3. N-acetil-B-D-glicosaminidase.....	28
3.6.4. $\beta$ -glicosidase.....	29
3.6.5. Exoglicanase.....	29
3.6.6. Endoglicanase.....	30
3.6.7. Lipase.....	30
3.6.8. Xilanase.....	31
3.6.9. Quitinase.....	31

3.6.10. Protease.....	32
3.6.11. Glicoamilase.....	32
3.6.12. $\alpha$ -mannosidase. ....	32
3.6.13. $\alpha$ -arabinofuranosidase.....	33
3.7. Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE).....	33
3.8. Coloração com nitrato de prata.....	34
3.9. Preparo das amostras para construção dos mapas proteômicos.....	35
3.10. Isoeletrofocalização (IEF).....	35
3.11. Equilíbrio das tiras de gradiente de pH imobilizado (IPG).....	36
3.12. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	36
3.13. Coloração dos géis bidimensionais.....	37
3.14. Análise dos mapas Proteômicos.....	37
3.15. Preparo das amostras para análise por espectrometria de massas...	38
3.16. Espectrometria de massas, análise dos espectros e identificação das proteínas.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5. CONCLUSÕES.....	69
6. PERSPECTIVAS.....	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA DURANTE O MESTRADO.....	96

## RESUMO

*Trichoderma harzianum* é um fungo saprofítico, conhecido devido ao seu grande potencial como agente de controle biológico de diferentes fitopatógenos. Sua ação é baseada em diferentes mecanismos como a produção de antibióticos voláteis e não-voláteis, competição por espaço e nutrientes, produção de enzimas hidrolíticas e o micoparasitismo. *Fusarium solani* causa a podridão radicular seca no feijoeiro, resultando em perdas significativas. Este trabalho buscou analisar e identificar as proteínas secretadas por *T. harzianum* quando crescido na presença de parede celular de *F. solani*, em uma tentativa de obter novas informações sobre o biocontrole. Nos testes de pareamento, *T. harzianum* provou ser um potente antagonista de *F. solani*. Foi observada uma variação tanto no perfil de proteínas secretadas quanto no pH final, quando *T. harzianum* foi crescido em meio TLE contendo glicose e em meio TLE e Mínimo (M.M.) contendo parede celular do fitopatógeno. No total, 33 proteínas de 18 genes diferentes foram identificadas neste trabalho. A proteína Sm1 foi identificada e secretada em todas as condições de crescimento. Várias enzimas hidrolíticas relacionadas ao micoparasitismo, como endoquitinases,  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,6-glicanases, proteases e  $\alpha$ -1,3-glicanases, foram identificadas e dentre as proteases, uma hipotética metalocarboxipeptidase e uma serina *subtilisin-like* nunca descritas em *T. harzianum*. Foram identificadas, também, enzimas que não possuem função conhecida no micoparasitismo, como a  $\beta$ -1,3-glicanosiltransferase, presente somente no sobrenadante do crescimento realizado em MM.

**Palavras-chave:** *Trichoderma harzianum*, *Fusarium solani*, micoparasitismo, secretoma.



## ABSTRACT

*Trichoderma harzianum* is a saprophytic fungus, known for its potential as a biological control agent of different phytopathogens that causes losses in crops. Its action is based on different mechanisms like volatile and non-volatile antibiotics production, competition for nutrient and space, production of hydrolytic enzymes and mycoparasitism. *Fusarium solani* is the agent of bean dry root rot, and is responsible for significant losses. This work sought to analyze and identify secreted proteins from *T. harzianum* grown in the presence of *F. solani* cell wall, in an attempt to obtain new insights on biocontrol. In the dual culture test, *T. harzianum* proved to be a potent antagonist of *F. solani*. Some differences in the secreted proteins profile and final medium pH were observed when *T. harzianum* was grown in TLE medium containing glucose and in TLE and Minimum medium containing the cell wall of the phytopathogen. 33 proteins from 18 different genes were identified. The protein Sm1 was identified and secreted in all growth conditions. Many hydrolytic enzymes related to mycoparasitism, like endochitinases,  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,6-glucanases, proteases and  $\alpha$ -1,3-glycanases, were identified and among the proteases, a hypothetical metalcarboxipeptidase and a serine subtilisin-like never described for *T. harzianum*. Some enzymes with unknown roles in the mycoparasitism, such as  $\beta$ -1,3-glucanotransferase, secreted only in MM growth medium supernatant, were also identified.

**Keywords:** *Trichoderma harzianum*, *Fusarium solani*, mycoparasitism, secretome.

## 1. INTRODUÇÃO

O grão do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é um dos produtos agrícolas de maior importância sócio-econômica no Brasil. Sua importância decorre da área efetivamente cultivada, volume e valor de produção, geração de mão-de-obra, e como uma das principais fontes de proteína, além de possuir bom conteúdo de carboidratos, vitaminas, minerais, fibras e compostos fenólicos com ação antioxidante que podem reduzir a incidência de doenças. A maioria das cultivares de feijão apresenta em torno de 25% de proteína, que é rica no aminoácido essencial lisina, mas pobre nos aminoácidos sulfurados. Essa deficiência, contudo, é suprida pelo consumo dessa leguminosa com alguns cereais, especialmente o arroz, o que torna a tradicional dieta brasileira, o arroz com feijão, complementar, no que se refere aos aminoácidos essenciais (BROUGHTON et al. 2003; OLIVEIRA et al., 2005; ABREU et al., 2005).

O feijoeiro comum é cultivado, de acordo com o IBGE (2008), em todo o território nacional, porém seis estados se destacam em sua produção: Paraná, Minas Gerais, Bahia, São Paulo, Goiás e Santa Catarina, sendo os responsáveis por cerca de 70% do produto comercializado. A produção nacional de feijão em 2007, considerando as três safras, foi de aproximadamente 3.242.290 toneladas, com produtividade média de 847 kg ha<sup>-1</sup>, valor 4,6% inferior ao consumo anual do produto, correspondendo, desta forma, a um déficit de produção. Alguns dos fatores levantados como críticos para este déficit de produção são o uso de sementes de má qualidade e a suscetibilidade desta cultura a doenças, que além de afetarem sua produtividade, reduzem o valor comercial do produto.

Grande parte da perda em lavouras no Brasil e no mundo atribui-se aos fungos fitopatogênicos “de solo”, sendo que anualmente milhões de dólares são gastos no seu controle (OARD et al, 2004). Nas lavouras brasileiras, infecções causadas por fitopatógenos como *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* causam perdas de até 100% na produção de culturas suscetíveis, principalmente de feijão e batata, cultivadas nos Cerrados (HALL & NASSER, 1996; CAFÉ FILHO & LOBO Jr., 2000), e são amplamente reconhecidas como um dos maiores desafios para a agricultura brasileira (LOBO Jr., 2002). A distribuição desses e de outros fungos fitopatógenos foi dispersa durante os últimos anos devido a mudanças introduzidas na agricultura com efeitos prejudiciais a culturas de importância econômica (LOBO Jr., 2002). Estes fungos são parasitas não-especializados, geralmente polívoros, que utilizam matéria orgânica como substrato e que apresentam uma alta capacidade de colonizar resíduos vegetais no solo, bem como de infectar diferentes tipos de culturas (POLETTTO et al., 2006).

O gênero *Fusarium* (Ascomycota, Hypocreales) possui uma distribuição global e muitas espécies são de fungos fitopatógenos que infectam uma grande variedade de culturas, incluindo cereais, como milho, trigo, aveia e cevada. A contaminação por fungos desse gênero é um grande problema agrícola devido a problemas no rendimento e qualidade do produto final e pelo fato de muitas espécies do gênero produzirem micotoxinas responsáveis por doenças em humanos e animais da agropecuária (NICOLAISEN et al., 2009).

*Fusarium solani* é uma espécie complexa que possui isolados que causam doenças em importantes culturas como a podridão das raízes e frutos

de abóbora, podridão da haste de ervilha, síndrome da morte súbita em soja e podridão radicular seca do feijoeiro (ZACCARDELLI et al., 2008). A podridão radicular seca é considerada uma das doenças mais destrutivas do feijoeiro, entre as ocasionadas por patógenos habitantes do solo.

No Brasil, a doença ocorre em várias regiões produtoras de feijão e causa danos principalmente nas áreas irrigadas do Sudeste e Centro-Oeste, onde o plantio da cultura é intensivo (TEIXEIRA et al., 2009). A doença predomina em solos compactados e com excesso de umidade e é mais severa em temperaturas em torno de 22°C a 28°C (ABAWI, 1994; PAULA JUNIOR & ZAMBOLIM, 2006). Períodos de seca agravam os sintomas, em decorrência da menor eficiência no aproveitamento de água e nutrientes pelas plantas atacadas, o que, conseqüentemente, causa redução no rendimento da cultura. Outros fungos fitopatogênicos, principalmente *Pythium* spp. e *Rhizoctonia* spp., e nematóides, podem infectar simultaneamente as raízes do feijoeiro, contribuindo para aumentar a intensidade dos sintomas (TEIXEIRA et al., 2009).

Segundo REIS et al. (2004), as podridões radiculares, em geral, são consideradas doenças de controle mais difícil e, considerando-se os danos que causam, têm recebido pouca atenção por parte de pesquisadores. Métodos drásticos de controle, como a esterilização do solo, têm o uso limitado a pequenas áreas. Porém, em áreas extensivas, a melhor medida de controle ecologicamente sustentável é a rotação de culturas. No entanto, para fungos com habilidade de competição saprofítica, ou que formam estruturas de resistência, mesmo a rotação de culturas não é economicamente viável.

A principal estratégia de controle destes patógenos, mundialmente utilizada, ainda é a aplicação de fungicidas químicos. Esta medida de controle apesar de eficiente é um processo oneroso, leva à seleção de patógenos resistentes e ao surgimento de pragas secundárias (PIRES et al., 2003). Além disto, os produtos químicos utilizados são tóxicos e poluentes, e desta forma impactam o meio ambiente e comprometem a saúde dos produtores agrícolas e consumidores (PUNJA & UTKHEDE, 2003). Outra desvantagem no uso de fungicidas químicos está relacionada à sua inespecificidade, podendo eliminar microrganismos já estabelecidos no solo e benéficos às plantas aumentando assim, sua suscetibilidade aos patógenos de solo (PIRES et al., 2003).

Nos últimos anos, a crescente preocupação da população com o meio ambiente e saúde, bem como pela necessidade de desenvolvimento de métodos de controle mais eficientes, surgiu à demanda por novas estratégias neste controle (FRIGHETTO, 2000). O controle biológico, que se baseia no uso de microrganismos antagonistas, é uma das novas alternativas no combate a estes fitopatógenos. De acordo com EILENBERG (2006), o controle biológico é o 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. Dos microrganismos utilizados como antagonistas para o controle de fitopatógenos, 90% correspondem a diferentes isolados de *Trichoderma* spp. (BENÍTEZ et al., 2004).

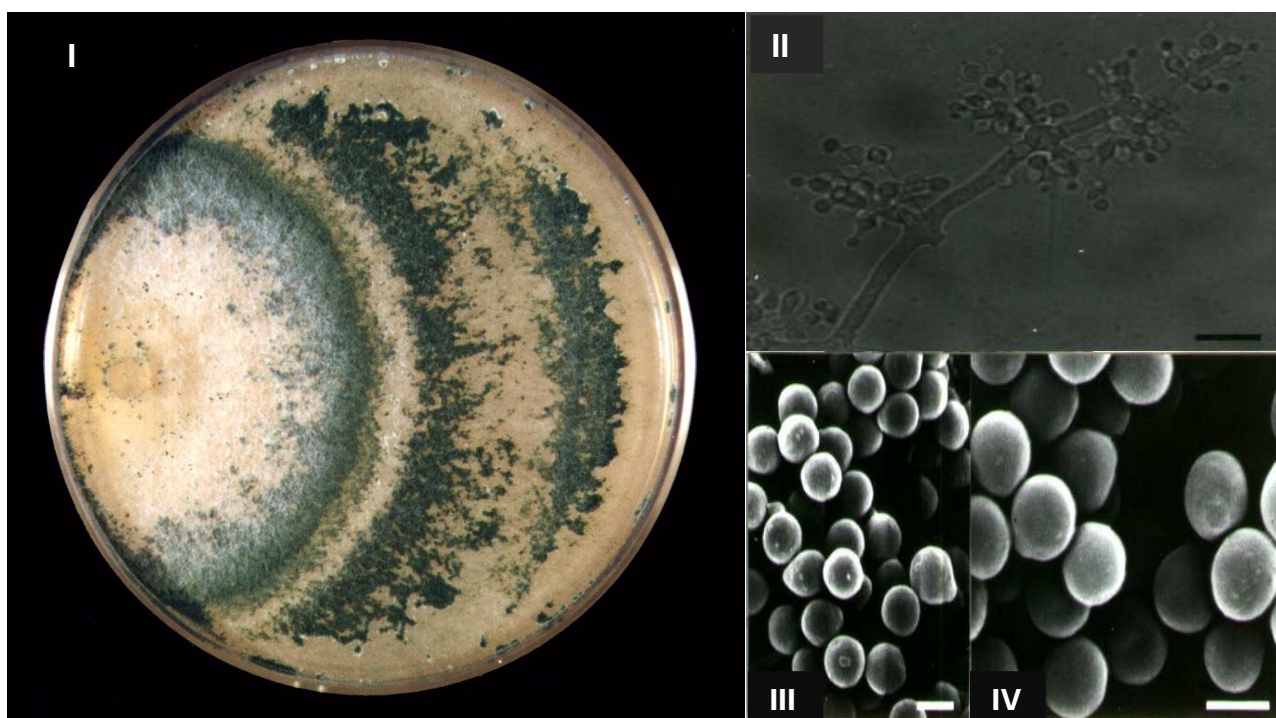
Este gênero foi introduzido por PERSON (1794) a mais de 200 anos atrás e compreende um grupo de fungos filamentosos anamorfos (reprodução assexuada), heterocarióticos, saprófitas de solo, encontrados na rizosfera de

algumas plantas. As espécies que possuem reprodução sexuada (fase teleomórfica) fazem parte do gênero *Hypocrea* e são geralmente encontrados em troncos de árvores e plantas herbáceas (HARMAN et al., 2004). Isolados de *Trichoderma* spp. podem ser reconhecidos, normalmente, através de características macroscópicas as quais incluem crescimento rápido em cultura, rede micelial aérea hialina, septada, bastante ramificada e esparsa, e produção de pústulas conidiógenas diferenciais (brancas ou verdes) (Figura 1A). Os conídios, que são produzidos abundantemente, podem ser soltos ou muito compactados em tufos (CORABI-ADELL, 2004).

Como características microscópicas o conidióforo apresenta-se bastante ramificado, normalmente de uma forma regular dendrítica, ou seja, ramificam-se em vários níveis, onde as divisões primárias originam secundárias menores, as quais, por sua vez, também podem se ramificar e assim por diante (Figura 1B). A ramificação primária é longa, subdividida sucessivamente em vários níveis, apical e distalmente, progressivamente menores e com ramificações e fiálides divergentes em todos os níveis. As fiálides variam de ampuliformes a lageniformes, normalmente com constrição na base, mais ou menos espessadas no meio, e abruptamente atenuadas próximo ao ápice, num curto segmento subcilíndrico. Elas se encontram dispostas em verticilos terminais sobre as ramificações do conidióforo ou, menos freqüentemente, de forma singular ou em verticilos originando-se diretamente abaixo do septo ao longo do conidióforo e suas ramificações (Figura 1 B) (RIFAI 1969; BISSET, 1991).

O potencial das espécies do gênero *Trichoderma* (Ascomycetes, Hypocreales) como agentes de controle biológico foi reconhecido primeiramente por WEINDLING (1932), que descreveu a ação micoparasítica

de *Trichoderma lignorum* em *Rhizoctonia* spp. e seus efeitos benéficos no controle da patologia na planta. Essa descoberta estimulou várias pesquisas nessa área e hoje algumas espécies, como *Trichoderma harzianum*, vêm sendo utilizadas com sucesso no controle biológico de fungos fitopatógenos de interesse na agricultura (WOO et al., 2006).



**Figura 1. A. Características macroscópicas do isolado identificado como *T. harzianum*.** I. Isolado ALL42 apresentando pústulas conidiógenas verde. **B. Características microscópicas do isolado ALL42.** II. Ramificação do conidióforo mostrando fiálides bastante ampuliformes. Barra – 10  $\mu\text{m}$ ; III. Conídios a elevada magnificação (MEV) mostrando a superfície lisa e porção basal truncada. Barra – 1  $\mu\text{m}$ ; IV. Idem a figura III, porém com maior aumento. Barra – 1  $\mu\text{m}$ . Fonte: LIMA, 2002.

Os mecanismos gerais do biocontrole das espécies de *Trichoderma* podem ser divididos em efeitos diretos e indiretos. Efeitos diretos incluem competição por nutrientes ou espaço, produção de antibióticos voláteis e não

voláteis e enzimas líticas, inativação de enzimas de patógenos e parasitismo. Os efeitos indiretos incluem todos os aspectos que produzem mudanças morfológicas e bioquímicas na planta hospedeira tais como tolerância ao stress, solubilização ou seqüestro de nutrientes inorgânicos e indução de resistência a doenças causadas por fitopatógenos (VITERBO et al., 2002). Apesar dessa divisão, os diferentes mecanismos podem ocorrer concomitantemente e com ação sinérgica.

A falta de nutrientes e competição por espaços é uma das causas mais comuns de morte em microrganismos. Espécies de *Trichoderma* possuem uma capacidade superior de sobreviver em condições extremamente desfavoráveis e de mobilizar e captar nutrientes do solo quando comparado com outros microrganismos. O uso eficiente de nutrientes disponíveis é baseado na habilidade de *Trichoderma* obter ATP através da metabolização de diferentes açúcares como aqueles derivados de polímeros disseminados em ambientes fúngicos como celulose, glicanas e quitinas (CHET et al., 1997).

A resistência de espécies *Trichoderma* a vários metabólitos secundários e fungicidas é de suma importância para que o fungo consiga colonizar raízes de plantas, visto que as mesmas produzem uma grande quantidade de flavonóides, compostos fenólicos e outros compostos antimicrobianos (BENÍTEZ et al., 2004). Ao colonizar as raízes, algumas cepas de *Trichoderma* promovem mudanças na rizosfera para impedir a colonização por patógenos, crescimento das raízes e estimulam a expressão de genes de defesa em plantas através da produção de moléculas elicitoras (HARMAN et al., 2004; VINALE et al., 2004).

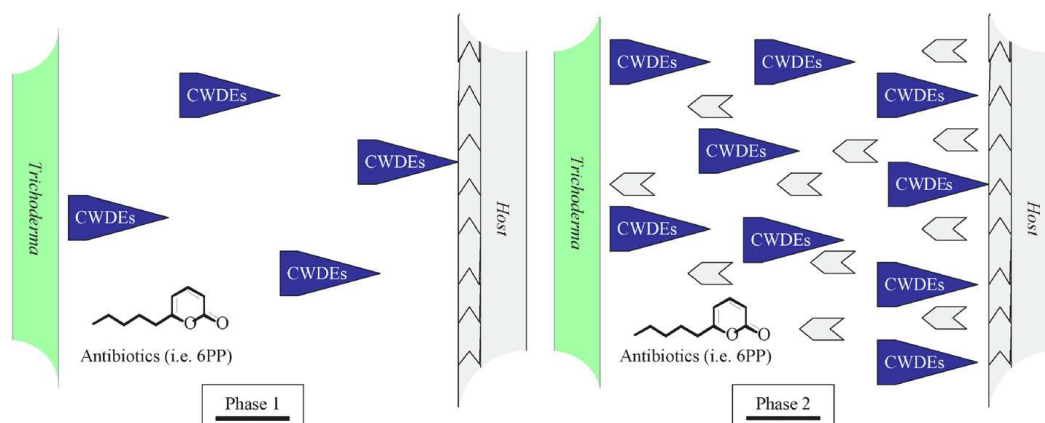


A indução de defesa e resistência em plantas hospedeiras já foi descrita para as espécies *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma virens*, *T. harzianum*, *Trichoderma asperellum* e *Hypocrea atroviridis* em associação com tomateiro, pepino, algodoeiro e milho (HANSON & HOWELL, 2004). A associação *Trichoderma*/planta hospedeira leva a mudanças bioquímicas e estruturais, como, a deposição aumentada de parede celular (calose) no sítio de infecção, bem como, o aumento da atividade/expressão de enzimas nas plantas (ex. peroxidases e quitinases) e outras proteínas relacionadas à patogênese (YEDIDIA et al.,1999). Além disto, é observado nesta interação um aumento na produção de compostos terpenóides relacionados à defesa da planta, e de produção de giberelinas e auxinas promovendo o seu crescimento (WOO et al., 2006).

Dentre os mecanismos de controle, o micoparasitismo é o evento mais característico das espécies de *Trichoderma*. Essa habilidade de parasitar outros fungos é um processo complexo que envolve cinco estágios seqüenciais: (a) produção de metabólitos voláteis e crescimento quimiotrópico na direção do hospedeiro; (b) reconhecimento específico (c) enrolamento e fixação de *Trichoderma* em torno da hifa hospedeira; (d) secreção de enzimas líticas e metabólitos secundários que degradam a parede celular do hospedeiro; (e) assimilação do conteúdo citosólico do hospedeiro (CHET et al., 1998; BENÍTEZ et al.,2004).

Durante o crescimento em direção a hifa hospedeira, *Trichoderma* secreta antibióticos voláteis e enzimas degradadoras da parede celular (EDPCs) que hidrolisam a parede celular do fungo hospedeiro liberando oligômeros (Figura 2), ativando a expressão de genes envolvidos no micoparasitismo (VINALE et

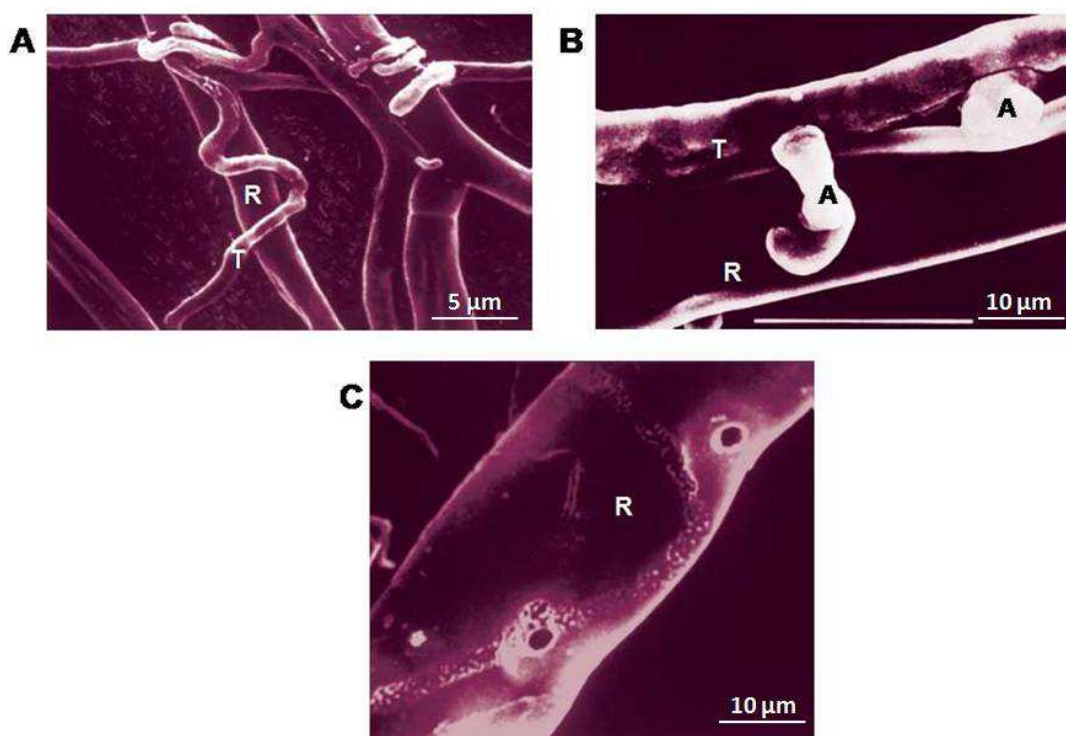
al., 2008). Uma vez estabelecido o contato, espécies de *Trichoderma* interagem com a hifa hospedeira através da ligação de carboidratos de sua parede celular as lectinas presentes na hifa hospedeira, enrolando-se ao longo dessa com o lançamento de estruturas em apressórios na superfície da hifa (ELAD et al., 1983a). Essas estruturas contêm altas concentrações de solutos osmóticos, como o glicerol, e servem para a penetração na hifa do hospedeiro. Estabelecido o contato, ocorre a produção de mais enzimas hidrolíticas que facilitam tanto a entrada da hifa de *Trichoderma* no lúmen do fungo parasitado quanto na assimilação do conteúdo da parede celular (Figura 3) (BENÍTEZ et al., 2004).



**Figura 2. Evento de pré-contato na interação de *Trichoderma*-Fungo hospedeiro. Fase 1.** Produção de compostos de alta massa molecular pelo micoparasita que atinge o hospedeiro. **Fase 2.** Geração de produtos de baixa massa molecular que são liberados da parede celular do hospedeiro e que ativam a cascata de expressão de genes. Fonte: VINALE et al. (2007).

As enzimas envolvidas no processo de micoparasitismo são liberadas de acordo com a composição da parede celular dos fitopatógenos. Em geral, a parede celular desses fungos é composta por quitina, como um esqueleto estrutural disposto em camadas regulares ordenadas e  $\beta$ -1,3-glicanas (que podem possuir ramificações  $\beta$ -1,6) como material de preenchimento disposto

de uma maneira amórfica (ALMEIDA et al., 2007). Proteínas também estão presentes na parede celular, principalmente associadas com hetero ou homopolissacarídeos (FONTAINE et al., 2000). Devido a essa composição, a lise da parede celular de fitopatógenos é feita principalmente por  $\beta$ -1,3-glicanases, quitinases e proteases.



**Figura 3. Micoparasitismo de *Trichoderma* spp. em *Rhizoctonia solani*.** **A.** Cepa de *Trichoderma* está no processo de micoparasitismo da hifa de *R. solani*. **B.** Estruturas em apressórios de *Trichoderma* ligadas a hifa de *R. solani*. **C.** Hifa de *R. solani* após a retirada de *Trichoderma* spp., evidenciando os buracos na parede celular pela ação das EDPCs. T - *Trichoderma* spp.; R - *R. solani*; A - Estruturas do tipo apressórios (ELAD et al., 1983b; ELAD et al., 1987).

As enzimas do sistema quitinolítico são divididas em: (a) endoquitinase (EC 3.2.1.14) cliva a quitina, polímero linear insolúvel formado por unidades de  $\beta$ -1,4-N-acetilglicosamina, e quitolímeros randomicamente e libera uma mistura de produtos solúveis de baixo peso molecular de diferentes tamanhos

com diacetilquitobiose como o primeiro produto a ser formado; (b) quitina 1,4-quitobiosidase ou exoquitinase (EC 3.2.1.14) cliva a quitina e quitoligomeros progressivamente da terminação não redutora e libera somente diacetilquitobiose como produto final; e (c) N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (EC 3.2.1.52) cliva o polímero de quitina e quitoligomeros progressivamente da terminação não redutora e libera somente N-acetilglicosamina como produto final e é a única enzima capaz de hidrolisar diacetilquitobiose (LORITO et al., 1998). Várias quitinases de *Trichoderma* spp. foram isoladas e caracterizadas. Em alguns casos, os genes foram clonados e sua expressão estudada durante o micoparasitismo (Tabela 1).

**Tabela 1. Enzimas do sistema quitinolítico purificadas de diferentes isolados de *Trichoderma* spp., crescidos em presença de quitina.**

Enzima	Massa Molecular (Kda)	Atividade	Referência
CHIT 102	102-118	N-acetilglicosaminidase	ULHOA & PEBERDY (1991)
CHIT 73*	73	N-acetilglicosaminidase	LORITO et al. (1994)
CHIT 40	40	Exoquitinase	HARMAN et al. (1993)
CHIT 52	52	Endoquitinase	HARAN et al. (1995)
CHIT 42*	40-42	Endoquitinase	DE LA CRUZ et al. (1993), ULHOA & PEBERDY (1992), HARMAN et al. (1993)
CHIT 36*	36	Endoquitinase	VITERBO et al. (2001)
CHIT 33*	33-37	Endoquitinase	DE LA CRUZ et al. (1993), HARAN et al. (1995)
CHIT 31	31-33	Endoquitinase	DE LA CRUZ et al. (1993), HARAN et al. (1995)
CHIT 46	46	Endoquitinase	LIMA et al. (1997)

\* genes clonados

FONTE: SILVA, 2003.

As  $\beta$ -1,3-glicanases hidrolisam a cadeia  $\beta$ -1,3-glicana, polímero constituído de resíduos de D-glicose ligados em uma configuração  $\beta$ -1,3, por

um de dois mecanismos possíveis: (a) exo- $\beta$ -1,3-glicanase hidrolisa as  $\beta$ -glicanas pela clivagem seqüencial de resíduos de glicose das extremidades não-redutoras, liberando glicose como produto; e (b) endo- $\beta$ -1,3-glicanases hidrolisam a cadeia de  $\beta$ -glicanas em sítios aleatórios liberando pequenos oligossacarídeos.

Muitas  $\beta$ -1,3-glicanases foram isoladas e caracterizadas em *Trichoderma* spp. (Tabela 2), e alguns genes clonados, como *bgn13.1*, e *lam1.3* de *Trichoderma harzianum*, *glu78* de *T. atroviride*, *lamA1*, que codifica uma endo- $\beta$ -1,3(6)-glicanase, e *Tv-bgn2* de *T.virens*. Regiões conservadas de exo- $\beta$ -1,3-glicanases também foram utilizadas para construção de sondas para pesquisa em uma biblioteca genômica de *T. virens* resultando no isolamento de dois supostos genes (*Tv-bgn1* e *Tv-bgn2*) que codificam endo- $\beta$ -1,3-glicanases (BENÍTEZ et al., 2004; MARTIN et al., 2007).

**Tabela 2. Resumo das  $\beta$ -1,3-glicanases purificadas de *Trichoderma* spp.**

Designação	Massa Molecular (kDA)	Tipos de $\beta$ -1,3-glicanase	Referências
GLIC 29	29	Exo-1,3- $\beta$	NORONHA & ULHOA (2000a)
GLIC 31	31	Exo-1,3- $\beta$	KITAMOTO et al. (1987)
GLIC 40	40	Exo-1,3- $\beta$	DUBOURDIEU et al. (1985)
GLIC 110	110	Exo-1,3- $\beta$	COHEN-KUPIEC et al. (1999)
GLIC 36	36	Endo-1,3- $\beta$	NORONHA & ULHOA (2000b)
GLIC 78	78	Endo -1,3- $\beta$	DE LA CRUZ et al. (1995)
GLIC 76	76	Endo -1,3- $\beta$	LORITO et al. (1994)
GLIC 75	75	Exo-1,3- $\beta$	MONTEIRO& ULHOA (2006)
GLIC 19	19	Endo-1,3- $\beta$	SILVA (2005)

Fonte: MONTEIRO (2008)

As proteases são divididas, segundo o Comitê de Nomenclatura Enzimática (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB; [www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/](http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/)), em seis famílias, de acordo com o seu mecanismo de catálise e ainda podem ser classificadas de acordo com seu modo de ação em: (a) endopeptidases: (EC 3.4.21-99) clivam ligações no interior da cadeia polipeptídica; e (b) carboxipeptidases (EC 3.4.11-18): atuam na extremidade da cadeia polipeptídica (Tabela 3) (MONTEIRO, 2008).

Proteases podem participar na degradação de proteínas celulares estruturais desestabilizando a integridade celular do fitopatógeno e facilitando a penetração e colonização por *Trichoderma*. Elas também estão envolvidas na inativação de enzimas produzidas por patógenos durante o processo de infecção de plantas (SUÁREZ et al., 2007). Apesar de sua importância para o micoparasitismo, o número de estudos de caracterização, isolamento e/ou clonagem de proteases é menor ao de trabalhos relacionados às quitinases e  $\beta$ -1,3-glicanases. Mesmo assim os genes de algumas serina endopeptidases (*p8048*, *ss10*) (SUÁREZ et al., 2007; LIU & YANG, 2009) e proteases aspárticas (*papA*, *p6281*) (DELGADO-JARANA et al, 2002; SUÁREZ et al., 2005) de *T. harzianum*, foram clonados e caracterizados.

**Tabela 3. Classificação de peptidases de acordo com o sítio catalítico e modo de ação.**

Peptidases	EC subclasses
<b>CARBOXIPEPTIDASES</b>	
Serina-carboxipeptidase	3.4.16
Metalo-carboxipeptidase	3.4.17
Cisteína-carboxipeptidase	3.4.18

---

**ENDOPEPTIDASES**

Serina-endopeptidase	3.4.21
Cisteína-endopeptidase	3.4.22
Aspártico-endopeptidase	3.4.23
Metal-endopeptidase	3.4.24
Treonina-endopeptidase	3.4.25
Endopeptidase com mecanismo catalítico desconhecido	3.4.99

---

Fonte: MONTEIRO (2008)

O papel de cada enzima do complexo enzimático de espécies de *Trichoderma* possui modo de ação diferenciado. Enzimas com diferentes ou modos de ação complementar parecem ser requeridas para o máximo efeito antifúngico em diferentes patógenos (VITERBO et al., 2002). Nesse evento também pode haver a liberação de peptídeos com atividade de antibióticos. A ação sinérgica entre enzimas hidrolíticas e metabólitos secundários confere ao micoparasita um nível de antagonismo maior do que quando estes dois mecanismos agem de forma separada (BENÍTEZ et al., 2004).

Em *Trichoderma harzianum*, a ação sinérgica de *peptaibols*, quitinases e  $\beta$ -1,3-glicanases foi capaz de inibir a germinação de esporos e alongação da hifa de *Botrytis cinerea* (SCHIRMBÖCK et al., 1994). A produção de metabólitos secundários de *Trichoderma* spp. é isolado dependente e incluem substâncias antifúngicas pertencentes a uma variedade de classes de componentes químicos (VINALE et al., 2007). Antraquinonas, pironas, viridinas, butenolídeos, dicetopiperazinas, derivados do ergosterol e *peptaibols* são alguns dos metabólitos secundários descritos com propriedade antifúngica, liberados por *Trichoderma* spp. (LIU, et al., 2009).

Os estudos das proteínas e dos genes das principais classes das enzimas envolvidas no micoparasitismo, ou mesmo genes de proteínas envolvidas nas vias de sinalização celular, e de metabólitos secundários permitiram conhecer mais claramente esse evento importante para as espécies de biocontrole (MASSART & JIJAKLI, 2007). Análises mais abrangentes como, por exemplo: uso de técnicas de hibridização subtrativa, proteômica e EST's (*expressed sequence tags*) têm sido utilizadas com diferentes espécies de *Trichoderma*, mas quase todas carecem de não haver um genoma completo disponível para uma melhor interpretação dos resultados. Estes estudos, em sua grande maioria, utilizam diferentes condições de crescimento para mostrar o arsenal genético destes fungos ao invés de estudar eventos individuais durante o micoparasitismo (CARPENTER et al., 2005; LIU & YANG, 2005; VIZCAÍNO et al., 2006; VIZCAÍNO et al., 2007; SCHERM et al., 2008).

Em dezembro de 2002 foi construído um consórcio chamado "Functional genomics and proteomics of *Trichoderma* antagonist strains for industry and agriculture (TRICHOEST)" (<http://www.trichoderma.org>). Financiado pela União Européia, este projeto visou entender os mecanismos utilizados pelo fungo *Trichoderma* na área biotecnológica, principalmente no que diz respeito ao seu antagonismo a fitopatógenos, utilizando-se de técnicas de genômica e proteômica.

A proteômica é definida como a análise do proteoma, que é o complemento protéico expresso por um genoma, célula, tecido ou organismo. O proteoma é dinâmico e podem ocorrer modificações pós-traducionais as proteínas de acordo com estímulos internos ou externos, sendo reflexo das condições em que o organismo ou célula se encontram no momento (PANDEY



& MANN, 2000; BHADAURIA et al., 2007). A proteômica fornece informações mais completas relacionadas a vias de sinalização, conjunto de proteínas reguladoras, modificações pós-traducionais e outras informações importantes em estados fisiológicos normais e anormais de células e/ou organismos através de técnicas capazes de identificação de um conjunto de proteínas produzidas por uma célula bem como as interações e interdependência dos processos fisiológicos (ROCHA et. al., 2005). Devido aos avanços nas técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas, acoplado com um aumento de proteínas nos bancos de dados, os papéis de proteínas, incluindo EDPCs, no micoparasitismo, têm sido estudadas através de técnicas proteômicas.

GRYNIER et al. (2004a) realizaram um trabalho com o objetivo de separar o máximo possível de proteínas do micélio de um isolado de *T. harzianum* para a construção de um mapa protéico de referência, visto que este foi o primeiro trabalho de análise proteômica realizado com este fungo. Devido à falta de um genoma publicado de *T. harzianum*, dois espectrômetros de massas (MALDI-TOF e LC-MS/MS) foram utilizados para se obter um maior número de proteínas identificadas. Das 96 bandas retiradas, 25 proteínas codificadas por 22 genes diferentes foram identificadas. Apenas as proteínas gliceraldeído-3-fosfato e fosfoglicerato quinase foram caracterizadas em *T. harzianum* e *T. viride*, respectivamente. As outras proteínas foram identificadas através da técnica de “identificação por cruzamento de espécies” (*cross-species identification*, CSI) (WILKINS & WILLIAMS, 1997), que permitiu a procura de proteínas contra outros microrganismos que possuem genomas completos disponíveis. Essa ferramenta foi útil para identificar proteínas bem conservadas

entre as diferentes espécies, como cadeia  $\beta$  da ATP sintase, várias proteínas do tipo *heat-shock*, fator de iniciação eucariótico 4<sup>a</sup>, actina, uma pequena proteína G e uma possível proteína ligante de citoesqueleto.

No mesmo ano, GRYNIER et al. (2004b) realizaram um trabalho de subproteoma com o objetivo de mapear as proteínas da mitocôndria do isolado de *Trichoderma harzianum* utilizado no trabalho descrito acima. No total 196 bandas foram extraídas dos géis e 31 proteínas foram identificadas, totalizando um aproveitamento de 16%. Foram identificadas proteínas do tipo: *heat-shock*, ATP sintase, fatores de alongação, outras proteínas de mitocôndria e algumas proteínas contaminantes do citosol. Das 31 proteínas, 17 são conhecidamente localizadas na mitocôndria, 8 são localizadas no citosol, 3 são de outras organelas e 5 são de origem desconhecida. Apenas 3 bandas de proteínas deram similaridade com a proteína de *T. harzianum* gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e outras 5 com espécies do gênero *Trichoderma* e *Hypocrea*. Foi possível identificar as outras proteínas através do CSI (WILKINS & WILLIAMS, 1997) já que as proteínas de mitocôndrias são altamente conservadas, contribuindo para a identificação de 25 bandas das quais não havia registros em bancos de dados de proteínas de *Trichoderma*.

Um estudo da resposta proteômica de *Trichoderma atroviride* quando crescido na presença de parede celular de *Rhizoctonia solani* e em glicose foi realizado por GRYNIER et al. (2005). Foi observado que 56 bandas de proteínas estavam mais ou somente expressas no micélio crescido em meio contendo parede celular de *R. solani*. Com o objetivo de investigar proteínas possivelmente relacionadas com o micoparasitismo, essas bandas foram analisadas, e 24 bandas, correspondendo a 8 genes, foram identificados,

sendo eles: N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase, endoquitinase 42 kDa, protease vacuolar A, fator de iniciação eucariótica 4a, proteína hipotética, superóxido dismutase, protease *trypsin-like* e serina protease. Das três proteases identificadas (nunca descritas antes em *T. atroviride*), chama atenção a serina protease, que quando comparada em bancos de dados com proteínas de *Trichoderma*, incluindo uma serina protease (gene *prb1*), não obteve correspondência, sugerindo que a protease identificada neste trabalho é diferente daquela caracterizada de *T. harzianum*.

SUÁREZ et al., 2005 cresceram um isolado de *T. harzianum* em meio contendo parede celular de diferentes fitopatógenos (*Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia solani*) ou quitina, e foram observados 33, 62, 122 e 256 bandas de proteínas, respectivamente. Foram selecionados 4 bandas (s1, s2, s3 e s4), que estavam presentes em todas as condições de crescimento. A banda s1 foi a mais expressa em todas as condições e foi identificada como uma protease aspártica (gene *p6281*) pela similaridade com as seqüências de proteases de vários organismos. Foi observado também que a resposta proteômica de *T. harzianum* varia tanto quantitativamente quanto qualitativamente de acordo com a parede celular utilizada durante o crescimento, sugerindo que *T. harzianum* é hábil para modificar a produção dessas proteínas de acordo com o fungo hospedeiro.

Utilizando uma abordagem proteômica, SEIDL et al. (2006a) cresceu o fungo *Hypocrea atroviridis* (*Trichoderma atroviride*) em meio contendo glicose com o objetivo de identificar as proteínas constitutivas extracelulares. Duas bandas de proteínas predominantes foram identificadas e revelaram ser a mesma proteína (massa molecular de 12,629 kDa e pI 5.5-5.7). O gene

correspondente foi clonado de *H. atroviridis* e denominado *ep1* pela alta similaridade exibida com a família de proteínas cerato-platanina de *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani* e Snodprot1 de *Phaeosphaeria nodorum*, as quais foram relatadas como envolvidas na patogênese da planta e eliciação da resposta de defesa das plantas. Concluiu-se, também, baseado na similaridade do N-terminal das duas, que *ep1* é ortóloga a uma proteína elicitora de 18 kDa de *T. virens*

TSENG et al. (2008) estudou as proteínas secretadas por *Trichoderma harzianum* ETS323 em resposta a *Rhizoctonia solani*, avaliando as diferenças das proteínas secretadas por ele quando crescido em meios contendo diferentes fontes de carbono (glicose, glicose + micélio de *R. solani* desativado e micélio de *R. solani*). Foram selecionadas 43 bandas, das quais 35 exibiram sinais de LC-MS/MS. No total, 8 proteínas foram identificadas [glicosil hidrolase 37 kDa, glicosil hidrolase 118 kDa, possível l-aminoácido oxidase (*T. harzianum*), possível protease aspártica (*T. harzianum*),  $\beta$ -glicosidase 92 kDa, endoquitinase 42 kDa (*Trichoderma* sp.),  $\beta$ -glicosidase 94 kDa, serina protease alcalina]. YANG et al. (2009) também avaliou o secretoma de *T. harzianum* quando crescido na presença de parede celular de *Botrytis cinerea*. Atividades enzimáticas evidenciaram a secreção de algumas proteínas que degradam parede celular como quitinases,  $\beta$ -1,3(6)-glicanases, proteases. Dos géis obtidos, 100 bandas foram retiradas, 91 exibiram sinais de LC-MS/MS e 3 proteínas foram identificadas (l-aminoácido oxidase, endoquitinase, enqoduitinase), sendo todas elas de espécies de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. hamatum* e *T. harzianum*, respectivamente).

Em outro trabalho, *T. harzianum* ALL42 foi crescido em meios contendo diferentes paredes de fitopatógenos (*Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium* sp. MONTEIRO et al. (2010) visualizaram que a resposta micoparasítica de *T. harzianum* ALL42 é fitopatógeno dependente, havendo variações tanto no enrolamento da hifa quanto nas proteínas secretadas. Foram identificadas 7 proteínas de 6 genes diferentes ( $\alpha$ -manosidase, fosfatase ácida,  $\alpha$ -1,3-glicanase, carboxypeptidase 2, glicosidase I e endoquitinase 42 kDa) das 63 bandas de proteínas retiradas dos géis.

O grupo do Laboratório de Enzimologia (ICB/UFG) tem concentrado esforços para a elucidação do mecanismo de micoparasitismo e controle biológico de fungos do gênero *Trichoderma*. Os trabalhos foram concentrados nas enzimas hidrolíticas  $\beta$ -1,3-glicanases (NORONHA et al., 2000a; NORONHA et al., 2000b, MONTEIRO & ULHOA, 2006; MARCELLO et al., 2010), N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidases (SILVA et al., 2004) e quitinases (ULHOA & PEBERDY, 1991; ULHOA & PEBERDY, 1992). Em 2002, LIMA isolou e classificou 46 isolados de *Trichoderma* provenientes do bioma Cerrado e os caracterizou com base em aspectos morfológicos e moleculares. Das espécies isoladas, a mais representativa era de *T. harzianum* com 34 isolados, seguido por *T. asperellum* (4 isolados), *T. koningii* (3 isolados) e *T. spirale* (2 isolados). Também foi avaliado o potencial antagônico dos isolados de *T. harzianum* pelo teste de pareamento de culturas contra o fitopatógeno *Rhizoctonia solani* e a produção de enzimas hidrolíticas. Dos isolados testados, *T. harzianum* ALL42 se destacou como um bom produtor de enzimas hidrolíticas e bom micoparasita.

Recentemente, o grupo vem utilizando técnicas mais abrangentes como proteômica (MONTEIRO et al., 2010) e EST's (STEINDORFF et al. 2010) para se obter uma resposta mais completa da resposta de *T. harzianum* ALL42 em condições que simulam o micoparasitismo. Devido às grandes perdas causadas por *Fusarium solani* no feijoeiro comum e em outras culturas, e ao fato dos métodos de controle mais utilizados não aliam eficiência no combate ao fitopatógeno com baixo risco a natureza e a saúde humana, o estudo da resposta proteômica de *T. harzianum* quando crescido na presença de parede celular de *F. solani* é interessante para a geração de informações mais abrangentes sobre o biocontrole. Os conhecimentos gerados com este trabalho, agregado com outros, poderão ser utilizados para o desenvolvimento de novos produtos e processos biotecnológicos para o controle dessa e de outras doenças fúngicas em lavouras de feijão brasileiras.

## 2. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivo avaliar e comparar a resposta do isolado *Trichoderma harzianum* ALL42, através do perfil de proteínas secretadas, quando crescido em diferentes meios de cultura na presença da parede celular do fitopatógeno *Fusarium solani* e quando crescido em meio suplementado com glicose.

### 2.1. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial antagônico de *T. harzianum* ALL42 contra *F. solani*;
- Construir mapas proteômicos e analisar as diferenças no perfil de proteínas secretadas entre as condições de crescimento;
- Identificar, por espectrometria de massas, as proteínas diferencialmente secretadas nas diferentes condições de crescimento;
- Avaliar a atividade de enzimas hidrolíticas secretadas durante o crescimento de *T. harzianum* nas diferentes condições de crescimento avaliadas neste estudo.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Manutenção dos isolados**

Os fungos *Trichoderma harzianum* ALL42 e *Fusarium solani* da coleção do Laboratório de Enzimologia (UFG/ICB), foram mantidos com repiques periódicos em meio MYG [0,5% (p/v) de extrato de malte, 0,25% (p/v) de extrato de levedura, 1% (p/v) de glicose e 2% (p/v) de ágar] e estocados a 4°C.

#### **3.2. Avaliação da capacidade antagonista de *Trichoderma harzianum* ALL42**

O teste de pareamento de cultura *in vitro* foi realizado com a adição de discos de cultura (20 mm) em placa de Petri (140 mm de diâmetro) contendo meio MYG, à temperatura ambiente, por 10 dias. O ensaio consiste na adição de um disco de cultura de *Trichoderma harzianum* ALL42 em uma das extremidades da placa e um disco da cultura do fitopatógeno *Fusarium solani* na extremidade oposta.

#### **3.3. Produção da parede celular de *Fusarium solani***

Para a produção de parede celular, 10 discos (10 mm) de meio MYG, contendo micélio de *F. solani* foram inoculados em frascos de 1 l contendo 500 ml de meio MYG líquido [0,5% (p/v) de extrato de malte, 0,25% (p/v) de extrato



de levedura, 1% (p/v) de glicose]. Estes frascos foram incubados à temperatura de 28 °C sob agitação constante de 180 rpm em agitador rotatório, por 3 dias. O micélio de cada frasco foi coletado por filtração, autoclavado, congelado a - 20 °C e liofilizado. Ao término da liofilização, os micélios foram macerados utilizando cadinho e pistilo. A cada 1g do pó resultante da maceração, foi adicionado 200 ml de água destilada. Essa solução foi agitada e centrifugada a 12000 g por 15 minutos. Proteínas presentes no sobrenadante foram quantificadas através do método descrito por BRADFORD (1976). A solução foi filtrada e a parede de *F. solani* coletada. Este processo foi repetido até não haver quantidades detectáveis de proteínas no sobrenadante. A parede coletada ao final do processo foi congelada, liofilizada e macerada novamente.

### 3.4. Induções em meio líquido

Esporos ( $1 \times 10^7$  ml<sup>-1</sup>) de *Trichoderma harzianum* ALL42 foram inoculados em frascos de 1l contendo 200 ml de meio TLE [Bactopetona 1,0 g l<sup>-1</sup>, Uréia 0,3 g l<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0 g l<sup>-1</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,4 g l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,3 g l<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,2 g l<sup>-1</sup>, 2% (v/v) de solução de elementos traços, pH 5,0] com 2% (p/v) de glicose ou 0,5% (p/v) de parede celular de *F. solani* e em frascos contendo 200 ml de Meio Mínimo [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0 g l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,3 g l<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,2 g l<sup>-1</sup>, 2% (v/v) de solução de elementos traços, pH 5,0] com 0,5% (p/v) de parede celular de *F. solani*. Os frascos foram incubados em agitador rotatório à 28 °C e velocidade de 180 rpm. Após 48 horas de crescimento, os sobrenadantes foram filtrados, centrifugados e congelados a - 20 °C e utilizados para dosagens de proteínas totais, atividades enzimáticas e construção dos mapas

proteômicos. Frascos contendo os meios descritos acima suplementados com 0,5% (p/v) de parede celular de *F. solani*, sem a presença de *T. harzianum*, foram incubados sob as mesmas condições. O sobrenadante deste material foi utilizado para a dosagem de proteínas totais e SDS-PAGE.

### **3.5. Dosagem de proteínas totais.**

A concentração de proteínas foi determinada pelo método descrito por BRADFORD (1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão. A reação foi conduzida pela adição de 100µl de amostra e 1 ml do reagente de BRADFORD e incubado a temperatura ambiente por 15 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

### **3.6. Ensaio enzimáticos.**

#### **3.6.1. $\beta$ -1,3-glicanase.**

Para determinar a atividade de  $\beta$ -1,3-glicanases, foi utilizado o ensaio descrito por RAMADA et al. (2010). A mistura de 10 µl de amostra com 20 µl de laminarina (Sigma) 0,75% (p/v) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 foi incubada em um termociclador a 50 °C por 10 minutos. Posteriormente, 100 µl do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) foram adicionados e a reação incubada a 95 °C por 5 minutos. A reação foi resfriada por 2 minutos a 25 °C e 100 µl foram transferidos para uma placa de ELISA e a absorbância obtida a 550 nm em um leitor de microplacas. Uma unidade específica (U/mg) de  $\beta$ -1,3-

glicanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto ( $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ ) por mg de proteínas do sobrenadante.

### **3.6.2. Fosfatase ácida.**

Para determinação da atividade de fosfatase ácida, 100  $\mu\text{l}$  de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,8 foram incubados com 40  $\mu\text{l}$  de *p*-nitrofenil-fosfato 5 mM (*p*NP-fosfato) e 10  $\mu\text{l}$  de amostra à 37 °C por 15 minutos em um termociclador. A reação foi parada com a adição de 100  $\mu\text{l}$  de NaOH 0,1 M, 100  $\mu\text{l}$  foram transferidos para uma placa de ELISA e a absorbância obtida à 405 nm em um leitor de microplacas. Uma unidade específica (U/mg) de fosfatase ácida foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol por minuto por mg de proteínas do sobredanante.

### **3.6.3. N-acetil-B-D-glicosaminidase.**

Para determinação de da atividade de N-acetil-glicosaminidase, 100  $\mu\text{l}$  de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5 foram incubados com 40  $\mu\text{l}$  de *p*NP-N-acetil- $\beta$ -D-glicosamina 5 mM e 10  $\mu\text{l}$  de amostra à 37 °C por 15 minutos em um termociclador. A reação foi parada com a adição de 100  $\mu\text{l}$  de NaOH 0,1 M, 100  $\mu\text{l}$  foram transferidos para uma placa de ELISA e a absorbância obtida à 405 nm em um leitor de microplacas. Uma unidade específica (U/mg) de N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase foi definida como a quantidade de enzima

necessária para a produção de 1  $\mu\text{mol}$  de  $p$ -nitrofenol por minuto por mg de proteínas do sobredanante.

#### **3.6.4. $\beta$ -glicosidase.**

Para determinação da atividade de  $\beta$ -glicosidase, 100  $\mu\text{l}$  de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5 foram incubados com 40  $\mu\text{l}$  de  $p\text{NP-}\beta\text{-D}$ -glicosamina 5 mM e 10  $\mu\text{l}$  de amostra à 37  $^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos em um termociclador. A reação foi parada com a adição de 100  $\mu\text{l}$  de NaOH 0,1 M, 100  $\mu\text{l}$  foram transferidos para uma placa de ELISA e a absorvância obtida à 405 nm em um leitor de microplacas. Uma unidade específica (U/mg) de  $\beta$ -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1  $\mu\text{mol}$  de  $p$ -nitrofenol por minuto por mg de proteínas do sobredanante.

#### **3.6.5. Exoglicanase.**

Para determinação da atividade de exoglicanases o ensaio descrito por XIAO et al. (2004), com modificações, foi utilizado. Brevemente, 20  $\mu\text{l}$  de amostra foram incubados com 40  $\mu\text{l}$  de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,8 e 1 disco de papel de filtro Whatman nº1 de 7 mm de diâmetro à 50  $^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos em um termociclador. Foram adicionados 120  $\mu\text{l}$  de ADNS e a reação foi incubada à 95  $^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos e resfriada a 25  $^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos. Foram transferidos 100  $\mu\text{l}$  para uma placa de ELISA e a absorvância obtida a 550 nm em um leitor de microplacas. Uma unidade específica (U/mg) de exoglicanase

foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto por mg de proteínas do sobredanante.

### **3.6.6. Endoglicanase.**

Para a determinação da atividade de endoglicanases o ensaio descrito por XIAO et al. (2005), com modificações, foi utilizado. Brevemente, 30  $\mu\text{l}$  de amostra foram misturadas com 60  $\mu\text{l}$  de CMC 1% (p/v) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,8 e incubado por à 50  $^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos em um termociclador. Foram adicionados 60  $\mu\text{l}$  de ADNS e a reação incubada à 95  $^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos e resfriada à 25  $^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos. Foram transferidos 100  $\mu\text{l}$  da reação para uma placa de ELISA e a absorbância determinada a 550 nm em um leitor de microplacas. Uma unidade específica (U/mg) de endoglicanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto por mg de proteínas do sobredanante.

### **3.6.7. Lipase.**

Para a determinação da atividade de lipases, 100  $\mu\text{l}$  de pNP-palmitato 5 mM foram incubados com 700  $\mu\text{l}$  de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e 100  $\mu\text{l}$  de amostra à 37  $^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos em banho-maria. A reação foi parada com a adição de 100  $\mu\text{l}$  de NaOH 0,1 M e a absorbância determinada à 405 nm em espectrofotômetro. Uma unidade específica (U/mg) de lipase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1  $\mu\text{mol}$  de p-nitrofenol por minuto por mg de proteínas do sobredanante.

### **3.6.8. Xilanase.**

Para avaliar a atividade de xilanase, 50 µl de amostra foram incubados com 50 µl de xilana 1% (p/v) em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 à 50 °C por 30 minutos em um termociclador. Foram adicionados 100 µl de ADNS e a reação foi incubada à 95 °C por 5 minutos. Em seguida a amostra foi resfriada a 25 °C por 2 minutos, 100 µl foram transferidos para uma placa de ELISA e a absorbância obtida a 550 nm em um leitor de microplacas. Uma unidade específica (U/mg) de exoglicanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1 µmol de açúcar redutor por minuto por mg de proteínas do sobredanante.

### **3.6.9. Quitinase.**

Para determinação da atividade de quitinases, 100 µl de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5 foram incubados com 40 µl de pNP-N'N'-diacetilchitobiosídeo 2,5 mM e 10 µl de amostra à 37 °C por 15 minutos em um termociclador. A reação foi parada com a adição de 100 µl de NaOH 0,1 M e foram transferidos 100 µl para uma placa de ELISA e a absorbância medida à 405 nm em um leitor de microplacas. Uma unidade específica (U/mg) de quitinase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1 µmol de p-nitrofenol por minuto por mg de proteínas do sobredanante.

### **3.6.10. Protease.**

Para determinação de proteases, foi utilizado o ensaio descrito por CABRAL et al. (2004), no qual 20 µl de amostra foram incubados com 40 µl de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0 e 40 µl de azocaseína 0,25% (p/v) à 37 °C por 30 minutos em um termociclador. Foi adicionado 100 µl de ácido tricloroacético 10% (p/v) a reação e a mesma foi incubada a 4 °C por 10 minutos. A reação foi centrifugada a 10000 g por 15 minutos e 100 µl foram transferidos para uma placa de ELISA seguida pela adição de 100 µl de NaOH 1 M. A absorbância foi determinada à 450 nm em um leitor de microplacas. A absorbância obtida foi considerada a atividade enzimática.

### **3.6.11. Glicoamilase.**

Para determinação de glicoamilase, 60 µl de amostra foram incubados com 40 µl de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5 e 100 µl de amido 0,5% à 50 °C por 15 minutos em banho-maria. A determinação de açúcares redutores da amostra foi realizado de acordo com MILLER (1959). Uma unidade específica (U/mg) de glicoamilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1 µmol de açúcar redutor por minuto por mg de proteínas do sobredanante.

### **3.6.12. α-mannosidase.**

Para determinação da atividade de α-mannosidase, 100 µl de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5 foram incubados com 40 µl pNP-α-D-

manopiranosídeo 5 mM e 10 µl de amostra à 50 °C por 15 minutos em um termociclador. A reação foi parada com a adição de 100 µl de NaOH 0,1 M, 100 µl foram transferidos para uma placa de ELISA e a absorbância medida à 405 nm em um leitor de microplacas. Uma unidade específica (U/mg) de α-manosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1 µmol de p-nitrofenol por minuto por mg de proteínas do sobredanante.

### **3.6.13. α-L-arabinofuranosidase.**

Para determinação da atividade de α-arabinofuranosidase, 100 µl de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,8 foram incubados com 40 µl pNP-α-L-arabinopiranosídeo 5 mM e 10 µl de amostra à 37 °C por 15 minutos em um termociclador. A reação foi parada com a adição de 100 µl de NaOH 0,1 M, 100 µl foram transferidos para uma placa de ELISA e a absorbância medida à 405 nm em um leitor de microplacas. Uma unidade específica (U/mg) de α-arabinofuranosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1 µmol de p-nitrofenol por minuto por mg de proteínas do sobredanante.

### **3.7. Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE).**

Para análise do perfil de proteínas secretadas das induções, foi utilizado o sistema de eletroforese MiniGel (Sigma) em gel de poliacrilamida 12% (p/v) em condições desnaturantes conforme descrito por LAEMMLI (1970). 15 µg de



proteína de cada amostra foram precipitadas com a utilização do Kit 2-D Clean-up (GE Healthcare) e ressuspendidas em tampão de amostra 1X [50 µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 6,8, 1,0 µl β-mercaptoetanol, 100 µl de SDS 10% (p/v), 100 µl de glicerol, traços de azul de bromofenol e água destilada suficiente para 1,0 ml], fervidas por 5 minutos e aplicadas no gel. A corrida foi feita utilizando-se uma voltagem inicial de 80 V, posteriormente aumentada para 100 V. O marcador molecular SM0431 (Fermentas) foi utilizado para a determinação da massa molecular das proteínas.

### **3.8. Coloração com nitrato de prata.**

Após a corrida das amostras, o gel foi corado para visualização das proteínas, através do método descrito por BLUM et al. (1987). O gel foi transferido para solução fixadora [metanol 50% (v/v), ácido acético glacial 12% (v/v) e formaldeído 0,1% (v/v)] sendo agitação lenta e constantemente por 60 minutos. Em seguida, o gel foi lavado três vezes com solução de etanol 50% (v/v) por 20 minutos cada. Após as lavagens, o gel foi tratado, por 1 minuto, com solução de tiosulfato de sódio 0,2 g l<sup>-1</sup> com leve agitação manual, lavando-se logo após com água destilada 3 vezes por 20 segundos cada. O gel foi incubado por 20 minutos com solução de nitrato de prata (2 g l<sup>-1</sup>) contendo formaldeído (0,75 ml l<sup>-1</sup>). Posteriormente, foi lavado novamente com água destilada por duas vezes (dois minutos cada lavagem) e a revelação foi realizada com solução de carbonato de sódio 6,0% (p/v) contendo 2 ml de tiosulfato de sódio 0,2 g l<sup>-1</sup> e 50 µl de formaldeído. Após a visualização das bandas, a solução reveladora foi descartada e a solução de parada [metanol

50% (v/v) e ácido acético 12% (v/v)] foi adicionada. O gel foi mantido em temperatura ambiente até o momento de fotografar.

### **3.9. Preparo das amostras para construção dos mapas proteômicos.**

Os sobrenadantes das diferentes condições de crescimento concentrados por ultrafiltração em uma membrana de 10 kDa (Millipore) e o volume necessário para se obter 600 µg de proteínas de cada amostra foi liofilizado. As amostras liofilizadas foram ressuspensas em 120 µl de água destilada e as proteínas precipitadas com a utilização do Kit 2-D Clean-up.

### **3.10. Isoeletrofocalização (IEF).**

A isoeletrofocalização das proteínas foi realizada no equipamento IPGphor III (GE Healthcare). A IEF foi conduzida em tiras IPG de 13 cm, pH 4 – 7 linear. Previamente à isoeletrofocalização, as amostras foram ressuspensas em 250 µl de solução de reidratação (DeStreak Rehydration Solution, GE Healthcare) e aplicadas em um suporte. As tiras IPG foram posicionadas sobre a amostra e ficaram por 14 horas, no IPGBox (GE Healthcare), para a reidratação das mesmas. A isoeletrofocalização foi iniciada logo após o período de reidratação e ocorreu em quatro etapas: passo linear de 500 V por 1 h, gradiente linear até 1000 V por 1 h, gradiente linear até 8000 V por 4 h, e um passo linear de 8000 V por 6 h, totalizando 67250 Vh acumulados. Após a IEF as tiras foram acondicionadas em tubos plásticos e armazenadas em congelador - 80 °C para posterior utilização.

### **3.11. Equilíbrio das tiras de Gradiente de pH imobilizado (IPG).**

Após a isoeletrofocalização, 10 ml de tampão de equilíbrio [Tampão Tris-HCl pH 8,8 50 mmol l<sup>-1</sup>, Uréia 6 mol l<sup>-1</sup>, glicerol 30% (v/v), SDS 30% (p/v) e traços de azul de bromofenol] contendo 0,1 g de dithiothreitol foram adicionados as tiras de IPG, que ficaram sob agitação por 20 minutos. Em seguida, a solução foi descartada e 10 ml de tampão de equilíbrio contendo 0,25 g de iodoacetamida foram adicionados as tiras IPG, que foram mantidas sob agitação por 20 minutos. Após esse período, a solução foi descartada.

### **3.12. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).**

A eletroforese das proteínas presentes nas tiras IPG foi realizada em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), utilizando a metodologia descrita por LAEMMLI (1970). O gel de separação na concentração de 12,5% (p/v) de poliacrilamida foi preparado um dia antes da corrida. A eletroforese foi realizada em géis de 25,5 cm x 20,5 cm x 0,15 cm em uma cuba ETTAN DALT SIX (GE Healthcare). As tiras IPG equilibradas foram posicionadas horizontalmente no topo do gel, mantendo pleno contato com este. As tiras foram cobertas com uma solução de agarose morna {agarose 0,5% (p/v), tampão de corrida 1X [Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 % (p/v)] e traços de azul de bromofenol}. Após a solidificação da agarose, a segunda dimensão foi realizada utilizando dois passos: corrente de 10 mA/gel por 1 h e corrente de 40 mA/gel até azul de bromofenol atingir o limite inferior do gel. A temperatura do sistema foi mantida em 15 °C por meio do sistema de

circulação termostática MultiTemp III (GE Healthcare). Foi utilizado o marcador molecular Amersham Low Molecular Weight Kit for SDS Eletrophoresis (GE Healthcare) para a determinação da massa molecular das proteínas.

### **3.13. Coloração dos géis bidimensionais.**

Pastilhas PhastGel™ Blue R (GE Healthcare) foram diluídas em 200 ml de uma solução de metanol 60% (v/v). A solução foi filtrada e foram adicionados 200 ml de ácido acético 20% (v/v). Os géis bidimensionais ficaram em agitação durante 14 horas na solução de coloração. Após esse período, a solução foi retirada e os géis foram descorados, sob agitação, em solução de ácido acético 10% (v/v).

### **3.14. Análise dos mapas Proteômicos.**

Os géis obtidos foram digitalizados através do equipamento ImageScanner III (GE Healthcare) e a análise dos géis 2D foram realizadas através do software ImageMaster™ 2D Platinum v7.0 (GE Healthcare). Das réplicas de cada condição, o gel com menos imperfeições foi selecionado como mapa de referência. Para comparar as réplicas, foi utilizada a ferramenta landmark para o ajuste das diferenças de migração das bandas de proteínas. Foi gerado um fator de correlação entre as réplicas evidenciando a reprodutibilidade do experimento. Os mapas de referência entre as condições também foram analisados e as bandas de proteínas diferencialmente

secretadas (ANOVA -  $p < 0,05$ ) foram retiradas para análise por espectrometria de massas.

### **3.15. Preparo das amostras para análise por espectrometria de massas.**

Para análise por espectrometria de massas, 77 bandas foram retiradas dos géis bidimensionais. Estas bandas foram tratadas segundo SHEVCHENKO et al. (1996; 2007) com modificações. As bandas retiradas dos géis foram colocadas em tubos de 0,5 ml. Em seguida, 200  $\mu$ l de uma solução de bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 em acetonitrila 50% (v/v) foram adicionados as bandas, agitados em vórtex por 20 minutos e o sobrenadante descartado. Esta etapa foi repetida até os pedaços de géis ficarem totalmente transparentes. Após o descarte, 100  $\mu$ l de acetonitrila foram adicionados às amostras e agitados em vórtex por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram completamente secas em uma Speed-Vaccum.

Aproximadamente 40  $\mu$ l de uma solução 10 mM de DTT em bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 foram adicionados as amostras e as mesmas foram incubadas à 56 °C por 60 minutos. Após descartar o sobrenadante, 40  $\mu$ l de Iodoacetamida 55 mM em bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 foram adicionados as amostras e elas foram incubadas a temperatura ambiente ao abrigo da luz. O sobrenadante foi retirado e 100  $\mu$ l de tampão bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 foram adicionados a cada amostra e agitado em vórtex por 10 minutos. Após retirar o sobrenadante, 100  $\mu$ l de bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 em acetonitrila 50% (v/v) foram adicionados e as amostras

agitadas por 10 minutos em vórtex. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram completamente secas em uma Speed-Vaccum.

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

As amostras foram ressuspendidas em 20  $\mu$ l de água miliQ e 3  $\mu$ l foram transferidos para tubos novos de 0,5 ml contendo 9  $\mu$ l de matriz [5 mg de ácido  $\alpha$ -4-ciano-hidroxicinamico em 500  $\mu$ l de TFA 0,3% (v/v)/ acetonitrila 50% (v/v)]. Dessa mistura, 0,7  $\mu$ l de cada amostra foram aplicadas em poços diferentes, em triplicata, de uma placa de MALDI MTP 384 ground steel (Bruker Daltonics). Para a calibração do equipamento, foi utilizada a mistura de calibrantes 4700 Proteomics Analyzer Calibration Mixture (Applied Biosystems).

### **3.16. Espectrometria de massas, análise dos espectros e identificação das proteínas.**

As amostras foram analisadas em um espectrômetro de massas Ultraflex III MALDI TOF/TOF (Bruker Daltonics) no Laboratório de Espectrometria de

Massas do CENARGEN/EMBRAPA. O aparelho estava configurado em modo positivo, refletor em V e extração retardada. Os espectros de MS foram obtidos automaticamente, após configuração de parâmetros no programa FlexControl (Bruker Daltonics). No total, 69 das 78 amostras apresentaram sinais de MS. Desse total, 46 amostras foram analisadas novamente para obtenção de espectros de MS/MS. Um total de 142 espectros de MS/MS foi gerado. Os peptídeos foram seqüenciados manualmente através dos programas FlexAnalysis (Bruker Daltonics) e PepSeq (MicroMass Co.). As seqüências obtidas foram submetidas à comparação com o banco de dados de proteínas do NCBI, através do algoritmo blastp, para identificar as proteínas produzidas por *T. harzianum* ALL42 nas diferentes condições de crescimento.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O emprego de microrganismos antagônicos no controle das doenças de importância agrícola representa uma estratégia relevante para assegurar boas condições sanitárias com menores danos ao meio ambiente e à saúde pública (MELO, 1998). A capacidade antagônica de *Trichoderma harzianum* em placa já foi relatada contra vários fungos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium sp.* (MONTEIRO et al., 2010), *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* (VITERBO et al., 2001) e *Bipolaris oryzae* (ABDEL-FATAH et al., 2007).

O antagonismo de *T. harzianum* ALL42 foi avaliado através do teste de pareamento de culturas em placa de Petri. O crescimento de *Fusarium solani* foi mais lento na presença de *T. harzianum* ALL42 do que na ausência dele (controle). Após sete dias, as hifas de *T. harzianum* ALL42 entraram em contato com as de *F. solani*. Ao final dos dez dias de teste, foi observada a presença de esporos de *T. harzianum* nas hifas do hospedeiro (Figura 4).

Para avaliar a influência dos metabólitos voláteis no crescimento de *F. solani*, foi adicionado na parte inferior de uma placa de Petri, um disco com micélio do fitopatógeno, e um disco com micélio do antagonista na parte superior da placa, não havendo contato entre as hifas. Após três dias, o diâmetro das colônias de *F. solani* foram medidas e comparadas com o diâmetro das colônias controle (ausência de *T. harzianum* ALL42) (Figura 5A e 5B). A diferença de crescimento foi analisada através de um teste  $t_{\alpha=0,05}$  de duas amostras independentes e mostrou ser significativa ( $p = 0,01151$ ) (Figura



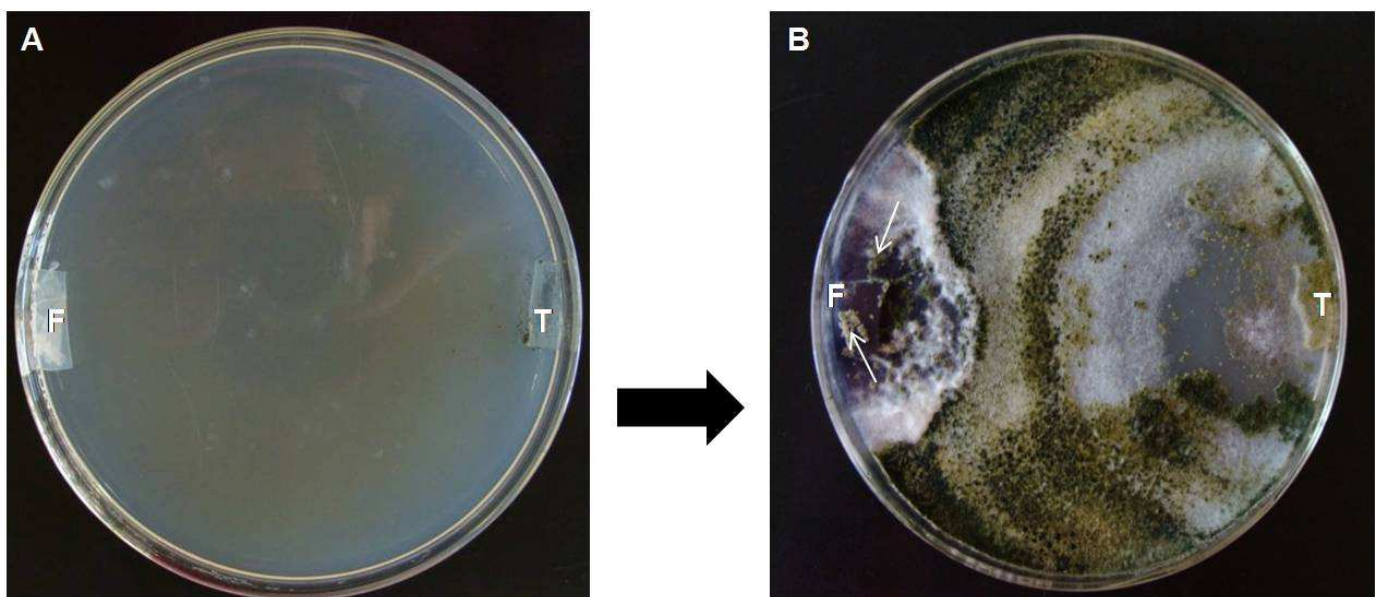
5C). MONTEIRO et al. (2010) realizaram testes de pareamento dos fitopatógenos *R. solani*, *M. phaseolina* e *Fusarium* sp. com *T. harzianum* e observaram que *Fusarium* sp. foi o fitopatógeno que sofreu maior inibição em seu crescimento, antes do contato ser estabelecido. PAEZ & ALBARRACIN (2007) também relataram o efeito inibitório de *T. koningii* sobre *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* por antibiose, sem haver contato entre as hifas.

Outra observação feita por MONTEIRO et al. (2010) é que, durante a interação micoparasítica de *T. harzianum* ALL42 com *Fusarium* sp., não houve enrolamento nas hifas do hospedeiro, apenas um contato, diferentemente do que foi observado da interação de *T. harzianum* ALL42 com *R. solani* e *M. phaseolina*, na qual houve. O mecanismo de reconhecimento e enrolamento ainda não é totalmente conhecido, mas existem indicativos do envolvimento de lectinas e de fatores difusíveis nestes processos (INBAR & CHET, 1992; KULLNIG et al., 2000).

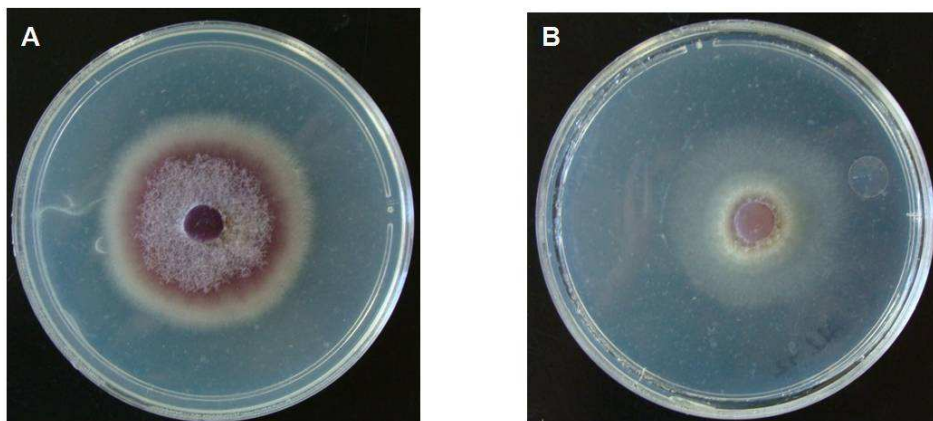
Dados recentes demonstraram que a interação entre um micoparasita e seu hospedeiro é muito mais complexa do que se imagina, pois também envolvem mecanismos, não elucidados, de sinalização celular com participação de proteínas G (REITHNER et al., 2005; ZEILINGER et al., 2005), proteínas quinases (REITHNER et al., 2007) e de moléculas sinalizadoras tais como AMP cíclico (OMERO et al., 1999). Apesar do não enrolamento, *T. harzianum* ALL42 foi capaz de colonizar as hifas de *Fusarium* sp., indicando a ação eficaz de suas enzimas hidrolíticas no processo de micoparasitismo (MONTEIRO et al., 2010).

O teste de pareamento de culturas permite visualizar o potencial de espécies antagônicas, mas não gera informações importantes sobre as

proteínas produzidas, em especial, as enzimas hidrolíticas e metabolitos, envolvidas no ataque. Uma forma de demonstrar a liberação dessas enzimas é a mimetização do micoparasitismo, pelo crescimento de espécies de *Trichoderma* em meio líquido contendo parede de micélio autoclavado ou parede celular de fitopatógenos (PEBERDY, 1990; HARAN et al., 1996). Para esse fim, esporos de *T. harzianum* ALL42 foram crescidos em meio mínimo (MM + Fs) e em meio TLE (TLE + Fs) na presença de parede celular de *F. solani* e em meio TLE com glicose (TLE + GLI) para avaliar o perfil de proteínas secretadas nessas diferentes condições.



**Figura 4. Teste de pareamento de culturas.** A. Início do teste no qual os discos contendo micélio de *Fusarium solani* e *Trichoderma harzianum* ALL42 foram colocados em extremidades opostas da placa contendo meio MYG. B. Após 10 dias, a colônia de *F. solani* foi totalmente invadida pelas hifas de *T. harzianum* ALL42. As setas indicam os esporos de *T. harzianum*, caracterizando a colonização por este. F- *Fusarium solani*; T- *Trichoderma harzianum*.



	Diâmetro da colônia em cm ( $\mu \pm sd$ )	Teste $t_{\alpha=0,05}$ p
<b>Controle</b>	5,2 $\pm$ 0,141	0,01151
<b><i>T. harzianum</i> (ALL-42)</b>	4,15 $\pm$ 0,071	

**Figura 5. Teste de inibição por metabólitos voláteis.** **A.** Colônia de *F. solani* crescendo em meio MYG na ausência do antagonista. **B.** Colônia de *F. solani* crescendo em meio MYG na presença de *T. harzianum* ALL42. Para a captura das imagens (**A** e **B**), a placa superior foi retirada para melhor visualização. **C.** Valores obtidos das triplicatas realizadas. A presença de *T. harzianum* ALL42 influenciou significativamente ( $p = 0,01151$ ) no diâmetro de crescimento da colônia do fitopatígeno, inibindo-a.  $\mu$  – média;  $sd$  – desvio padrão;  $p$  – probabilidade.

Após o crescimento de *T. harzianum* ALL42 nos diferentes meios de cultura, o pH foi aferido e foi observado que houve variações com relação ao pH inicial (5,0), sendo que o meio TLE + GLI apresentava pH de 2,17, TLE + Fs pH 7,09 e MM + Fs pH 6,10. Em outro trabalho realizado, *T. harzianum* ALL 42 foi crescido em meio TLE contendo parede de *R. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* ou *F. oxysporum* e foi observado que ao final do crescimento, o pH dos meios contendo parede de *R. solani* e *S. sclerotiorum* apresentavam pH na faixa de 3,5 - 4,0, respectivamente, e pH 6,5 na presença de parede de *F. oxysporum*. Para conseguir colonizar e controlar patógenos, *T. harzianum* é

capaz de controlar o pH externo de forma que suas enzimas secretadas sejam eficientes no combate a estes (MCINTYRE et al., 2004). Várias proteases, glicanases, proteínas de parede celular e um transportador de glicose são controlados pelo pH, o que sugere uma resposta transcricional pH dependente de diferentes enzimas (BENÍTEZ et al, 2004). Além disso, a habilidade de *T. harzianum* controlar o pH diminui a virulência de fitopatógenos, já que os fatores de patogenicidade destes, são produzidos apenas em uma pequena faixa de pH, e são importantes para o sucesso na colonização de plantas (PRUSKY & YAKOBY, 2003).

A concentração de proteínas do sobrenadante de cada meio de crescimento foi determinada e os resultados são apresentados na Tabela 5. *T. harzianum* ALL42 secretou uma maior quantidade de proteínas no meio TLE + Fs e uma pequena quantidade no meio TLE + GLI, o que era esperado visto que a glicose é um repressor catabólico de várias enzimas hidrolíticas (DONZELLI & HARMAN, 2001; SUÁREZ et al., 2005). Também foram dosadas as proteínas totais dos meios contendo parede celular de *F. solani* na ausência de *T. harzianum* ALL 42 (controle TLE e Controle MM) (Tabela 5). Foi observada a presença de uma pequena quantidade de proteínas nos meios, mesmo após a lavagem da parede para eliminar as proteínas não ligadas. O processo de autoclavagem da parede, em solução, pode causar uma instabilidade na estrutura, fazendo com que algumas proteínas ancoradas a parede sejam liberadas. Esse fato, aparentemente, só ocorre quando em solução, visto que quando a parede foi autoclavada separadamente dos meios, não foi detectada a presença de proteínas.

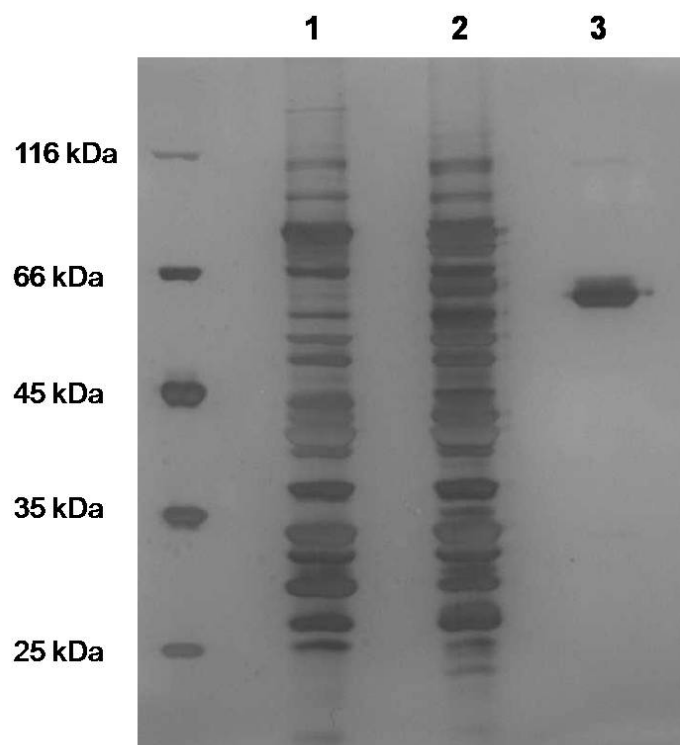
**Tabela 5. Concentração das proteínas totais presentes no sobrenadante das diferentes condições de crescimento e na ausência de *T. harzianum* ALL42.**

<b>Meios de crescimento</b>	<b>Proteínas totais (<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>) <math>\pm</math> sd*</b>
TLE + Fs	90,56 $\pm$ 0,40
MM + Fs	60,37 $\pm$ 0,67
TLE + GLI	2,86 $\pm$ 0,13
Controle (TLE)	2,57 $\pm$ 0,14
Controle (MM)	2,28 $\pm$ 0,08

\*sd – desvio padrão

Após a quantificação das proteínas, foi coletado volume suficiente para 15  $\mu\text{g}$  de proteínas, de cada sobrenadante, e estes foram precipitados com o Kit 2-D Clean-up (GE Healthcare). Uma eletroforese foi conduzida a fim de separar as proteínas presentes em cada amostra (Figura 6). Apesar de ter sido detectado a presença de proteínas, mesmo que pequena, no sobrenadante dos controles, elas não foram visualizadas no gel, sugerindo que as proteínas, ou seus fragmentos, eram menores do que 25 kDa. O perfil protéico do sobrenadante do meio TLE + GLI apresentou poucas proteínas, concentradas em uma área correspondente a 63 kDa, enquanto os sobrenadantes dos meios TLE + Fs e MM + Fs foram parecidos. Essa diferença no perfil entre os meios suplementados com parede celular e com glicose evidencia a diferença na secreção protéica de *T. harzianum* dependendo de sua condição de crescimento.

Para melhor visualizar o perfil de proteínas secretadas por *T. harzianum* ALL42 nas diferentes condições de crescimento foram construídos mapas proteômicos, que compreendem a separação das proteínas por eletroforese em géis bidimensionais de poliacrilamida, separando as proteínas inicialmente pelos pontos isoelétricos em um gradiente de pH e posteriormente pelas massas moleculares. Essa técnica vem demonstrando ser um poderoso método para identificação de proteínas em misturas complexas (MEDINA et al., 2004). Para isso, alíquotas contendo 600 µg de proteínas das diferentes condições de crescimento foram precipitadas com o Kit 2-D Clean-up e separadas em géis bidimensionais em tiras IPG linear pH 4-7. Essas tiras foram escolhidas de acordo com a faixa de pH na qual a maioria das proteínas secretadas por *T. harzianum* se encontram (GRYNIER et al., 2005; SUÁREZ et al., 2005).



**Figura 6. Eletroforese (SDS-PAGE) das proteínas secretadas por *T. harzianum* ALL42 nas diferentes condições de crescimento. 1 – TLE + Fs; 2 – MM + Fs; 3 – TLE + GLI.**

Os géis bidimensionais foram digitalizados e analisados através do programa ImageMaster™ 2D Platinum v7.0. Os géis que tiveram melhor resolução, menos imperfeições, e quando comparados com as réplicas, geraram um maior coeficiente de correlação, foram considerados os mapas de referência para análises (Figuras 7, 8 e 9). A tabela 6 contém os dados referentes às comparações entre as réplicas. Após a detecção das bandas, uma análise foi feita para eliminar os pontos marcados no gel que não eram bandas de proteínas (falso positivo). O número de bandas presente nos mapas dos sobrenadantes do crescimento suplementado com parede celular (TLE + Fs e MM + Fs) foi maior do que no suplementado com glicose (TLE + GLI), como observado no SDS-PAGE (Figura 6). Para comparar as réplicas das condições, dois “landmarks” (marcadores) foram criados para ajustar as diferenças entre a disposição das bandas nos géis. Após essa etapa, foi observado um alto coeficiente de correlação e de bandas igualmente presentes nas réplicas, indicando uma boa reprodutibilidade no experimento.

Ao compararmos os mapas das condições TLE + FS e TLE + GLI, e MM + FS e TLE + GLI, foram consideradas similares, por detecção automática do programa, oito e seis bandas de proteínas, respectivamente, mas apenas uma banda (7) era realmente a mesma proteína, como comprovado por espectrometria de massas. Ao comparar os mapas TLE + Fs e MM + Fs foram encontradas 102 bandas similares (Figura 10), valor não condizente com a realidade. Apesar dos avanços nas técnicas de eletroforese bidimensional, e a constante melhoria nos programas de análise, a comparação entre diferentes condições continua sendo um problema devido à marcação errônea de

algumas bandas de proteínas, julgadas como semelhantes pelo programa, e a não marcação de algumas que correspondem à mesma proteína.

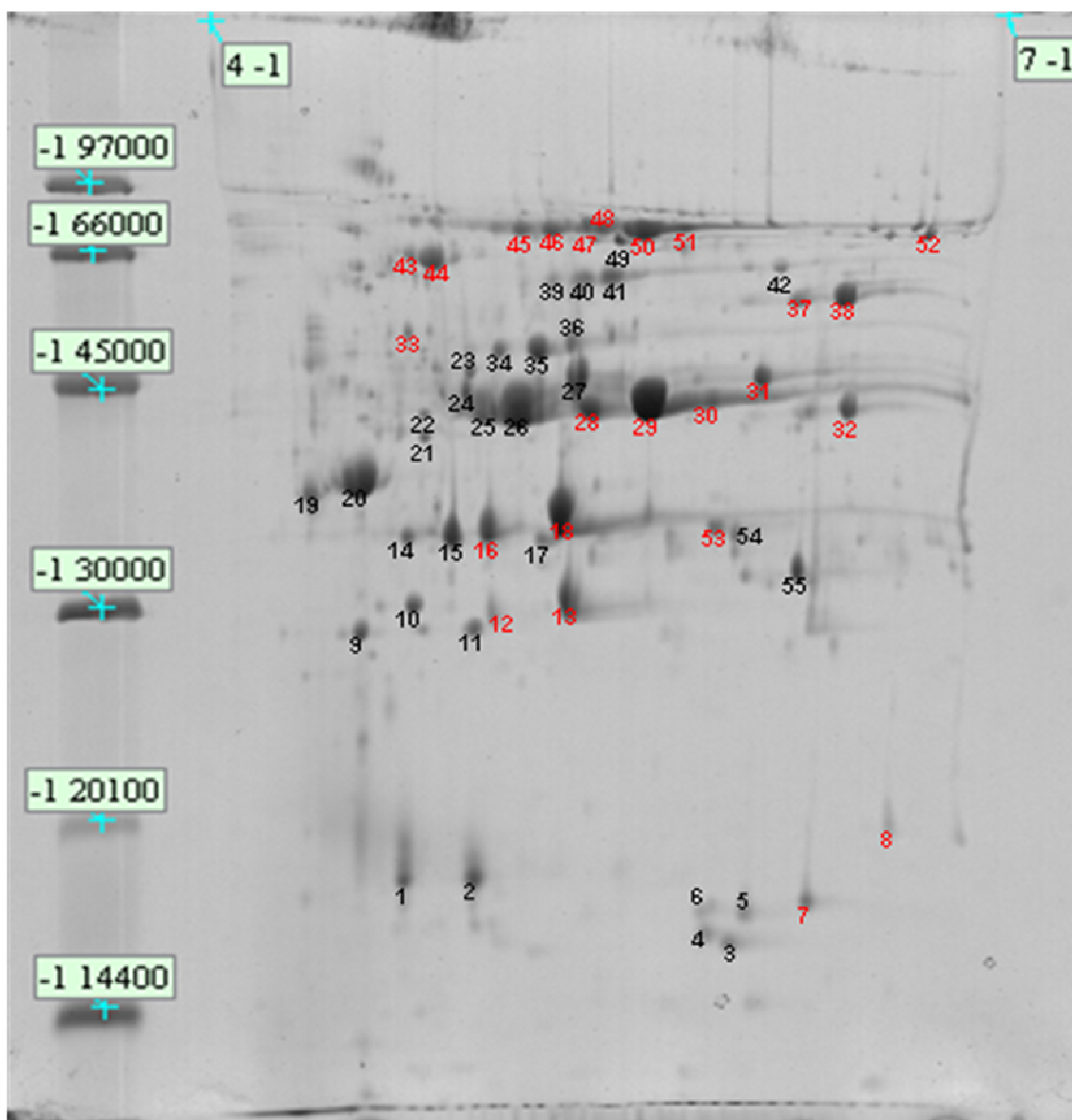
Uma forma de solucionar este problema veio com o advento da técnica de eletroforese 2-D fluorescente em gel diferencial (DIGE), baseada na marcação covalente de proteínas antes da eletroforese com corantes fluoróforos denominados CyDyes DIGE apresentando os tipos Cy5, Cy3 e Cy2 (UNLU et al., 1997). Na técnica de 2-D DIGE, pode-se resolver proteínas de amostras diferentes, marcada com fluoróforos diferente, em uma mesma eletroforese bidimensional. A marcação com esses fluoróforos não modifica o pI das proteínas e aumenta em 450 Da à massa molecular das mesmas. A análise diferencial dos níveis de expressão é feita na diferença da intensidade da fluorescência entre Cy3 e Cy5. Cy2 é utilizado normalmente como padrão interno de marcação (TSOLAKOS et al., 2009; HEINEMEYER et al., 2009). Apesar de ser uma técnica mais sensível, refinada e vantajosa, o custo dos equipamentos e reagentes ainda é muito alto, dificultando a sua aquisição.

**Tabela 6. Comparação entre as réplicas dos géis bidimensionais de cada condição de crescimento.**

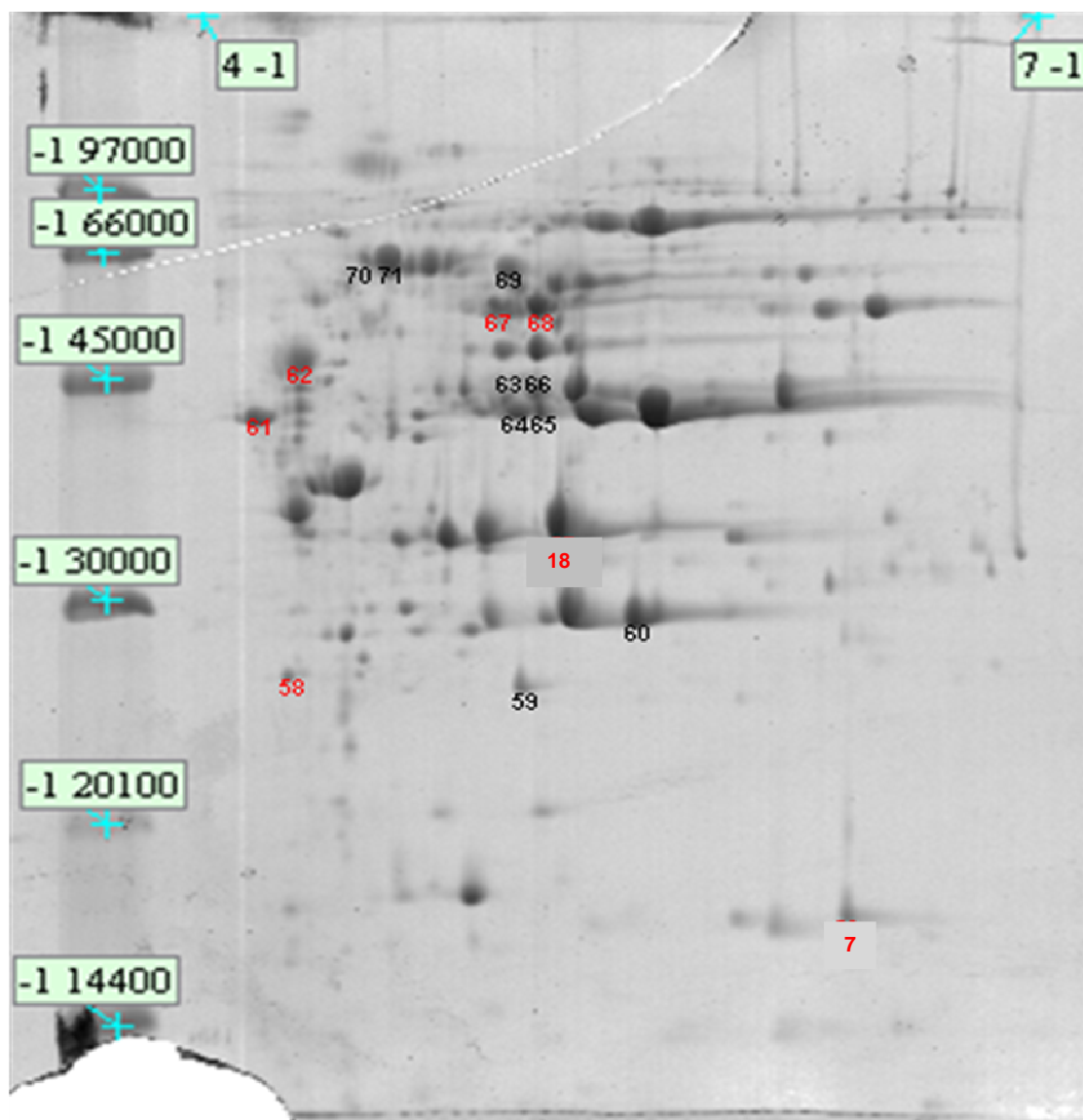
<b>Condição de crescimento</b>	<b>Número de bandas detectadas no mapa de referência</b>	<b>Número de bandas presentes nas réplicas (%)</b>	<b><math>r^{2a}</math></b>
TLE + Fs	202	92 / 86	0,98 / 0,94
MM + Fs	194	86 / 85	0,99 / 0,97
TLE + GLI	22	94 / 82	0,97 / 0,92

<sup>a</sup> Valor de correlação entre o mapa de referência com suas réplicas. Essa correlação é baseada na diferença de migração de bandas de proteínas entre as réplicas.

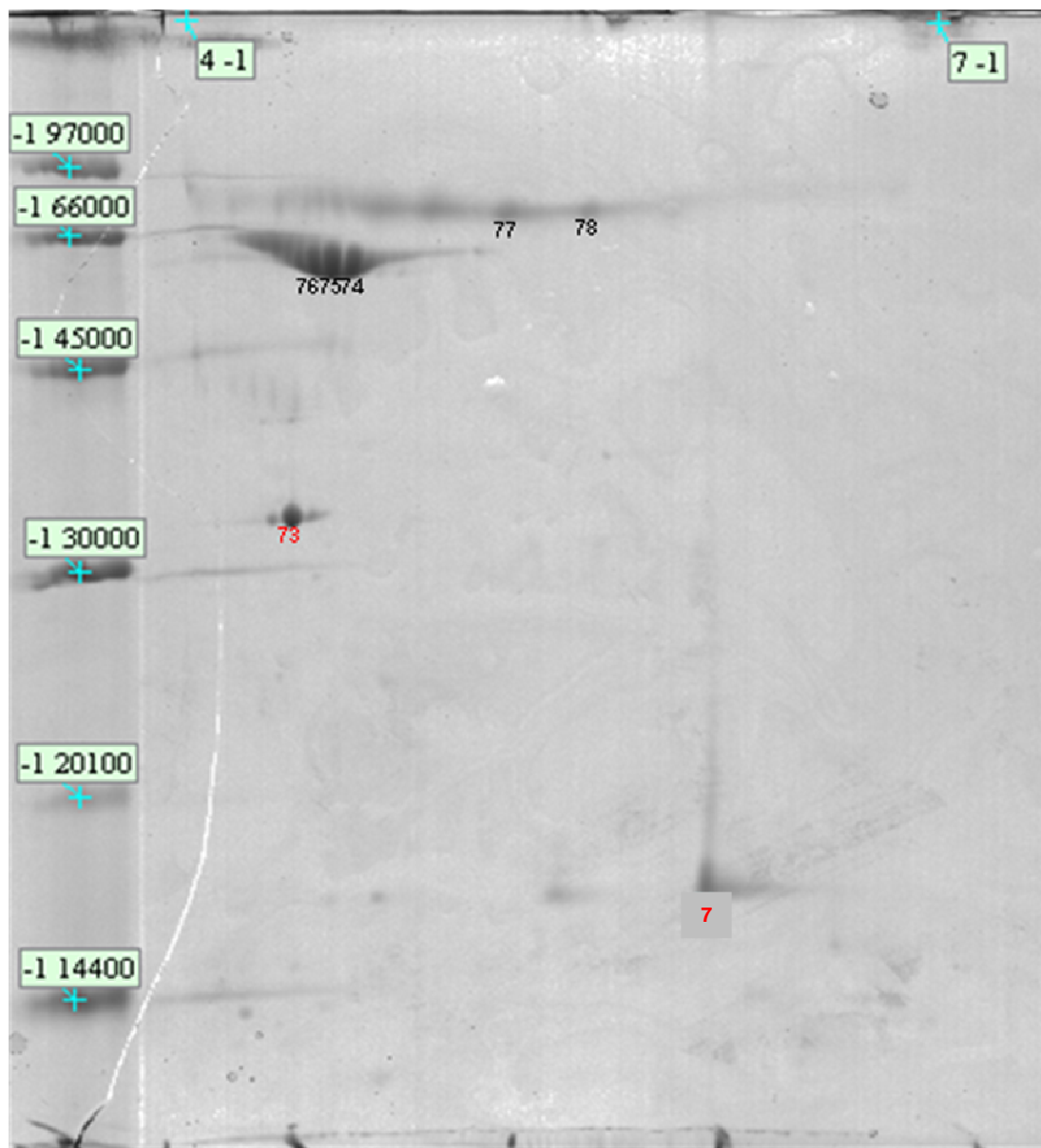




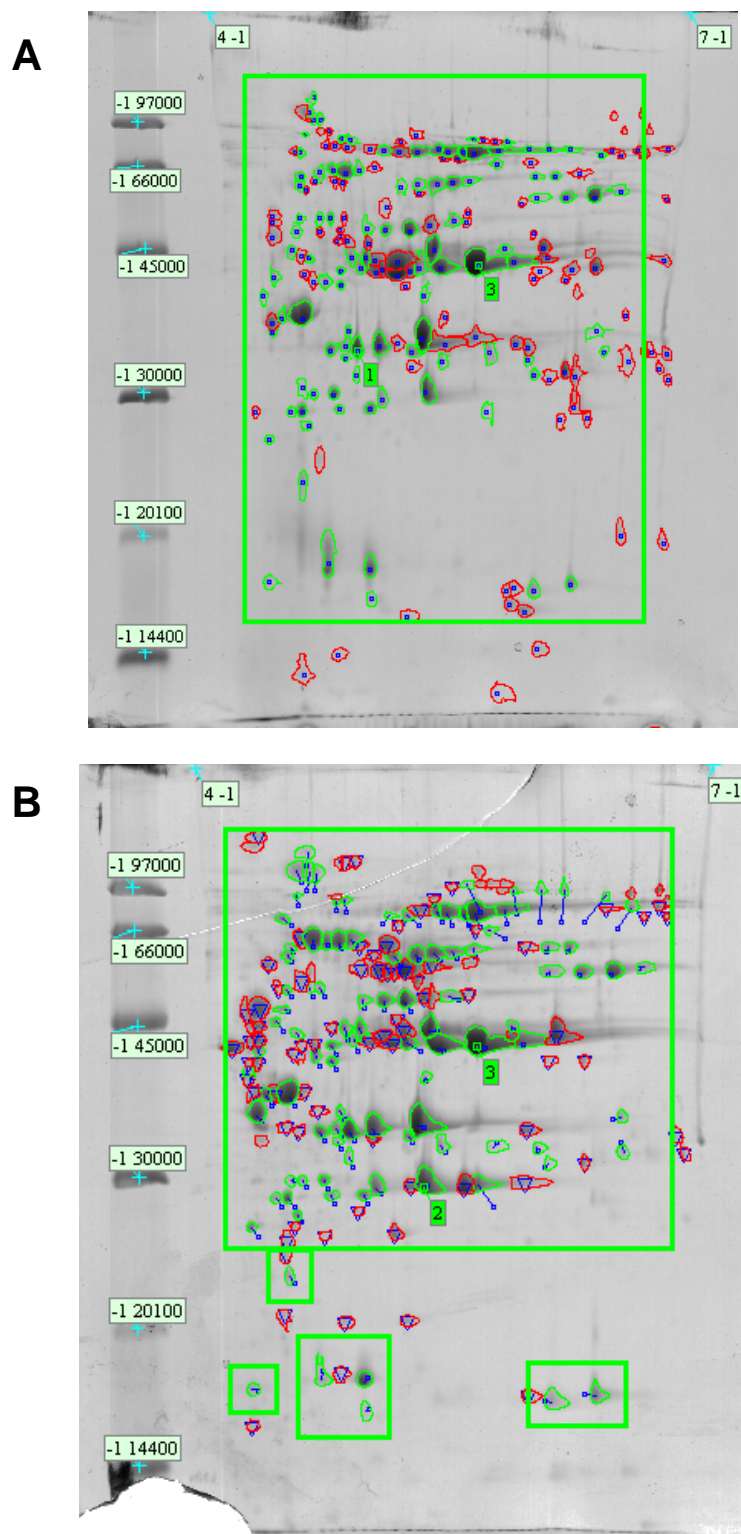
**Figura 7. Mapa proteômico do meio TLE + Fs.** Os números são referentes às bandas retiradas para análise por espectrometria de massas, sendo que aquelas marcadas em vermelho, representam as proteínas identificadas.



**Figura 8. Mapa proteômico do meio MM + Fs.** Os números são referentes às bandas retiradas para análise por espectrometria de massas, sendo que aquelas marcadas em vermelho representam as proteínas identificadas.



**Figura 9. Mapa proteômico do meio TLE + GLI.** Os números são referentes às bandas retiradas para análise por espectrometria de massas, sendo que aquelas marcadas em vermelho representam as proteínas identificadas.

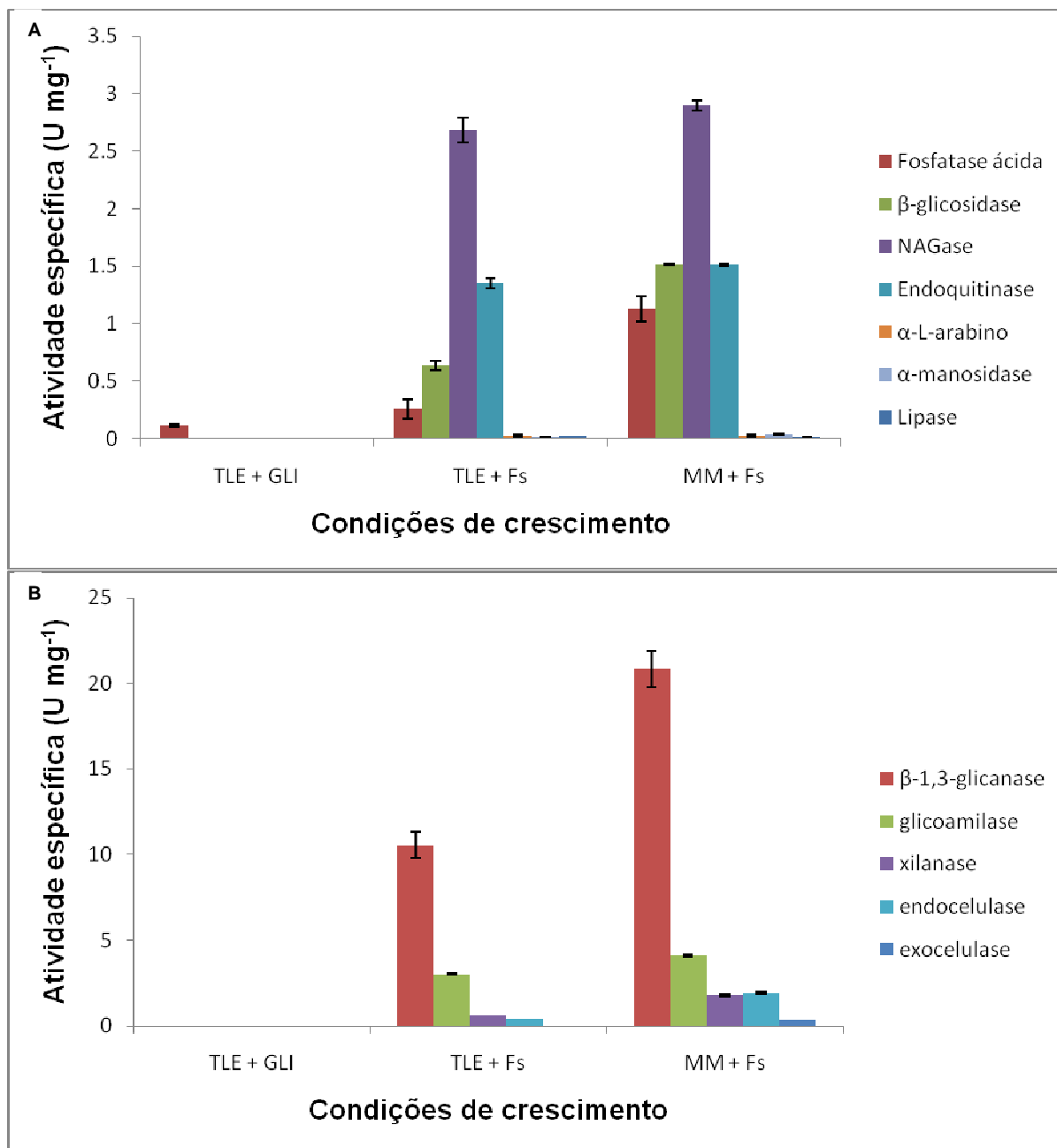


**Figura 9. Comparativo dos mapas de TLE + Fs e MM + Fs.** Os círculos em verde mostram as bandas consideradas como semelhantes entre as condições e em vermelho as bandas detectadas nos géis que não tiveram complemento na outra condição. Observa-se um desvio muito grande entre algumas bandas consideradas como semelhantes. **A.** TLE + Fs; **B.** MM + Fs.

Após análise dos géis, 78 bandas de proteínas foram retiradas dos géis das três condições (Figura 7, 8 e 9), submetidas à digestão trípica e análise por espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF). Das 78 amostras, 68 geraram bons espectros de MS, sendo que dessas 68, 22 correspondiam a isoformas de outras proteínas. Devido a isso, 46 amostras foram analisadas novamente e foram gerados 142 espectros de MS/MS. Vários desses espectros foram então seqüenciados manualmente através dos programas FlexAnalysis e PepSeq e os peptídeos obtidos foram comparados com o banco de dados de proteínas não-redundante do NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Até o momento, foram identificadas 33 bandas de proteínas referentes a 18 genes diferentes (Tabela 7).

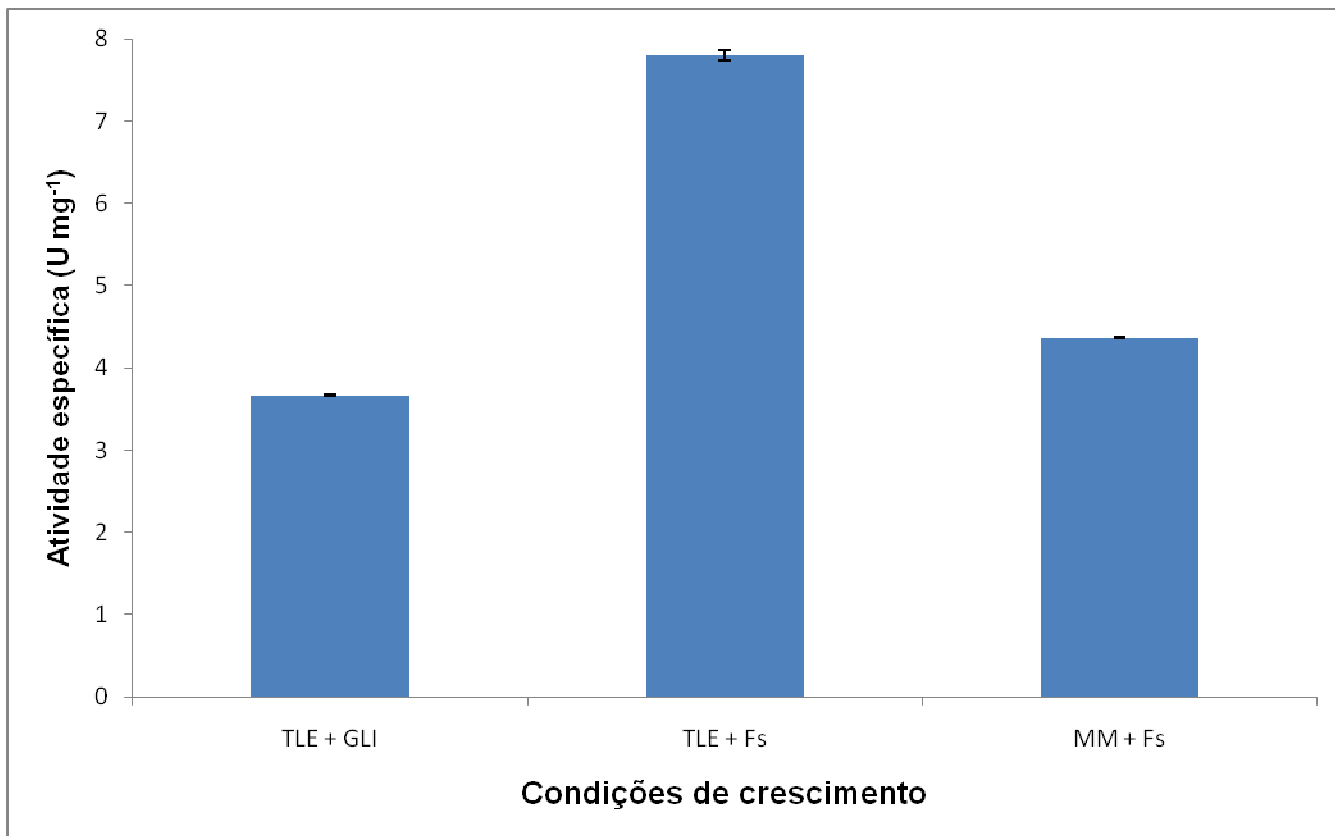
A proteína Sm1 estava presente nas três condições de crescimento, indicando uma expressão constitutiva dessa proteína, assim como a proteína Epl1 de *T. atroviride*, que é uma proteína elicitora de defesa em plantas e possui identidade de seqüência com proteínas da classe das ceratoplataninas já descritas como fatores de virulência de fungos fitopatogênicos (SEIDL et al., 2006a; DJONOVIC et al., 2006). Plântulas de algodão tratadas com a proteína Sm1 purificada de *T. virens*, apresentaram expressão sistêmica aumentada de quitinase (Classe I),  $\beta$ -1,3-glicanase, peroxidase (POD6), hidroximetil-glutarilCoA redutase e lipo-oxigenase, todas proteínas relacionadas à defesa. Além disto, apresentaram resistência à infecção pelo fungo fitopatogênico *Coletotrichum* sp, e acúmulo de peróxido de hidrogênio em folhas e cotilédones (DJONOVIC et al., 2006).

Baseado nas enzimas hidrolíticas identificadas e em outras que são descritas na literatura como enzimas envolvidas no micoparasitismo (BENITEZ et al., 2004; HOWELL et al., 2004), alguns ensaios enzimáticos foram realizados com o sobrenadante das diferentes condições de crescimento Para corroborar os resultados obtidos (Figuras 11 e 12).



**Figura 11. Atividades enzimáticas dos sobrenadantes das diferentes condições de crescimento. A.** Ensaios enzimáticos de diferentes substratos ligados ao pNP, evidenciando

uma alta atividade de NAGase. **B.** Ensaios enzimáticos baseados na detecção de açúcares redutores pelo reagente ADNS, evidenciando uma alta atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase. NAGase – N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase;  $\alpha$ -L-arabino –  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase.



**Figura 12. Atividade proteolítica total do sobrenadante das diferentes condições de crescimento.** A maior atividade foi detectada em TLE + Fs, o que era esperado visto que a maior diversidade de proteases foi secretada por *T. harzianum* nesta condição.

*Trichoderma* spp. produzem uma série de enzimas para a degradação de homo e heteropolissacarídeos, os quais são importantes para sua sobrevivência. A constituição da parede celular dos fitopatógenos é uma característica importante para indução de enzimas hidrolíticas. A parede celular da maioria dos fungos é uma estrutura complexa composta, aproximadamente, por 90% de polissacarídeos como  $\beta$ -glicanas, quitina entre outros, e 10 % de proteínas, lipídeos, íons orgânicos (ELAD et al., 1985; LATGÉ, 2007). A

diferença na expressão de enzimas hidrolíticas é influenciada pelos níveis presentes no indutor, ou seja, pela composição dessas estruturas na parede celular de fungos.

As enzimas quitinolíticas em *T. harzianum* são induzidas na presença do hospedeiro e agem sinergisticamente, sendo que algumas enzimas deste sistema são expressas antes mesmo do contato do micoparasita com seu hospedeiro, como a endoquitinase 42 kDa identificada neste trabalho, sugerindo a existência de fatores de indução presentes no meio e produzidos pelo fitopatógeno (KULLNIG et al., 2000). A seqüência completa dessa endoquitinase (ECH-42) possui uma massa predita de 46 kDa, diferente do que é observado. Sugere-se que essa proteína seja produzida como uma preproenzima, a qual passa por uma etapa de processamento do peptídeo sinal (entre os aminoácidos 23 e 24) e outra de clivagem por parte de uma endopeptidase KEX2-like em uma lisina ou arginina (K-33 ou R-34), visto que o N-terminal dela começa em uma alanina (A-36) (CARSOLIO et al., 1994).

Foi identificada também uma endoquitinase 33 kDa, que diferentemente da ECH-42, é expressa apenas durante a fase de contato durante o micoparasitismo (DANA et al., 2001). Até o momento, nenhum trabalho de análise do secretoma de espécies de *Trichoderma* relatou a identificação da endoquitinase 33 kDa.

Estas duas enzimas (endoquitinase 42 kDa e 33 kDa) foram identificadas em meio TLE + FS e MM + Fs, fato comprovado através das dosagens enzimáticas (Figura 11A), sendo que em MM + Fs ela foi ligeiramente maior. Apesar de não ter sido identificada, até o momento, foi possível observar uma alta atividade de N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase em meio TLE + Fs e MM + Fs. A



ausência de atividade de endochitinases e N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase em TLE + GLI era esperado visto que a glicose e outros açúcares de fácil fermentação reprimem a expressão dessas enzimas (VITERBO, et al., 2002).

A presença de  $\beta$ -1,3-glicanases e  $\beta$ -1,6-glicanases era esperada devido a composição da parede celular da maioria dos fitopatógenos, e a atividade da primeira foi avaliada, estando presente somente nos meios contendo parede celular (FIGURA 11B). Essas enzimas, além de participarem da degradação da parede celular durante o micoparasitismo, desempenham papéis chaves nos processos morfogenéticos-morfolíticos durante o desenvolvimento e diferenciação (ADAMS, 2004) e na mobilização de  $\beta$ -glicanas em resposta as condições de exaustão de carbono e energia (PITSON et al., 1993). Uma endo- $\beta$ -1,3-glicanase e duas  $\beta$ -1,6-glicanases foram identificadas. As duas  $\beta$ -1,6-glicanases são produtos do gene *p1*, de *T. harzianum*, mas elas diferem em 13 kDa, sendo que a menor só está presente em meio TLE + Fs. Essa diferença poderia ser resultado de digestão proteolítica pelas enzimas secretadas por *T. harzianum*, apesar de ser pouco provável já que ambas apareceram no gel com uma grande intensidade. Outra possível explicação seria o splicing alternativo do mRNA, gerando esta diferença entre as duas proteínas, sendo que uma das regiões identificadas são conservadas em ambas. São necessários mais estudos para melhor entender a razão desse fato, visto que existem poucos trabalhos na literatura sobre  $\beta$ -1,6-glicanases, sendo que apenas sete genes, de vários fungos diferentes, foram clonados até hoje (MONTERO et al., 2007).

Outra classe de enzimas que tem recebido uma maior atenção são as proteases. O estudo do sistema proteolítico de *Trichoderma* e sua contribuição

no controle biológico têm aumentado bastante nos últimos anos. ELAD & KAPAT (1999) mostraram que enzimas hidrolíticas produzidas por *B. cinerea* foram parcialmente desativadas por ação das proteases produzidas por *T. harzianum* e que extratos de cultura de *Trichoderma* contendo proteases foram capazes de reduzir a germinação de fitopatógenos. Assim, as proteases de *Trichoderma* podem ser importantes no processo de micoparasitismo pela degradação dos componentes da parede celular do hospedeiro (De MARCO & FELIX, 2002).

Foram identificadas, até o momento, seis proteases diferentes, sendo que o meio TLE + Fs, um meio mais rico em fontes de nitrogênio, apresentou a maior atividade, o que era esperado visto que a maior diversidade de proteases foi secretada por *T. harzianum* nesta condição (Figura 12). A protease *trypsin-like* PRA1, também identificada neste trabalho, foi descrita como sendo a primeira proteína de espécies de *Trichoderma* que mostrou atividade direta, por si só, contra nematóides, como *Meloidogyne javanica*, incluindo esse tipo de protease como novas proteínas nematotóxicas, fato que era atribuído apenas as serina proteases *subtilisin-like* (SUÁREZ et al., 2004). Uma serina endopeptidase homóloga a (*subtilisin-like*) de *T. harzianum*, aparentemente presente somente em TLE + Fs, também foi identificada. Essa protease não é transcrita constitutivamente, sendo induzida fortemente quando *T. harzianum* CECT 2413 foi crescido em diferentes paredes celulares e quitina (SUÁREZ et al., 2007).

Duas aspartato proteases foram identificadas, sendo que a primeira, estava presente somente no mapa de MM + Fs e supostamente esta envolvida na degradação de proteínas superproduzidas (DELGADO & JARANA, dados

não publicados). A segunda só foi encontrada em TLE + GLI, e não há relatos de se tratar de uma protease produzida constitutivamente. SUÁREZ et al. (2005) observaram a presença dessa protease quando *T. harzianum* foi crescido na presença de parede celular de diferentes patógenos, dentre eles *R. solani*, e quitina. Estudos são necessários para analisar se há motivos de glicosilação nesta proteína, podendo levar a uma modificação no pI e massa molecular, mudando sua posição no gel, ou se tratar de uma protease que a transcrição é controlada de acordo com o pH externo, justificando o aparecimento quando crescido em *R. solani*.

As outras duas proteases identificadas neste trabalho ainda não foram descritas para *T. harzianum*. A primeira foi mais similar a uma proteína hipotética de *Sclerotinia Sclerotiorum* que possui um domínio conservado da família M14 das metalo-carboxipeptidases. Dentre as enzimas dessa família, encontra-se a carboxipeptidase 2, identificada por MONTEIRO et al. (2010). Como os peptídeos obtidos dessa proteína cobriram regiões distantes entre si na seqüência da proteína, é possível confeccionar primers para outros estudos, dentre eles, a confirmação se corresponde a mesma proteína encontrada por MONTEIRO et al. (2010). A outra protease identificada foi uma serina protease *subtilisin-like* com alta homologia a de *T. koningii*, presente somente em TLE + Fs. Não há nenhuma publicação relativa à função, características, regulação, entre outros estudos possíveis desta proteína, inclusive de *T. koningii*.

Em contraste com quitina e  $\beta$ -1,3-glicana, o papel das  $\alpha$ -1,3-glicanas na parede de fungos filamentosos ainda não é bem estabelecido, mas em algumas leveduras como *Schizosaccharomyces pombe*, ela é fundamental para a integridade da parede celular, pois mutantes que não eram capazes de

sintetizar  $\alpha$ -1,3-glicanas sofriram lise celular (HOCHSTENBACH et al., 1998; KATAYAMA et al., 1999). AIT-LAHSEN et al., (2001) e SANZ et al. (2005) demonstraram em *T. harzianum* e *T. asperellum*, respectivamente, que a expressão e a secreção de  $\alpha$ -1,3-glicanases ocorreu quando os fungos foram crescidos em condições que simulam o micoparasitismo. De todas as proteínas analisadas por espectrometria de massas, as  $\alpha$ -1,3-glicanases foram as proteínas com o maior número de isoformas (em TLE + Fs) e esse alto número pode ser explicado pela composição da parede celular, caso haja similaridade com a de *Fusarium oxysporum*, visto que a quantidade de  $\alpha$ -1,3-glicanas é significativa (SCHOFFELMEER, et al., 1999).

A identificação de uma glicoamilase expressa em grande quantidade, quando *T. harzianum* foi crescido em presença de parede celular, foi uma surpresa, visto que não há relatos na literatura sobre a ação desta enzima no micoparasitismo. Após ser identificada, a atividade específica foi dosada, resultando em uma atividade maior do que a esperada, corroborando a presença dela nos meios TLE + Fs e MM + Fs. As glicoamilases (EC 3.2.1.3) hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,4 entre os resíduos de glicose pela extremidade não-redutora. Uma possível explicação para a presença desta enzima durante a simulação do micoparasitismo é que alguns fungos, como *Aspergillus nidulans*, possuem em sua parede celular, polissacarídeos chamados de S-glicanas, que podem ser formadas apenas por ligações  $\alpha$ -1,3 ou por polímeros alternando ligações  $\alpha$ -1,3 e  $\alpha$ -1,4 (PEBERDY, 1990). Entretanto, essas S-glicanas não foram descritas em *Fusarium solani* e *T. harzianum*.

$\alpha$ -1,2-manosidase e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase são enzimas hidrolíticas identificadas que não possuem genes caracterizados em *T. harzianum*. As  $\alpha$ -

1,2-manosidasases estão envolvidas na retirada de resíduos de manose das glicoproteínas, sendo eles N ou O ligadas. A glicosilação em fungos filamentosos ainda é pouco estudada, mas evidências sugerem que suas N-glicanas são parecidas com as N-glicanas de alta concentração de manose de mamíferos (VAN PETEGEM et al., 2001). As glicoproteínas da parede celular de *F. oxysporum* possuem alta concentração de manose em suas N-glicanas (SCHOFFELMEER, et al., 1999), e a retirada dessa glicosilação deixa as proteínas mais suscetíveis a uma maior ação proteolítica (BARROS et al., 2009), sugerindo uma ação conjunta de enzimas de *T. harzianum* gerando uma eficácia maior na degradação dos componentes da parede de *F. solani*.

A  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase é uma das enzimas chave do sistema de hemicelulases sendo importantes no branqueamento de pasta de papel e bioconversão de material lignolítico em produtos fermentativos (WAN et al., 2007). Elas catalisam a hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,3- e  $\alpha$ -1,5-L-arabifuranosídicas em hemiceluloses como arabinoxilana, L-arabinana e outros polissacarídeos contendo L-arabinose (SAHA, 2000). Outra enzima chave na degradação da hemicelulose é a xilanase, que é capaz de hidrolisar a estrutura da xilana, um heteropolissacarídeo formado por resíduos de xilopiranosil ligados por ligações  $\beta$ -1,4. As hemiceluloses são componentes da parede celular de plantas, e não foram descritas como componentes na parede de fungos filamentosos. Apesar de não ter sido identificada nos mapas, a atividade de xilanase foi detectada nos dois meios contendo parede de *F. solani*, sendo maior em MM + Fs (Figura 11B). Existem evidências de que uma xilanase de 22-kDa secretada por espécies de *Trichoderma* induz a produção de etileno e indução de defesa local em plantas (HARMAN et al., 2004). Por degradar a

hemicelulose, a  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase pode realizar um papel semelhante à da xilanase 22-kDa, em plantas. São necessários mais estudos para melhor compreender seu real papel quando *T. harzianum* é crescido em presença de parede celular de *F. solani*.

Não existem relatos da presença de celulose na parede de *F. solani* ou *F. oxysporum* (SCHOFFELMEER, et al., 1999), e apesar disso, duas proteínas pertencentes à família das celulases, uma beta-endo-1,4-glicanase e uma celobiohidrolase I, foram identificadas somente no mapa de MM + Fs. As celulases ( $\beta$ -1,4-glicanases) compreendem as exoglicanases (celobiohidrolases EC 3.2.1.91), que catalisam a hidrólise de ligações  $\beta$ -1,4-D-glicosídicas na celulose e celotetraose, liberando celobiose das extremidades reductoras das cadeias; endoglicanases (EC 3.2.1.4) que hidrolisam em ligações internas no polímero da celulose, produzindo novas cadeias terminais, logo causam uma diminuição considerável no grau de polimerização da celulose; e  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21), que catalisam a hidrólise de resíduos de  $\beta$ -D-glicose terminais não-redutores e oligômeros, entre esses a celobiose liberada por CBH, liberando  $\beta$ -D-glicose (SILVA, 2008). A parede celular de fungos oomicetos, como *Pythium ultimum*, é composta principalmente de celulose, mas existem poucos trabalhos na literatura que estudam os efeitos das celulases no micoparasitismo desses fungos (SEIDL et al., 2006b). A atividade de exoglicanase em TLE + Fs não foi mensurável e as atividades de endoglicanases e  $\beta$ -glicosidases foram maiores em MM + Fs (Figura 11B).

A banda referente à proteína  $\beta$ -1,3-glicanosiltransferase estava presente somente no mapa MM + Fs. Essa proteína está geralmente associada à membrana plasmática ancorada por glicofosfatidilinositol, e participa no

processo de biogênese e alongação da cadeia de  $\beta$ -1,3-glicanas da parede celular, sendo importante no crescimento de fungos (HURTADO-GUERRERO et al., 2009). Em fungos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, foi observado à presença de diferentes  $\beta$ -1,3-glicanosiltransferases (5, 5 e 7, respectivamente), e mutantes que tiveram os genes *gas1*, *gas 2* e *gas 4* nocauteados em *S. cerevisiae*, mostraram uma severa redução no crescimento, esporulação, aumento da permeabilidade dos esporos a substâncias exógenas e modificação na composição da parede celular (RAM et al., 1998; RAGNI et al., 2007). Além de envolvida nos processos morfogênicos da parede celular, *gas1* de *S. cerevisiae* foi associada com o processo de silenciamento transcricional (KOCH & PILLUS, 2009). Até o momento, nenhum trabalho realizado com as  $\beta$ -1,3-glicanosiltransferases relatou a presença tão intensa dessas enzimas no meio extracelular.

Outras enzimas hidrolíticas como lipases e fosfatases ácidas também foram detectadas nos meio de crescimento. Compostos inorgânicos e lipídeos também estão presentes na parede celular de fungos, porém, estes são muito pouco estudados e caracterizados. Apesar do papel fisiológico das fosfatases e de sua importância nos estudos de regulação gênica e secreção de proteína, seu papel nas interações planta-fungos durante todo o ciclo de infecção da planta, ou mesmo fungo-fungo ainda não é conhecido (MONTEIRO, 2008). A baixa atividade específica de lipases era esperada devido à baixa porcentagem que os lipídeos representam na parede celular da maioria dos fungos, e só foi detectada em meio TLE + Fs e MM + Fs.

Algumas proteínas identificadas nesse trabalho foram observadas em outros estudos com fungos do gênero *Trichoderma* (tabela 7). Nenhuma

análise do secretoma de espécies desse gênero, realizadas até o momento, conseguiu identificar um número maior do que 8 proteínas de genes diferentes. Existem algumas proteínas como N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidases e  $\beta$ -glicosidases, já descritas em outros trabalhos (GRYNIER et al., 2005; TSENG et al., 2008), que ainda não foram identificadas, mas espera-se encontrá-las, já que foram confirmadas pelas atividades enzimáticas. A produção de diferentes proteases por *T. harzianum* pode ser relacionado à uma possível camada glicoprotéica, já descrita na parede de *F. oxysporum* (SCHOFFELMEER, et al., 1999), que protege uma camada de quitina. A identificação de duas proteases ainda não descritas abre a possibilidade de novos estudos para caracterização e o entendimento de sua importância para *T. harzianum*. Chama também a atenção a aspartato protease identificada, até o momento, somente em TLE + GLI, visto que essa enzima foi identificada quando *T. harzianum* foi crescido na presença de diferentes paredes de fitopatógenos e quitina (SUÁREZ et al., 2005).

No meio TLE + Fs, foi detectada a maior quantidade de proteínas entre os sobrenadantes, mas isso não se traduziu em maior atividade específica, sendo que somente no ensaio de proteases e lipases ela foi maior do que em MM + Fs. As diferenças no perfil de proteínas secretadas nas diferentes condições demonstra a capacidade de *T. harzianum* se adaptar e responder de acordo com o seu ambiente. A presença de algumas proteínas ainda não relacionadas com o micoparasitismo, principalmente em MM + Fs, como a  $\beta$ -1,3-glicanosiltransferase, precisa ser investigada para melhor compreender os mecanismos de resposta de *T. harzianum* em uma situação de estresse, e avaliar a função dessas e outras proteínas produzidas.



Esse trabalho contribuiu gerando novas informações e novas perguntas relativas à resposta de *T. harzianum* crescido com parede de *F. solani*, além de ser o primeiro trabalho no qual toda a parte de eletroforese bidimensional, análise dos mapas proteômicos e tripsinização das amostras foi realizado no Laboratório de Enzimologia, gerando protocolos e padronizações para futuros trabalhos de proteômica realizados pelo grupo.

Tabela 7. Proteínas identificadas de *T. harzianum* ALL42 quando crescido em diferentes condições.

Proteínas identificadas	Banda(s)	Número de acesso NCBI	pI e MM (Da)	Seqüência de aminoácidos obtidos	Organismo	Condições
small protein 1 (sm1)	7 <sup>a</sup>	ADB82652.2	6,25; 17230	YHWSTQGQIPR DTVSYDTGYDDGSR SLNVVSCSDGPNGLETR SWSYPTR	<i>Hypocrea lixii</i> ( <i>T. harzianum</i> )	TLE + Fs, MM + Fs e TLE + GLI
$\alpha$ -L-arabinofuranosidase (fragmento)	8 <sup>a</sup>	XP_002376302.1	6,56; 20149	KSFYEDATFCPQAGLDGQGNSFR	<i>Aspergillus flavus</i>	TLE + Fs e MM + Fs
protease <i>trypsin-like</i>	12, 13 <sup>a</sup>	CAC80694.2	5,34; 29591	GFPGVYTR TVVSAGHCVIDQR LLVGIPAGPGAGR	<i>Hypocrea lixii</i> ( <i>T. harzianum</i> )	TLE + Fs e MM + Fs
endoquitinase 33 kDa	16, 18, 57 <sup>a</sup>	ABP96986.1	5,28; 34813	GYVSGSQLTSVVFQYSK QNIADVWGWQNSANSQSTQQR	<i>Hypocrea lixii</i> ( <i>T. harzianum</i> )	TLE + Fs e MM + Fs
endoquitinase 42 kDa	28, 29, 30 <sup>a</sup>	AAA98644	5,67; 42982	IVLGMPIYGR APGYANSVYFTNWGLYDR	<i>Hypocrea lixii</i> ( <i>T. harzianum</i> )	TLE + Fs e MM + Fs
Proteína hipotética (Metalocarboxipeptidase)	31 <sup>a</sup>	XP_001589834.1	6,08; 45183	VYFDGNIHAR YSTSFQSADLYPTSGASDDYAYSR	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	TLE + Fs e MM + Fs
1,2- $\alpha$ -mannosidase	33 <sup>a</sup>	AAF34579.1	4,75; 51858	WVLAADSTIAHLASHPSTR	<i>Hypocrea jecorina</i> ( <i>T. reesei</i> )	TLE + Fs e MM + Fs
$\beta$ -1,6-glicanase	32, 37, 38 <sup>a</sup>	CAC80490.1	6,405; 42505 6,39; 57156	YNNDIWVR LATESESQTNAR LNHAYENAYAQYFVK FTQQYDAGLQR	<i>Hypocrea lixii</i> ( <i>T. harzianum</i> )	TLE + Fs e MM + Fs
glicoamilase	43, 44 <sup>a</sup>	CAI67598.1	4,84; 63894	YVPADGSLAEQFDR FWVSGGYIDSNINTNEGR	<i>Hypocrea lixii</i> ( <i>T. harzianum</i> )	TLE + Fs e MM + Fs
serin endopeptidase	45, 46 <sup>a</sup>	CAL25578.1	5,17; 74848	NIPTVFLSSYK VFGCEGQAGNDVLIAYNK	<i>Hypocrea lixii</i> ( <i>T. harzianum</i> )	TLE + Fs
$\alpha$ -1,3-glicanase	47, 48, 50, 51 <sup>a</sup>	CAC80493.1	5,64; 73435	ASSPPPVSSTR NWVFPGGPLIYNR	<i>Hypocrea lixii</i> ( <i>T. harzianum</i> )	TLE + Fs e MM + Fs

$\beta$ -endo-1,3-glicanase	<b>52</b> <sup>a</sup>	P53626.1	6.71; 72049	YVQNEQLVYWYR VAYFFPGK HPQWFASQSR NPTYGDVTSSNTRPGALAPGGR GSTLVGASSHVNTYSYGNTVGR NTSPASEPTVCTVGASTSADAR	<i>Hypocrea lixii</i> ( <i>T. harzianum</i> )	TLE + Fs e MM + Fs
protease <i>subtilisin</i> like	<b>53</b> <sup>a</sup>	ABN04079.1	5,91; 34749	VNDNSGSGFTANVLAGVVFVADDAQTR GSTTYVYDSDSAGAGTCSYIIDTGVDATHPEFEGR NFFNYLR	<i>Hypocrea koningii</i> ( <i>T. koningii</i> )	TLE + Fs
endo- $\beta$ -1,4-glicanase	58 <sup>a</sup>	AAM77711.1	4,32; 26175	SYNPVQIAIPQKR TVNSIGSMPTTASWSYTGSNIR AALVVFDLGNER	<i>Hypocrea schweinitzii</i>	MM + Fs
aspartato protease	<b>61</b> <sup>a</sup>	CAC17811.1	4,20; 42262	KLSGSTWSIEYGDK HQETGSYNFGFIDTSLAK GTIGYTPADGSEGYWGFTATGYSVGGAK DIPILQQLGTVNIR	<i>Hypocrea lixii</i> ( <i>T. harzianum</i> )	MM + Fs
$\beta$ -1,3-glicanosiltransferase	<b>62</b> <sup>a</sup>	XP_00154703.1	4,36; 47951	WQGVGYAANDDVIDR LLNDAGIYVFDLGEPISSINR VVYSNIR	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	MM + Fs
celobiohidrolase I	67, <b>68</b> <sup>a</sup>	Q9P8P3.1	5,20; 55994	YGTGYCDSQCPR KLTVVTFATDGSISR YGGTCDPDGCDWNPYR AYNAFLSAAGGK YTGSLTYFSTLK	<i>Hypocrea lixii</i> ( <i>T. harzianum</i> )	MM + Fs
aspartato protease	73 <sup>a</sup>	CAI911181.1	4,47; 32990	FLNEYYSVFDTTNGR YYAWINDGGSSGVNTIIGQK KSTGGSVQVSYGSGSFSGTEYKDTVSFGGLTVTSQSVGAAR	<i>Hypocrea lixii</i> ( <i>T. harzianum</i> )	TLE + GLI

<sup>a</sup> O pI e a massa molecular (MM) é referente a banda marcada em negrito.

## 5. CONCLUSÕES

- *Trichoderma harzianum* mostrou ser um bom antagonista de *F. solani*, sendo eficaz na inibição desde o pré-contato até a colonização das hifas.

- Mapas proteômicos das diferentes condições de crescimento foram construídos com sucesso e permitiram a visualização de algumas diferenças entre os meios TLE + Fs e MM + Fs;

- Um total de 33 proteínas de 18 genes diferentes foram identificadas, sendo que apenas seis haviam sido encontradas em outros estudos de análise do secretoma de *Trichoderma* spp.

- Apesar da maior concentração de proteínas secretadas em TLE + Fs, a atividade específica das enzimas hidrolíticas dosadas, com exceção de proteases e lipases, foi maior em meio MM + Fs, sugerindo uma maior diversidade de proteínas no primeiro meio.

- Diferentes proteases, dentre elas duas (metaloprotease hipotética e serino protease subtilisin-like) ainda não descritas em *T. harzianum*, foram identificadas. O número e a diversidade de proteases variou de acordo com a condição de crescimento;

- Em MM + Fs, *T. harzianum* foi capaz de crescer e secretar, em grande quantidade, uma beta-1,3-glicosiltransferase, a qual necessita de mais estudos para entender seu real papel na resposta de *T. harzianum* quando crescido em parede celular de *F. solani* em meio pobre em nutrientes;

- A análise mais abrangente das proteínas secretadas por *T. harzianum* permite uma análise mais global do processo de micoparasitismo. A resposta protéica de *T. harzianum* varia de acordo com a sua condição de crescimento, evidenciando o arsenal genético que este fungo tem para poder obter energia de diversas fontes, inclusive fungos fitopatógenos.

## 6. PERSPECTIVAS

Das amostras retiradas dos géis bidimensionais e analisadas por espectrometria de massas, ainda é possível identificar 24 proteínas diferentes. O seqüenciamento dos espectros de MS/MS referentes a essas proteínas está em andamento e deve ser complementado com a análise de outras bandas que não foram retiradas dos géis bidimensionais. Além disso, esse trabalho deve ser complementado com a análise proteômica do micélio para se obter uma resposta mais completa dos eventos do micoparasitismo, entre outros de *T. harzianum* quando crescido nas duas condições contendo parede celular de *F. solani*.

A identificação de proteínas ainda não descritas em *T. harzianum* e outras sem relação conhecida com o micoparasitismo geraram perguntas que não puderam ser respondidas durante este trabalho. Trabalhos de caracterização das proteases identificadas não descritas em *T. harzianum*, clonagem dos genes, entre outros trabalhos possíveis, devem ser realizados. O estudo da expressão dos genes sem função conhecida no micoparasitismo pode elucidar se eles são induzidos na presença de parede ou não. Para se obter uma visão mais ampla, estudos de vias de sinalização são necessários para identificar fatores que induzem a produção de certas proteínas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAWI, G.S. (1994). Pudriciones radicales. In: PASTOR-CORRALES, M.A.; SCHWARTZ, H.F. (Ed.). Problemas de producción del frijol en los trópicos. 2. ed. Cali (Colômbia): CIAT, 1994: 121-184.

ABDEL-FATTAH, G.M., SHABANA, Y.M., ISMAIL, A.E., RASHAD, Y.M. (2007). *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. *Mycopathologia*, 164: 81-89.

ABREU, A.F.B., BIAVA, M., WANDER, A.E., RAMALHO, M.A.P., ANDRADE, M.J.B. (2005). Cultivo do feijão da primeira e segunda safras na região sul de Minas Gerais. EMBRAPA Arroz e Feijão.

ADAMS, D.J., 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150: 2029–2035.

ALABOUVETTE C, STEINBERG C. (2006). The soil as a reservoir for antagonists to plant diseases. In: EILENBERG J, HOKKANEN H.M.T., eds. An ecological and societal approach to biological control. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 123–144.

ALMEIDA, F.B., CERQUEIRA, F.M., SILVA, R.N., ULHOA, C.J., LIMA, A.L., (2007). Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia*

solani: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 29: 1189-1193.

AIT-LAHSEN, H., SOLER, A., REY, M. DE LA CRUZ, J., MONTE, E., LLOBEL, A. (2001). An Antifungal Exo- $\alpha$ -1,3-Glucanase (AGN13.1) from the Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 5833-5839.

BARROS, M.C. de, SILVA, R.N., RAMADA, M.H.S, GALDINO, A.S., MORAES, L.M.P de, TORRES, F.A.G., ULHOA, C.J. (2009). The influence of N-glycosylation on biochemical properties of Amy1, an  $\alpha$ -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *Carbohydrate Research*, 344: 1682-1686.

BHADARIA, V., ZHAO, W.S., WANG, L.X., ZHANG. Y., LIU, J.H., YANG, J., KONG, L.A., PENG, Y.L. (2007). Advances in fungal proteomics. *Microbiological Research*, 162: 193-200.

BENÍTEZ, T., RINCÓN, A.M., LIMÓN, M.C., CODÓN, A.C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249–260.

BISSETT, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, 69:2357-2372.

BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*, 8: 93-99.



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

BROUGHTON, W.J., ZHANG, F., PERRET, X., STAEHELIN, K. (2003). Signals exchanged between legumes and *Rhizobium*: Agricultural uses and perspectives. *Plant Soil* 252:129–137.

CAFÉ FILHO, A.C. & LOBO Jr., M. (2000). Manejo de fatores físicos e culturais para controle de patógenos do solo. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 8: 267-301.

CABRAL, C.M., CHERQUI, A., PEREIRA, A., SIMÕES, N. (2004). Purification and characterization of two distinct metalloproteases secreted by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus* sp. strain Az29. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3831-3838.

CARPENTER, M.A., STEWART, A., HIDGWAY, H.J. (2005) Identification of novel *Trichoderma hamatum* genes expressed during mycoparasitism using subtractive hybridisation. *FEMS Microbiology Letters* 251: 105–112.

CARSOLIO, C. GUTIERREZ, A., JIMENEZ, B., VAN MONTAGU, M. & HERRERA-ESTRELA, A. (1994). Characterization of *ech42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences (US)*, 91: 10903-10907.

CHET, I., BENHAMOU, N., HARAN, S. (1998). Mycoparasitism and lytic enzymes. In *Trichoderma and Gliocladium, Enzymes, Biological Control and Commercial Applications*,. Edited by G. E. Harman & C. P. Kubicek. London: Taylor & Francis. v. 2, p. 153–171

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

COHEN-KUPIEC, R., BROGLIE, K.E., FRIESAM, D., BROGLIE, RICHARD M., CHET, I., (1999). Molecular characterization of a novel  $\beta$ -1, 3-exoglucanase related to mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *Gene* 226: 147–154.

CORABI-ADELL, C. (2004). Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (*Hypocreales* – fungi) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica. 202p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro. São Paulo.

DANA M.M., LIMÓN M.C., MEJÍAS R., MACH R.L., BENÍTEZ T., PINTOR-TORO JA, KUBICEK C.P. (2001) Regulation of chitinase 33 (chit33) gene expression in *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics*, 38: 335-342.

DE LA CRUZ, J., REY, M. L., LORA, J. M., HIDALGO-GALLEGO, A., DOMINGUES, F., PINTOR-TORO, J. A., LLOBEL, A., BENITEZ, T. (1993). Carbon

source control on  $\beta$ -glucanases, chitobioses and chitinases from *Trichoderma harzianum*. Archives Microbiology, 159: 316-322.

DE LA CRUZ, J., PINTOR-TORO, J.A., BENÍTEZ, T., LLOBEL, A., ROMERO, L.C. (1995). Novel endo- $\beta$ -1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. Journal of Bacteriology, 177: 6937-6945.

DELGADO-JARANA, J., RINCÓN, A.M., BENÍTEZ, A. (2002). Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization. Microbiology, 148: 1305-1315.

DJONOVIC S., POZO M.J., DANGOTT L.J., HOWELL C.R., KENERLEY C.M. (2006). Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. Molecular Plant Microbe Interactions, 19: 838-853.

DONZELLI, B.G.G. & HARMAN, G.E. (2001). Interaction of ammonium, glucose, and chitin, and chitin regulates the expression of cell-wall degrading enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. Applied Environmental Microbiology, 67: 5643-5647.

DUBOURDIEU, D., DESPLANQUES, C., VILLETZAZ, J.C., RIBEREAU-GAYON, P. (1985). Investigations of an industrial  $\beta$ -D-glucanase from *Trichoderma harzianum*. Carbohydrate Research, 144:277-287

ELAD, Y., BARAK, R., CHET, I. (1983a). Possible role of lectins in mycoparasitism. *Journal of Bacteriology*, 154: 1431-1435.

ELAD, Y., CHET, I., & HENIS, Y. (1983b). Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* - scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* 73: 85-88

ELAD, Y., LIFSHITZ, R. & BAKER, R. (1985). Enzymatic activity of the mycoparasite *Pythium nunn* during interaction with host and non-host fungi. *Physiological Plant Pathology*, 27: 131-148.

ELAD, Y., SADOWSKY, Z., CHET, I. (1987). Scanning electron microscopical observations of early stages of interaction of *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*. *Transactions of the British Mycological Society* 88: 259–263.

ELAD, Y. & KAPAT, A. (1999). Role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 177-189.

FONTAINE, T., SIMENEL, C., DUBREUCQ, G., ADAM, O., DELEPIERRE, M., LEMOINE, J., VORGAS, C.E., DIAQUIN, M., LATGÉ, J.P. (2000). Molecular organization of the alkali insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 27594–27607.

FRIGHETTO, R.T.S. (2000). Influência do manejo de agrotóxicos no meio ambiente. *Fitopatologia brasileira*, 25: 271-274.

GRINYER, J., MCKAY, M., NEVALAINEN, H., HERBERT, B.R. (2004a). Fungal proteomics: initial mapping of biological control strain *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics*, 45: 163-169.

GRINYER, J., MCKAY, M., HERBERT, B.R., NEVALAINEN, H. (2004b). Fungal proteomics: mapping the mitochondrial proteins of a *Trichoderma harzianum* strain applied for biological control. *Current Genetics* 45: 170-175.

GRINYER, J., HUNT, S., MCKAY, M., HERBERT, B.R., NEVALAINEN, H. (2005). Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics*, 47: 381-388.

HALL, R. & NASSER, L.C.B. (1996). Practice and precept in cultural management of bean diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18:176-185.

HANSON, L.E. & HOWELL, C.R. (2004). Elicitors of Plant Defense Responses from Biocontrol Strains of *Trichoderma virens*. 94: 171-176.

HARAN, S., SCHICKELER, H., OPPENHEIM, A., CHET, I. (1995). New components of chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. *Mycological Research*, 99: 441-446.

HARAN, S., SCHICKLER, H., OPPENHEIM, A., CHET, I. (1996). Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology*, 86: 980–985.

HARMAN, G. E., HAYES, C. K., LORITO, M., BROADWAY, R. M., Di PIETRO, A., PETERBAUER, C., TRONSMO, A. (1993). Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum* purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology*, 83: 313-318.

HARMAN, G.E., HOWELL, C.R., VITERBO, A., CHET, I., LORITO, M. (2004). *Trichoderma* species- Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 02: 43-56.

HEINEMEYER, J., SCHEIBE, B., SCHMITZ, U. K., BRAUN, HANS-PETER. (2009) Blue native DIGE as a tool for comparative analyses of protein complexes. *Journal of proteomics*, 72: 539-544.

HOCHSTENBACH, F., KLIS, F.M., VAN DEN ENDE, H., VAN DONSELAAR, E., PETERS, P.J., AND KLAUSNER, R.D. (1998). Identification of a putative alpha-glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences (US)*, 95: 9161-9166.

HURTADO-GUERRERO, R., SCHÜTTELKOPF, A.W., MOUYNA, I., IBRAHIM, A.F.M., SHEPHERD, S., FONTAINE, T., LATGÉ, J.P., VAN AALTEN, D.M.F.

(2009). Molecular mechanisms of yeast cell wall glucan remodeling. *The Journal of Biological Chemistry*, 284: 8461-8469.

INBAR, J. & CHET, I. (1992). Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers. *Journal of Bacteriology*. 174: 1055-1059.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE (2008). Produção agrícola municipal: Cereais, leguminosas e oleaginosas.

KATAYAMA, S., HIRATA, D., ARELLANO, M., PÉREZ, P., AND TODA, T. (1999). Fission yeast  $\alpha$ -glucan synthase Mok1 requires the actin cytoskeleton to localize the sites of growth and plays an essential role in cell morphogenesis downstream of protein kinase C function. *Journal of Cell Biology*, 144: 1173-1186.

KITAMOTO, Y., KONO, R., SHIMOTORI, A., MORI N., ICHIKAWA, Y. (1987). Purification and some properties of an exo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51: 3385-3386.

KOCH, M.R. & PILLUS, L. (2009). The glucanosyltransferase Gas1 functions in transcriptional silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences (US)*, 106: 11224-11229.

KULLNIG, C.M., MACH, R.L., LORITO, M. & KUBICEK, C.P. (2000). Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T.harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a

Prerequisite for Triggering of *Trichoderma ech42* Gene Expression before mycoparasitic contact. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2232-2234.

LIMA, L. H. C., DE MARCO., ULHOA, C. J., FERNANDEZ, A. P., FELIX, C. R. (1997). Purification of chitinase from *Trichoderma* sp. its action on *S. rofosi* and *R. solani* cell wall. *Journal of General and Applied Microbiology* 43: 322-327.

LIMA, A. L. (2002). Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de *Trichoderma* spp. isolados de solo do cerrado brasileiro. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, 73p.

LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, 227: 680-685.

LATGÉ, J.P. (2007). The Cell Wall: a carbohydrate armour of the fungal cell. *Molecular Microbiology*, 66: 279-290.

LOBO Jr. (2002). Plant Pathogens in Brazil. In: Pimentel, D. *Biological Invasions: Economic and Environmental Costs of Alien Plant, Animal, and Microbe Species*. CRC Press, 69-88.

LORITO, M., PETERBAUER, C., HAYES, K. C. & HARMAN, G. (1994). Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology* 140: 623-629.



LORITO, M., WOO, S. L., GARCIA-FERANDES, I., COLUCCI, G., HARMAN, G.E., PINTOR-TORO, J.A., FILIPPONE, E., MUCCIFORA, S., LAWRENCE, C., TUZUN, S. & SCALA, F. (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences (US)*, 95: 7860-7865.

LIU, P.G. & YANG, Q. (2005). Identification of genes with a biocontrol function in *Trichoderma harzianum* mycelium using the expressed sequence tag approach. *Research Microbiology*, 156: 416-423.

LIU, S.Y., LO, C.T., SHIBU, M.A., LEU, Y.L., JEN, B.Y., PENG, K.C. (2009). Study on the anthraquinones separated from the cultivation of *Trichoderma harzianum* strain Th-R16 and their biological activity. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57: 7288-7292.

LIU, Y. & YANG, Q. (2009). Cloning and heterologous expression of SS10, a subtilisin-like protease displaying antifungal activity from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*, 290: 54-61.

MARCELLO, C.M., STEINDORFF, A.S., SILVA, R.N., BATAUS, L.A.M., SILVA, S.P., ULHOA, C.J. (2008) Expression analysis of the exo-beta-1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiological Research*, 165: 75-81.

MARCO, J.L. de & FELIX, C.R. (2002). Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. BMC Biochemistry, 3: 3.

MARTIN, K., MCDUGALL, B.M., MCILROY, S., JAYUS, CHEN, J., SEVIOUR, R.J., 2007. Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal  $\beta$ -(1,3)- and  $\beta$ -(1,6)-glucanases. FEMS Microbiology Reviews, 31: 168–192.

MASSART, S. & JIJAKLI, H.M. 2007. Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal biocontrol agents: a review. Journal of Microbiological. Methods, 69: 229-41.

MCINTYRE M., NIELSEN J., ARNAU J., VAN DER BRINK H., HANSEN K., MADRID S. (2004) Proceedings of the 7th European Conference on Fungal Genetics. Copenhagen, Denmark

MEDINA, M.L., KIERNAN U.A., FRANCISCO W.A. (2004). Proteomic analysis of rutin-induced secreted proteins from *Aspergillus flavus*. Fungal Genetics and Biology, 41: 327-335.

MELO S.I. & AZEVEDO L.J. (1998). Controle Biológico. Volume 1- EMBRAPA.

MILLER, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31: 426-428.

MONTEIRO, V.N. & ULHOA, C.J. (2006). Biochemical characterization of a  $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma koningii* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*. *Current Microbiology*, 52: 92–96.

MONTEIRO, V.N. (2008). Avaliação do perfil de proteínas secretadas pelo isolado de *Trichoderma harzianum* (ALL42) obtido do solo do Cerrado induzido por fitopatógenos. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Goiás, 86p.

MONTEIRO, V.N., SILVA, R.N., STEINDORFF, A.S., COSTA, F.T., NORONHA, E.F., RICART, C.A.O., SOUSA, M.V., VAINSTEIN, M.H., ULHOA, C.J. (2010). New Insights in *Trichoderma harzianum* Antagonism of Fungal Plant Pathogens by Secreted Protein Analysis. *Current Microbiology*, DOI 10.1007/s00284-010-9611-8.

MONTERO, M., SANZ, L., REY, M., LLOBELL, A., MONTE, E. (2007). Cloning and characterization of bgn16Æ3, coding for a  $\beta$ -1,6-glucanase expressed during *Trichoderma harzianum* mycoparasitism. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1291-1300.

NICOLAISEN, M., SUPRONIENÉ, S., KAEGAARD, L., LAZZARO, I., SPLIID, N.H., JUSTESEN, A.F. (2009). Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods* 76: 234–240

NORONHA E.F. & ULHOA C.J. (2000a). Characterization of a 29-KDa  $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*. 183:119–123. 2000.

NORONHA E.F., KIPNIS A., JUNQUEIRA-KIPNIS A.P., ULHOA C.J. (2000b). Regulation of a 36-KDa  $\beta$ -1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiology Letters. 188, 19 -22.

OARD, S., RUSH, M.C., OARD, J.H. (2004). Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*. Journal of Applied Microbiology, 97:169- 180.

OLIVEIRA, S.H.F. (2005). Manejo do mofo branco. Revista DBO Agrotecnologia. Ano 2, n° 4.

OMERO, C., INBAR, J., ROCHA-RAMIREZ, V., HERRERA-ESTRELA, A., CHET, I. & HORWITZ, B.A. (1999). G proteins activators and cAMP promote mycoparasitic behavior in *Trichoderma harzianum*. Mycological Research 103: 1637-1642.

PAEZ, M.E. & ALBARRACIN, N.S de. (2007). Evaluation of the antagonistic capacity of *Trichoderma koningii* above *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. Revista de la Facultad de Agronomia LUZ, 1: 27-31.

PANDEY, A. & MANN, M. (2000). Proteomics to study genes and proteomes. Nature, 405: 837-846.

PAULA JÚNIOR, T.J. (2006). de; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J. de; BORÉM, A. (Ed.). Feijão. 2. ed. atual. Viçosa, MG: UFV, cap. 13, p.359-414.

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

PERSOON, C.H. (1794). Dipositio methodica fungorum. Rõmer's Neues Magazin Botanische 1:81-128.

PIRES, C.S.S., FONTES, E.M.G., SUJII, E.R. (2003). Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas: O algodão como estudo de caso. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

PITSON, S.M., SEVIOUR, R.J., MCDUGALL, B.M., (1993). Noncellulolytic fungal  $\beta$ -glucanases: their physiology and regulation. Enzyme and Microbial Technology, 15: 178-192.

POLETO, I., MUNIZ, M.F.B. SECONI, D.E., SANTIN, D., WEBER, M.N.D., BLUME, E. (2006). Zoneamento e identificação de *Fusarium spp.* causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* a. st.-hil.) na região do vale do Taquarí, RS. Ciência Florestal, Santa Maria, v. 16, n. 1, p. 1-10.

PRUSKY D., YAKOBY N. (2003). Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH? *Molecular Plant Pathology*, 4: 509-516.

PUNJA, Z.K. & UTKHEDE, R.S. (2003). Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotechnology* 21:400-407.

RAGNI, E., COLUCCIO, A., ROLLI, E., RODRIGUEZ-PEÑA, J.M., COLASANTE, G., ARROYO, J., NEIMAN, A.M., POPOLO, L. (2007). GAS2 and GAS4, a pair of developmentally regulated genes required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 6: 302-316.

RAM, A.F., KAPTEYN, J.C., MONTIJN, R.C., CARO, L.H., DOUWES, J.E., BAGINSKY, W., MAZUR, P., VAN DEN ENDE. H., KLIS, F.M. Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of beta-1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *Journal of Bacteriology*, 180: 1418-1424.

RAMADA, M.H.S., LOPES, F.A.C., ULHOA, C.J., SILVA, R.N. (2010). Optimized microplate  $\beta$ -1,3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. screening. *Journal of Microbiological Methods*, 8: 6-10.

REIS, E.M., BEZERRA, R., SCHEER, O., MORAES, N.L.M., CARDOSO, C. (2004). Manejo das podridões radiculares da soja. *Doenças na cultura da soja*. Aldeia Norte Ed. Série Técnica. p.41-53. Passo Fundo.

REITHNER, B., BRUNNER, K., SCHUHMACHER, R., PEISSEL, I., SEIDL, V., KRASKA, R., ZEILINGER, S. (2005). The G protein alpha subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genetics and Biology*, 42:749-760.

REITHNER, B., SCHUHMACHER, R., STOPPACHER, N., PUCHER, M., BRUNNER, K., ZEILINGER, S. (2007). Signaling via the *Trichoderma atroviride* mitogen-activated protein kinase Tmk1 differentially affects mycoparasitism and plant protection. *Fungal Genetics and Biology*, 44:1123:1133.

RIFAI, M. A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, 116: 1-56.

ROCHA, T.L., COSTA, P.H.A. da, MAGALHÃES, J.C.C., EVARISTO, R.G.S., VASCONCELOS, E.A.R. de, COUTINHO, M.V., PAES, N.S., SILVA, M.C.M. da, GROSSI-DE-SÁ, M. de F. (2005). Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. *Comunicado Técnico da Embrapa*. Brasília.

SAHA, B. C. (2000).  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18, 403–423.

SANZ, L., MONTERO, M., REDONDO, J., LLOBEL, A., MONTE, E. (2005). Expression of an  $\alpha$ -1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*. *FEBS Journal*, 272: 493-499.

SCHERM, B., SCHMOLL, M., BALMAS, V., KUBICEK, C.P., MIGHELI, C. (2008). Identification of potential marker genes for *Trichoderma harzianum* strains with high antagonistic potential against *Rhizoctonia solani* by a rapid subtraction hybridization approach. *Current Genetics* 55: 81-91.

SCHIRMBÖCK, M., LORITO, M., WANG, Y.L., HAYES, C.K., ARISAN-ATAC, I., SCALA, F., HARMAN, G.E., KUBICEK, C.P. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied Environmental Microbiology*, 60: 4364-4370.

SCHOFFELMEER, E.A.M., KLIS, F.M.J., SIETSMA, H., CORNELISSEN, B.J.C. (1999). The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology*, 27: 275-282.

SEIDL, V., MARCHETTI, M., SCHANDL, R., ALLMAIER, G., KUBICEK, C.P. (2006a). Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. *FEBS Journal* 273: 4346-4359.

SEIDL, V., SCHMOLL, M., SCHERM, B., BALMAS, V., SEIBOTH, B., MIGHELI, Q., KUBICEK, C.P. (2006). Antagonism of *Pythium* blight of zucchini by *Hypocrea jecorina* does not require cellulase gene expression but is improved by carbon catabolite derepression. *FEMS Microbiology Letters*, 257: 145-151.



SHEVCHENKO, A., WILM, M., VORM, O., MANN, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 68: 850-858.

SHEVCHENKO, A., THOMAS, H., HAVLIS, J., OLSEN, J.V., MANN, M. (2007). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, 1: 2856-2860.

SILVA, R.A. (2005). Produção e caracterização da endo- $\beta$ -1,3-glucanase de *Trichoderma asperellum*. Universidade Federal de Goiás, 53p.

SILVA, R.N. (2003). Aspectos moleculares da indução de N-acetil-glicosaminidase produzidas por *Trichoderma harzianum*. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Goiás, 69p.

SILVA, R.N., SILVA, S.P. da, BRANDÃO, R.L. ULHOA, C.J. (2004). Regulation of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase produced by *Trichoderma harzianum*: evidence that cAMP controls its expression. *Research in Microbiology*. 155:667–71.

SILVA, R.N. (2008). Avaliação do envolvimento de proteína G $\alpha$ s durante a sinalização celular na expressão dos genes de celulase (*cbh1* e *cbh2*) em *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, 114p.

STEINDORFF, A.S. (2010). Construção e análise de uma biblioteca de cDNA de *Trichoderma harzianum* crescido na presença de parede celular de *Fusarium solani*. Universidade Federal de Goiás, 59p.

SUÁREZ, B., REY, M., CASTILLO, P., MONTE, E., LLOBELL, A. (2004) Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65: 46-55.

SUÁREZ, M.B., SANZ, L., CHAMORRO, M.I., REY, M., CONZÁLEZ, F.J., LLOBEL, A., MONTE, E. (2005). Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum* Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. *Fungal Genetics and Biology*, 42: 924-934.

SUÁREZ, M.B., VIZCAÍNO, J.A., LLOBELL, A., MONTE, E. (2007). Characterization of genes encoding novel peptidases in biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413 using the TrichoEST funcional genomics approach. *Current Genetics*, 51: 331-342.

TEIXEIRA, H., PAULA Jr., T.J. de, NICOLI, A., VIEIRA, R.F., CARNEIRO, J.E.S., ZAMBOLIM, L. (2009). Manejo da podridão-radicular-seca do feijoeiro. Circular técnica n. 63, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais.

TSENG, S.C., LIU, S.Y., YANG, H.H., LO, C.T., PENG, K.C. (2008). Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in response to *Rhizoctonia solani*. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 56:6914-6922.

TSOLAKOS, N., TECHANUKUL, T., WALLINGTON, A., ZHAO, Y., JONES, C., NAGY, J., WHEELER, J.X. (2009). Comparison of two combinations of cyanine dyes for prelabelling and gel electrophoresis. *Proteomics*, 9: 1727:1730.

ULHOA, C. J. (1991). Chitinolytic system in *Trichoderma harzianum*. Tese de Doutorado. University of Nottingham. Nottingham, UK.

ULHOA, C. J. & PEBERDY, J. F. (1992). Purification and characterization of an extracellular chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Current Microbiology* 23: 285-289.

UNLU, M., MORGAN, M.E., MINDEN, J.S., (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, 18: 2071–2077.

VAN PETEGEM, F., CONTRERAS, H., CONTRERAS, R., VAN BEEUMEN, J. *Trichoderma reesei*  $\alpha$ -1,2-mannosidase: structural basis for the cleavage of four consecutive mannose residues.

VINALE, F., D'AMBROSIO, G., ABADI, K., SCALA, F., MARRA, R., TURRÀ, D., WOO, S.L., LORITO, M. (2004). Application of *Trichoderma harzianum* (T22) and *Trichoderma atroviride* (P1) as plant growth promoters, and their compatibility with copper oxychloride. *Journal of Zhejiang University Science* 30: 2-8.

VINALE, F., SIVASITHAMPARAM, S., GHISALBERTI, E.L., MARRA, R., WOO, S.L., LORITO M. (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1–10.

VITERBO, A., HARAN, S., FRIESEM, D., RAMOT, O., CHET, I. (2001). Antifungal activity of a novel endochitinase gene (*chit36*) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM. *FEMS Microbiology Letters*, 200: 169-174.

VITERBO, A., RAMOT, O., CHERNIN, L., CHET, I. (2002). Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 549–556.

VIZCAÍNO, J.A., GONZÁLES, F.J., SUÁREZ, M.B., REDONDO, J., HEINRICH, J., DELGADO-JARANA, J., HERMOSA, R., GUTIÉRREZ, R., MONTE, E., LLOBELL, A., REY, M. (2006) Generation, annotation and analysis of ESTs from *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *BMC Genomics*, 7:193-

VIZCAÍNO, J.A., REDONDO, J. SUÁREZ, M.B., CARDOZA, R.E., HERMOSA, R., GONZÁLEZ F.J., REY, M., MONTE, E. (2007) Generation, annotation, and analysis of ESTs from four different *Trichoderma* strains grown under conditions related to biocontrol. *Applied Microbiology Biotechnology*, 75:853–862.

WAN, C.F., CHEN, W.H., CHEN, C.T., CHANG, M.D.T, LO, L.C., LI, Y.K. Mutagenesis and mechanistic study of a glycoside hydrolase family 54  $\alpha$ -L-

arabinofuranosidase from *Trichoderma koningii*. *Biochemical Journal*, 401: 551-558.

WEINDLING, R. (1932). *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology*, 22:837-845.

WILKINS, M.R. & WILLIAMS, K.W. (1997). Cross-species protein identification using amino acid composition, peptide mass fingerprinting, isoelectric point and molecular mass: a theoretical evaluation. *Journal of Theoretical Biology* 186:7-15.

WOO S.L., SCALA F., RUOCCO M., LORITO M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, 96(2): 181-185

XIAO, Z., STORMS, R., TSANG, A. (2004). Microplate-based filter paper assay to measure total cellulose activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 88: 832-837.

XIAO, Z., STORMS, R., TSANG, A. (2005). Microplate-based carboxymethylcellulose assay for endoglucanase activity. *Analytical Biochemistry*, 342: 176-178.

YANG, H.H., YANG, S.L., PENG, K.C., LO, C.T., LIU, S.Y. (2009). Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*, 113: 924-932.

YEDIDIA, I., BENHAMOU, N., CHET, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied Environmental Microbiology* 65:1061-1070.

ZACCARDELLI, M., VITALE, S., LUONGO, L., MERIGHI, M., CORAZZA, L. (2008). Morphological and molecular characterization of *Fusarium solani* isolates. *Journal of Phytopathology*, 156: 534-541.

ZEILINGER, S., REITHNER, B., SCALA, V., PEISSEL, I., LORITO, M., MACH, R.L. (2005). Signal transduction by Tga3, a novel G protein alpha subunit of *Trichoderma atroviride*. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 1591-1597.

## PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA DURANTE O MESTRADO.

### - Artigos publicados em periódicos:

- BARROS, Manoel Cardoso de; SILVA, Roberto do Nascimento; RAMADA, Marcelo Henrique Soller; GALDINO, Aleksandro Sobreira; de MORAES, Lídia Maria Pepe; TORRES, Fernando Araripe Gonçalves; ULHOA, Cirano José. The influence of N-glycosylation on biochemical properties of Amy1, an  $\alpha$ -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *Carbohydrate Research*, v. 334 (2009) p. 1682-1686. (Qualis B1)

- RAMADA, Marcelo Henrique Soller; LOPES, Fabyano Álvares Cardoso; ULHOA, Cirano José; SILVA, Roberto do Nascimento. Optimized microplate  $\beta$ -1,3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. screening. *Journal of Microbiological Methods*, v. 81 (2010), p. 6-10 (Qualis B1)

### - Trabalhos apresentados em Congressos:

- STEINDORFF, Andrei Stecca; RAMADA, Marcelo Henrique Soller; SIQUEIRA, Saulo José Linhares; ULHOA, Cirano José. Crescimento e produção enzimática dos fungos *Trichoderma asperellum* (T-00) e *Trichoderma harzianum* (ALL-42) durante interação com *Rhizoctonia solani*. VIII Seminário de Tecnologia Enzimática, 2008. (Apresentação oral).

- RAMADA, Marcelo Henrique Soller; SILVA, Roberto do Nascimento; ULHOA, Cirano José.  $\alpha$ -amilase de *Cryptococcus flavus* produzida em meio contendo tunicamicina: purificação e comparação. In: VIII Seminário de Tecnologia Enzimática, 2008, Rio de Janeiro. VIII Seminário de Tecnologia Enzimática, 2008.

- RAMADA, Marcelo Henrique Soller; MONTEIRO, Valdirene Neves; ULHOA, Cirano José. Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo *Trichoderma harzianum* em meios contendo parede celular de um fitopatógeno do feijoeiro. In: VI CONPEEX, 2009, Goiânia. VI CONPEEX, 2009.



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/carres](http://www.elsevier.com/locate/carres)

## The influence of N-glycosylation on biochemical properties of Amy1, an $\alpha$ -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*

Manoel Cardoso de Barros<sup>a</sup>, Roberto do Nascimento Silva<sup>b</sup>, Marcelo Henrique Soller Ramada<sup>b</sup>,  
Alexsandro Sobreira Galdino<sup>c</sup>, Lídia Maria Pepe de Moraes<sup>c</sup>, Fernando Araripe Gonçalves Torres<sup>c</sup>,  
Cirano José Ulhoa<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Bioquímica, Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade de Rio Verde-Fesurv, Fazenda Fontes do Saber—s/n, Rio Verde, Goiás, GO, CEP 75901-970, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Enzimologia, Universidade Federal de Goiás (ICB), Goiânia, GO, CEP 74001-970, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, CEP 70910-900, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 February 2009

Received in revised form 29 May 2009

Accepted 1 June 2009

Available online 6 June 2009

#### Keywords:

*Cryptococcus flavus*

$\alpha$ -Amylase

N-glycosylation

Tunicamycin

### ABSTRACT

The yeast *Cryptococcus flavus* secretes a glycosylated  $\alpha$ -amylase (Amy1) when grown in a starch-containing medium. The effects of N-glycosylation on secretion, enzyme activity, and stability of this glycoprotein were studied. Addition of tunicamycin (TM) to the medium at a concentration higher than  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  affected *C. flavus* growth. Amy1 activity increased by 55% in the intracellular fraction after *C. flavus* growth in the presence of  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  TM. SDS-PAGE and gel activity detection showed that native enzyme and deglycosylated enzyme had apparent molecular mass of 68 and 64.5 kDa, respectively. The N-glycosylation process did not affect either optimum pH or optimum temperature. The  $K_M$  values of native and non-glycosylated  $\alpha$ -amylases were 0.052 and  $0.098 \text{ mg mL}^{-1}$ , and  $V_{\text{max}}$  values were 0.038 and  $0.047 \text{ mg min}^{-1}$ , respectively. However, the non-glycosylated form was more sensitive to inactivation by both the proteolytic enzyme trypsin and high temperature. Furthermore, the activity of the non-glycosylated enzyme was affected by  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  suggesting that N-glycosylation is involved in the folding of Amy1.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Journal of Microbiological Methods 81 (2010) 6–10



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jmicmeth](http://www.elsevier.com/locate/jmicmeth)

## Optimized microplate $\beta$ -1,3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. screening

Marcelo Henrique Soller Ramada, Fabyano Álvares Cardoso Lopes,  
Cirano José Ulhoa<sup>\*</sup>, Roberto do Nascimento Silva

Laboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás (ICB), Goiânia, GO, CEP 74001-970, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 November 2009

Received in revised form 8 January 2010

Accepted 9 January 2010

Available online 21 January 2010

#### Keywords:

Biocontrol

Laminarin

Microplate assay

*Trichoderma*

$\beta$ -1,3-glucanase

### ABSTRACT

$\beta$ -1,3-glucanase is an important cell wall-degrading enzyme involved in mycoparasitism by *Trichoderma* spp. during antagonism against phytopathogenic fungi. A simple microplate-based method to assay  $\beta$ -1,3-glucanase activity is described here as an alternative to an expensive tube-assay method. The reaction volume of the micro-assay was reduced to 130  $\mu\text{l}$  from the 1150  $\mu\text{l}$  used in the standard  $\beta$ -1,3-glucanase macro-assay. Statistical analyses showed significant difference in sensitivity between the micro- and the macro-assay. The micro-method was optimized using the Response Surface Quadratic Model. The sensitivity of the optimized micro-method was shown to be four-fold greater than the macro-assay and two-fold higher than the micro-assay. The optimized micro-assay was significantly more sensitive in all of the twenty examined isolates during *Trichoderma* spp.  $\beta$ -1,3-glucanase screening. We conclude that this modified and optimized method is more convenient, faster, cheaper and more reproducible than the traditional tube-assay.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.