



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

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE DE UMA PROTEÍNA
ELICITORA DE DEFESA DE *Trichoderma spp.***

RACHEL SILVEIRA FREITAS

GOIÂNIA - 2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

F866i Freitas, Rachel Silveira.
Identificação, caracterização molecular e avaliação da expressão do gene de uma proteína elicitora de defesa de *Trichoderma* spp. [manuscrito] / Rachel Silveira Freitas. - 2011.
61 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa; Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Ferreira Noronha.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, 2011.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras e tabelas.

1. *Trichoderma* spp. 2. Proteína elicitora 3. Resposta de defesa I. Título.

CDU: 582.28

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

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE DE UMA PROTEÍNA
ELICITORA DE DEFESA DE *Trichoderma spp.***

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

Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

GOIÂNIA – 2011

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: [x] **Dissertação** [] **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Rachel Silveira Freitas		
E-mail:	rachellsilveira@yahoo.com.br		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	[x]Sim	[] Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:GO	CNPJ:
Título:	Identificação, caracterização molecular e avaliação da expressão do gene de uma proteína elicitora de defesa de <i>Trichoderma</i> spp.		
Palavras-chave:	<i>Trichoderma</i> spp., proteína elicitora, resposta de defesa, análise de expressão		
Título em outra língua:	Identification, molecular characterization and evaluation of gene expression of a defense elicitors protein of <i>Trichoderma</i> spp.		
Palavras-chave em outra língua:	<i>Trichoderma</i> spp., elicitors protein, defense response, expression analysis		
Área de concentração:	Biologia Molecular		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	30/06/2011		
Programa de Pós-Graduação:	Programa de Pós Graduação em Biologia		
Orientador (a):	Prof. Dr. Cirano José Ulhoa		
E-mail:	ulhoa@icb.ufg.br		
Co-orientador (a):*	Prof ^a . Dr ^a . Eliane Ferreira Noronha		
E-mail:	elinoronha@gmail.com		

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ [x] total [] parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

[] Capítulos. Especifique: _____

[] Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

_____ Data: ____ / ____ / ____

Assinatura do (a) autor (a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

BANCA EXAMINADORA

Titulares:

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

Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Sousa – Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus – Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Goiás.

Suplentes:

Prof. Dra. Fabrícia Paula de Faria – Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dr. Clayton Luiz Borges – Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Goiás.

"Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós"

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar a oportunidade dessa existência, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao meu orientador professor Cirano José Ulhoa, por acreditar em mim, e me mostrar o caminho da ciência, por ser exemplo de profissional e de caráter. Por fazer parte da minha vida.

À minha família a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.

Ao meu pai pela a educação, princípios, pelo afeto e dedicação para que escrevesse sem medo minha história de vida.

À minha mãe por ser o refúgio nos momentos difíceis, a melhor amiga nos momentos de alegria, a mais sábia nos momentos de dúvida, por ter sempre uma palavra de conforto e incentivo e pelos diversos sacrifícios suportados.

Ao meu irmão e cunhada Cláudia, pelo apoio e compreensão inestimáveis e pelo constante encorajamento.

Aos meus avós, Chico e Nana que nessa caminhada me acolheram tornando-se mais que avós, dividiram com meus pais, não só a responsabilidade da minha manutenção, mas a de prover o apoio, o carinho e o ombro amigo nas horas de aflição. Ao meu namorado Leandro por ter sido companheiro e compreensivo nesse momento da minha vida. Pelo amor e estímulo constante.

À professora Eliane Ferreira Noronha por sua ajuda nos momentos mais críticos, por acreditar no futuro deste projeto e contribuir para o meu crescimento profissional e por ser também um exemplo a ser seguido. Sua participação foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos amigos que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando.

Aos amigos Amanda Araújo, Valdirene, Fabiano, Amanda Rafaela, Rogério, Vanessa, Pabline, Renata, Cristine, Carol e João Paulo, que sempre estiveram do meu lado dando força e apoio.

Em especial aos amigos de laboratório, Saulo, Andrey, Marcelo e Patrícia que participaram diretamente deste trabalho e me ajudaram em todos os momentos.

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, me presentearam com suas presenças afetivas em momentos inesquecíveis, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigado!

RESUMO

Espécies do gênero *Trichoderma* têm sido utilizadas como agentes de controle biológico contra diferentes tipos de fitopatógenos. Os mecanismos utilizados pelas espécies de *Trichoderma* contra esses fitopatógenos vão desde a competição por nutrientes, produção de antibióticos voláteis e não voláteis à produção de enzimas hidrolíticas, em um mecanismo denominado micoparasitismo. Em adição a estas características, muitas linhagens de *Trichoderma* são rizosfera competentes e são capazes de colonizar e crescer em associação com as raízes das plantas. A colonização da raiz pelo *Trichoderma* spp., frequentemente, é associada com a indução de resistência local e sistêmica. Considerando que fungos do gênero *Trichoderma* já foram descritos como indutores de resposta de defesa e resistência sistêmica em associação com milho (*Zea mays*), pepineiro, tomateiro e algodoeiro, foi nosso interesse analisar a interação entre *Trichoderma* spp., e feijoeiro. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo identificar e avaliar a expressão do gene de uma proteína elicitadora de defesa (*Sm1*) em diferentes isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de solos do Cerrado. Oito isolados foram selecionados e todos apresentaram uma banda de aproximadamente 250pb, correspondendo ao tamanho esperado do gene *Sm1* de *T. virens*. A seqüência completa do gene da *Sm1* foi obtida utilizando como molde cDNA e DNA genômico de *T. harzianum*. Os produtos da amplificação contém uma ORF de 417 pb e a proteína predita a partir dessa seqüência tem 138 aminoácidos. Esta ORF apresentou identidade com seqüência de proteínas elicitoras de outros isolados de *Trichoderma* spp. e também com proteínas pertencentes a família das ceratoplataninas. Estudos de expressão da *Sm1* com isolado *Trichoderma* 37 mostrou que esta proteína é expressa em diferentes fontes de carbono.

Palavras-Chave: *Trichoderma* spp., proteína elicitadora, resposta de defesa, análise de expressão.

ABSTRACT

Species of the genus *Trichoderma* have been used as biocontrol agents against different pathogens. The mechanisms employed by *Trichoderma* species against these pathogens ranging from competition for nutrients, production of non-volatile and volatile antibiotics in the production of hydrolytic enzymes, in a mechanism denominated mycoparasitism. In addition to its characteristics, many strains of *Trichoderma* are competent rhizosphere are able to colonize and grow in association with plant roots. The root colonization by *Trichoderma spp.*, often is associated with the induction of local and systemic resistance. Whereas fungi of the genus *Trichoderma* have been described as inducers of defense responses and systemic resistance in association with maize (*Zea mays*), cucumber, tomato and cotton, it was our interest to analyze the interaction between *Trichoderma spp.* and beans. Therefore, this study aimed to identify and evaluate gene expression of protein elicitors of defense (SM1) in different isolates of *Trichoderma spp.* obtained from Cerrado soils. Eight isolates were selected and all showed a band of approximately 250pb, corresponding to the expected size of the gene *Sm1* from *T. Virens*. The complete sequence of SM1 gene was obtained using as template cDNA and genomic DNA of *T. harzianum*. The amplification products containing an ORF of 417 bp and the protein predicted from this sequence has 138 amino acids. The ORF showed identity with sequences of other protein elicitors isolated from *Trichoderma spp.*, and also proteins belonging to the family of cerato-platanin. Studies of the expression of SM1 with the isolate *Trichoderma 37* showed that this protein is expressed in different carbon sources.

Keywords: *Trichoderma spp.*, elicitors protein, defense response, expression analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Análise dos produtos da reação de transcrição reversa e amplificação em gel de agarose a 1,5%, utilizando cDNA de isolados de <i>Trichoderma</i> como molde e primers da Tabela 3 dos materiais métodos.....	28
Figura 2	Análise dos produtos da reação de amplificação em gel de agarose a 1,5%, utilizando cDNA e DNA genômico do isolado de <i>Trichoderma harzianum</i> (37) como molde e primers da Tabela 3 dos materiais e métodos.....	29
Figura 3	Sequência completa da proteína elicitora da defesa de <i>T. harzianum</i> (isolado 37).....	30
Figura 4	Alinhamento múltiplo de sequências preditas de proteínas elicitoras de defesa de espécies de <i>Trichoderma</i> e uma ceratoplatanina de <i>Phaeosphaeria nodorum</i>	33
Figura 5	Análise da expressão do gene de uma proteína elicitora em isolados de <i>Trichoderma spp.</i> em diferentes condições de crescimento utilizando qRT-PCR.....	34
Figura 6	Gráfico de qRT-PCR representando os níveis de expressão do gene de uma proteína elicitora de <i>T. harzianum</i> (37) quando crescido em meio líquido contendo 1,5% de diferentes fontes de carbono.....	35
Figura 7	Gráfico de qRT-PCR representando os níveis de expressão do gene de uma proteína elicitora de <i>T. harzianum</i> (37) quando crescido em meio líquido contendo 1,5% de diferentes fontes de carbono.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Evidências da indução de resistência em plantas por espécies de <i>Trichoderma</i>	11
Tabela 2	Lista de isolados utilizados e suas respectivas áreas de coleta.....	20
Tabela 3	Oligonucleotídeos utilizados na amplificação de DNA genômico e cDNA de <i>Trichoderma spp.</i>	21
Tabela 4	Oligonucleotídeos utilizados na qRT-PCR.....	27
Tabela 5	Identidade da proteína elicitora de <i>T. harzianum</i> com outras proteínas pertencentes à família das ceratoplataninas.....	31

SUMÁRIO

1. Introdução	3
1.1. Controle biológico.....	4
1.2. Indução de resposta de defesa em plantas hospedeiras	7
1.3. Resistência Sistêmica Adquirida	7
1.4. Resistência Sistêmica Induzida	8
1.5. Interação <i>Trichoderma spp.</i> - plantas hospedeiras	10
2. OBJETIVO GERAL.....	18
2.1. Objetivos específicos.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Manutenção e cultivo dos fungos	19
3.2. Condições de crescimento.....	20
3.3. Obtenção do gene de uma proteína elicitora	21
3.3.1. Extração de RNA total	22
3.3.2. Síntese de cDNA.....	22
3.3.3. Extração DNA	23
3.3.4. Amplificação do gene da proteína elicitora de defesa por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	23
3.4. Clonagem e sequenciamento do gene e cDNA da proteína elicitora de defesa de <i>T. harzianum</i> ...	24

3.4.1. Ligação do produto de amplificação ao vetor de clonagem	24
3.4.2. Transformação de bactéria	24
3.4.3. Preparação do DNA plasmidial para sequenciamento.....	25
3.5. Sequenciamento e análise da sequência	25
3.6. Análise de expressão por PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Detecção do transcrito do gene de uma proteína elicitora em isolados de <i>Trichoderma</i> spp. de solo do Cerrado	28
4.2. Amplificação da sequência completa do gene da proteína elicitora de defesa de <i>T.harzianum</i>	29
4.3. Avaliação da expressão do gene da proteína elicitora de defesa em diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	33
4.4. Avaliação da expressão do gene da proteína elicitora de defesa de <i>Trichoderma harzianum</i> (37) crescido em diferentes fontes de carbono	35
5. CONCLUSÃO	38
6. PERSPECTIVAS.....	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o grão de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é considerado como o alimento básico de maior importância, principalmente pelo fato de ser uma das principais fontes de proteína e energia. Sendo, portanto, a leguminosa mais consumida diretamente na alimentação dos brasileiros (OLIVEIRA, 2005).

Segundo dados do IBGE (2008), apesar de ser cultivada em todo o território nacional, seis estados se destacam na produção dessa leguminosa: 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 registrada em 2010, considerando-se as três safras do produto, foi de 3.223.074 toneladas, 8,5% abaixo da observada em 2009 (IBGE, 2010). De uma maneira geral, a diminuição na produção deste grão se deve à má qualidade das sementes utilizadas e a suscetibilidade desta cultura a doenças, que afetam a produtividade e reduzem o valor comercial do produto.

Parte das perdas em lavouras brasileiras se deve à ocorrência de 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 patógenos de solo como *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* causam perdas na produção de culturas suscetíveis, principalmente feijão e batata, cultivados no Cerrado (HALL & NASSER, 1996; CAFÉ FILHO & LOBO JR., 2000), e são reconhecidos como um dos maiores desafios para a cultura brasileira (LOBO JR., 2002).

A estratégia mais utilizada no controle destes fitopatógenos é realizada através da aplicação de fungicidas químicos; um processo eficiente, mas oneroso para os produtores agrícolas, tóxicos ao homem e extremamente poluente. Além disso, leva à seleção de patógenos resistentes e ao surgimento de pragas secundárias (PIRES et al., 2003). Outra desvantagem do 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).

Devido à pressão imposta pelas leis brasileiras de impacto ambiental, a crescente preocupação da população com o meio ambiente e saúde, bem como pela necessidade do desenvolvimento de métodos de controle mais eficientes, surgiu a demanda por novas estratégias neste controle (FRIGHETTO, 2000). Uma das alternativas a este tipo de controle é a utilização de microrganismos com ação antagonista aos fitopatógenos, em um processo denominado controle biológico.

1.1. Controle biológico

O controle biológico consiste no uso de organismos vivos para diminuir a densidade populacional ou o impacto de um organismo patogênico específico, tornando-o menos abundante ou menos prejudicial quando comparado à sua ação na ausência do agente biocontrolador (EILENBERG, 2006). Dos microrganismos utilizados como antagonistas para o controle de fungos fitopatogênicos, 90% correspondem a diferentes isolados de *Trichoderma spp.* (BÉNITEZ et al., 2004).

O gênero *Trichoderma* (Ascomycetes, Hypocreales) foi descrito por Persoon (1794) há mais de 200 anos (RIFAI, 1969) e compreende um grupo de fungos filamentosos anamorfos, heterocarióticos, saprófitas de solo habitantes de matéria orgânica e árvores em decomposição (SAMUELS, 1996; GAMS & BISSET, 1998). As espécies que possuem reprodução sexuada (fase teleomórfica) fazem parte do gênero *Hypocrea* e são geralmente encontrados em troncos de árvores e plantas herbáceas.

Os mecanismos gerais de biocontrole das espécies de *Trichoderma* podem ser divididos em efeitos diretos e/ou indiretos. Efeitos diretos incluem competição por nutrientes ou espaço, produção de antibióticos voláteis e não voláteis e enzimas líticas, inativação de enzimas dos patógenos e parasitismo. Os efeitos indiretos incluem todos os aspectos que produzem mudanças morfológicas e bioquímicas na planta hospedeira, tais como tolerância ao estresse, solubilização ou sequestro de nutrientes inorgânicos e indução de resposta de defesa a doenças causadas por fitopatógenos (VITERBO et al., 2002). Apesar dessa divisão, os diferentes mecanismos podem ocorrer concomitantemente ou com ação sinérgica.

A indução de resposta de defesa e resistência em plantas hospedeiras é considerada de importância primária se comparada a outros mecanismos. Entretanto, estes mecanismos são pouco estudados para espécies de *Trichoderma*, uma vez que as pesquisas relacionadas à bioquímica e biologia molecular destes fungos estão focadas em fatores que estão associados com efeito direto sobre o fungo fitopatogênico, como o micoparasitismo e antibiose (HARMAN et al., 2004).

Trabalhos mais recentes buscando o entendimento da interação *Trichoderma spp./planta* hospedeira, têm demonstrado que os fungos do gênero *Trichoderma* são capazes de colonizar as raízes das plantas hospedeiras. Algumas linhagens de *Trichoderma spp.* são capazes, ainda, de estabelecer uma duradoura colonização na raiz da planta e penetrar em sua epiderme. Uma vez em íntimo contato com a planta hospedeira, estes fungos são capazes de produzir e liberar compostos elicitores de defesa que induzem resistência local e sistêmica na planta (BENÍTEZ et al., 2004). Desta forma, a planta hospedeira pode reagir à invasão fúngica iniciando uma séria de mudanças bioquímicas e morfológicas, tais como: síntese e acúmulo de fitoalexinas, flavonóides, terpenóides, dentre outros compostos antimicrobianos. Linhagens de *Trichoderma spp.* são geralmente mais resistentes a estes compostos do que outros fungos, e essa habilidade de colonizar a raiz da planta hospedeira depende diretamente da sua capacidade de tolerar esses compostos.

Estes novos dados referentes à interação *Trichoderma spp./planta* hospedeira abrem uma ampla gama de novas aplicações, tanto na agricultura quanto na biotecnologia, que exploram a habilidade deste fungo mudar o metabolismo da planta e a resposta desta diante de diferentes patógenos (WOO et al., 2006). Além disso, o claro entendimento dos mecanismos utilizados por este gênero na interação com plantas hospedeiras e outros microrganismos, possibilitará o desenvolvimento de estratégias eficientes e mais adequadas para o isolamento e melhoramento de linhagens de agentes de biocontrole (HARMAN, 2006).

1.2. Indução de resposta de defesa em plantas hospedeiras

As plantas podem ser induzidas a responder a uma infecção de forma local ou sistêmica e, desta forma, se tornar mais resistentes a novas infecções, após sofrerem algum tipo de estresse desencadeado por fator biótico ou abiótico. A indução de resposta de defesa e resistência pode ser desencadeada por compostos químicos ou por injúria, assim como por indutores biológicos que incluem patógenos necrozantes, microrganismos não-patogênicos e bactérias colonizadoras da raiz (OOSTENDORP et al., 2001).

A indução da resposta de defesa e resistência a um determinado patógeno não é o surgimento de resistência em uma planta que não possuía essa capacidade e, sim, a ativação de mecanismos de resistência latentes na planta hospedeira. Existem plantas mais resistentes ou suscetíveis a determinadas doenças e sua capacidade de sobreviver está relacionada com a ativação de diferentes respostas de defesa, sendo que esta resposta pode ocorrer através de dois mecanismos principais: Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) e Resistência Sistêmica Induzida (RSI)

1.3. Resistência Sistêmica Adquirida

A resposta desencadeada pela presença do patógeno é denominada Resistência Sistêmica Adquirida (RSA), sendo caracterizada pela síntese/acúmulo de ácido salicílico (AS) e concomitante aumento da expressão de genes codificadores de proteínas relacionadas à patogênese (PRs) (VAN LOON et al., 1998; PIETERSE et al., 1998; DE MEYER et al., 1998).

Dentre as proteínas expressas e secretadas podem-se citar as β -1,3 glicanases e quitinases, enzimas envolvidas na degradação da parede celular

do fitopatógeno. Outras destas proteínas não possuem sua função bem caracterizada ou sua função é, ainda, completamente desconhecida.

O papel do ácido salicílico na indução da resistência sistêmica adquirida foi demonstrado pela análise da resposta de defesa em plantas de tabaco transformadas com o gene bacteriano *nahG*. Este gene codifica a salicilato hidroxilase que catalisa a conversão do ácido salicílico em catecol, prevenindo desta forma, o seu acúmulo. As plantas transformadas com este gene, portanto, não acumularam ácido salicílico ou proteínas relacionadas a patogênese e, conseqüentemente, não desenvolveram a resposta sistêmica adquirida, em resposta ao ataque do patógenos (GAFFNEY et al., 1993). Demonstrando, assim, que o ácido salicílico é uma molécula sinalizadora fundamental para o desencadeamento da resistência sistêmica adquirida (VAN LOON et al., 1998).

1.4. Resistência Sistêmica Induzida

A RSA em plantas é bem estudada e entendida, e se caracteriza pela capacidade da planta hospedeira em responder de forma sistêmica ao contato com um agente fitopatogênico. Entretanto, ainda se sabe pouco sobre a indução de resistência sistêmica desencadeada por microrganismos não patogênicos. Nesse caso, o processo é similar a RSA, entretanto é chamado de Resistência Sistêmica Induzida (RSI), pois diferentes vias de sinalização, independentes de ácido salicílico estão envolvidas (DE MEYER et al., 1998).

Plantas transformadas com o gene *nahG*, também foram utilizadas na descoberta de vias de sinalização de defesa independentes de ácido salicílico (PIETERCE et al., 1998). Estas descobertas são sustentadas por uma

série de experimentos que demonstram várias respostas de defesa que podem ser ativadas sem o aumento no nível de ácido salicílico. Nesse contexto, o Ácido Jasmônico (AJ) e o etileno surgem como importantes moléculas sinalizadoras nessa via de sinalização alternativa.

Na via de sinalização para ativação da resposta sistêmica induzida, são liberados componentes em resposta ao acúmulo de ácido jasmônico e etileno que agem em sequência ativando uma resposta sistêmica de resistência que, como a resposta desencadeada por um organismo patogênico (RSA) é dependente da ativação do gene *npr1* de uma proteína reguladora.

A resistência sistêmica, induzida por microrganismos que vivem na rizosfera do hospedeiro, tem sido demonstrada para várias espécies de plantas e é eficiente em defendê-las contra o ataque de diferentes fitopatógenos, dentre eles bactérias, fungos e vírus (YEDIDIA et al., 2003).

A existência de uma via de sinalização independente de ácido salicílico e ativada pela presença de microrganismos não patogênicos é claramente demonstrada em *Arabidopsis* (PIETERCE et al., 1998). Em *Arabidopsis*, após o tratamento da raiz com a rizobactéria *Pseudomonas fluorescens*, uma sequência de eventos de sinalização na via RSI levou a planta a resistir ao ataque do patógeno bacteriano *Pseudomonas Syringae*. Ao contrário da clássica indução sistêmica adquirida, essa indução de resistência mediada por rizobactérias é independente do acúmulo de ácido salicílico e da ativação de genes relacionados à patogênese.

As rizobactérias estão presentes em grande quantidade na superfície das raízes das plantas. Certas cepas dessas bactérias são conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento na planta (PGPR),

pois sua aplicação pode estimular o crescimento e aumentar a resistência da planta em condições de stress (VAN LOON et al., 1998).

1.5. Interação *Trichoderma spp.* - plantas hospedeiras

Assim como descrito para rizobactérias, fungos do gênero *Trichoderma* têm sido estudados como indutores de resposta de defesa e consequentemente de resistência em plantas hospedeiras (DJONOVIC et al., 2006; WOO et al., 2006). A indução de defesa e resistência em plantas hospedeiras já foi descrita para as espécies *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma asperellum* e *Hypocrea atroviridis* em associação com tomateiro, pepino, algodoeiro e milho (HANSON & HOWELL, 2004). Esses fungos colonizam as raízes das plantas hospedeiras e, uma vez em íntimo contato, secretam proteínas elicitoras que podem levar a planta à resposta hipersensitiva e a outras alterações relacionadas à defesa em plantas.

A primeira clara demonstração de indução de resposta de defesa e resistência a doenças em plantas por fungos do gênero *Trichoderma* foi publicada em 1997 por BIGIRIMANA e colaboradores. Eles demonstraram que uma linhagem de *T. harzianum* reduziu a incidência da doença causada pelo fungo patogênico *Colletotrichum linde muthianum* na folhas de feijoeiro comum. Nesse experimento o *T. harzianum* foi aplicado na raiz do feijoeiro e não nas folhagens. Estudos similares a esse têm sido realizados com diferentes plantas, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas, cultivadas na presença de diferentes espécies e linhagens de *Trichoderma* (HARMAN et al., 2004). Alguns exemplos dessa interação estão exemplificados na Tabela 1.

Tabela 1. Evidências da indução de resistência em plantas por espécies de *Trichoderma*.
Fonte: Harman et al. (2004).

Espécies e linhagens	Planta	Patógeno	Evidências ou efeitos	Tempo depois da aplicação	Eficácia	Referência
<i>T. virens</i> G-6, G-6-5 e G-11	Algodão	<i>Rhizoctonia solani</i>	Proteção das plantas; indução de fitoalexinas	4 dias	78% de redução na doença; habilidade em induzir fitoalexinas requeridas para a máxima atividade biocontroladora	HOWELL et al., 2000
<i>T. harzianum</i> T-39	Feijão	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> <i>Botrytis cinérea</i>	Proteção das folhas quando T-39 estava presente só na raiz	10 dias	42% de redução nas áreas de lesão; redução no número de lesões espalhadas	BIGIRIMAN A et al., 1997
<i>T. harzianum</i> T-39	Tomate, pimenta, tabaco, alface, feijão	<i>Botrytis cinérea</i>	Proteção das folhas quando T-39 estava presente só na raiz	7 dias	25-100% de redução nos sintomas da podridão cinzenta	DE MEYER et al., 1998
<i>T. asperellum</i> T-203	Pepino	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. lachrymans	Proteção das folhas quando T-203 estava presente só nas raízes; produção de compostos antifúngicos nas folhas	5 dias	Mais de 80% de redução da doença nas folhas; redução no nível de células patogênicas bacterianas nas folhas	YEDIDIA et al., 2003
<i>T. harzianum</i> T-22; <i>Trichoderma atroviride</i> P1	Feijão	<i>B. cynerea</i> e <i>Xanthomonas campestris</i> pv. phaseoli	Proteção das folhas quando T-22 ou P1 estava presente só na raiz; produção de compostos antifúngicos nas folhas	7-10 dias	69% de redução nos sintomas da podridão cinzenta (<i>B. cinerea</i>) com T-22; menor nível de controle com P1 54% de redução nos sintomas de doença bacteriana	M.L., Observações não publicadas
<i>T. harzianum</i> T-1 e T-22; <i>T. virens</i> T3	Pepino	Vírus do mosaico	Proteção das folhas quando as linhagens de <i>Trichoderma</i> estavam presentes só na raiz	7 dias	Indução na redução da doença e crescimento eliminado	LO et al., 2000
<i>T. harzianum</i> T-22	Tomate	<i>Alternaria solani</i>	Proteção das folhas quando T-22 estava presente só na raiz	3 meses	Mais de 80% de redução nos primeiros sintomas da infecção em campo natural	SEAMAN, 2003
<i>T. harzianum</i> T-22	Milho	<i>Colletotrichum graminicola</i>	Proteção das folhas quando a linhagem de <i>Trichoderma</i> estava presente só na raiz	14 dias	44% de redução no tamanho das lesões nas folhas feridas; nenhuma doença nas folhas não feridas.	HARMAN et al., 2004

<i>Trichoderma</i> GT3-2	Pepino	<i>C. orbiculare</i> <i>P. syringae</i> pv. <i>Lachrymans</i>	Proteção das folhas quando a linhagem de <i>Trichoderma</i> estava presente só na raiz; indução de lignificação e geração de superóxido	1 dia	59% e 52% de proteção contra doença causada por <i>C. orbiculare</i> ou <i>P. syringae</i> , respectivamente	KOIKE et al., 2001
<i>T. harzianum</i>	Pimenta	<i>Phytophthora capsici</i>	Proteção dos caules quando a linhagem de <i>Trichoderma</i> estava presente só na raiz; aumento na produção de capsidiol fitoalexinas	9 dias	40% de redução na extensão das lesões	AHMED et al., 2000
<i>T. harzianum</i> NF-9	Arroz	<i>Magnaporthe grisea</i> ; <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>Oryzae</i>	Proteção das folhas quando NF-9 estava presente só na raiz	14 dias	34-50% de redução na doença	TONG XU, observações não publicadas

HARMAN e colaboradores (2004) descreveram três diferentes classes de compostos produzidos por fungos do gênero *Trichoderma* que induzem resposta de defesa e resistência em plantas: proteínas com função enzimática ou outra função, proteínas homólogas a proteínas codificadas por genes Avr e oligossacarídeos ou compostos de baixa massa molecular liberados da parede celular do fungo ou da planta pela ação de hidrolases produzidas pelo *Trichoderma spp.*.

Na primeira classe de compostos está presente uma xilanase de 22 KDa que é secretada por diferentes linhagens de *Trichoderma spp.* e que tem demonstrado uma grande eficiência em induzir a produção de etileno e resposta de defesa (LOTAN & FLUHR, 1990). Mais recentemente, uma série de proteínas e peptídeos produzidos por uma linhagem de *T. virens*, se mostrou capaz de induzir a síntese de fitoalexinas e a atividade de peroxidases em mudas de algodão (HANSON & HOWELL, 2004).

As proteínas codificadas por genes *avr* têm sido identificadas em uma variedade de fungos e bactérias fitopatogênicas. Elas usualmente funcionam como elicitores capazes de desencadear resposta hipersensitiva e outras reações de defesa em diferentes plantas que contêm o respectivo gene de resistência (BAKER et al., 1997). Fungos do gênero *Trichoderma* são capazes de sintetizar proteínas homólogas às proteínas codificadas por esses genes e também desencadear resposta de defesa e resistência na planta hospedeira.

A terceira classe de compostos elicitores produzidos por *Trichoderma spp.* é formada por moléculas bioativas liberadas pela ação de enzimas produzidas por esses fungos e capazes de degradar a parede celular da planta hospedeira ou do fungo fitopatogênico. Essas moléculas funcionam como indutores da expressão de genes do *Trichoderma spp.* relacionados ao micoparasitismo e algumas, também, podem funcionar como elicitoras de resposta de defesa e resistência sistêmica na planta (WOO et al., 2003; KUBICEK et al., 2001).

DJONOVIC e colaboradores (2006) identificaram, purificaram e caracterizaram uma pequena proteína elicitora de defesa secretada por *Trichoderma virens*, denominada Sm1. A análise da sequência de aminoácidos predita dessa proteína mostrou que a mesma apresenta grande similaridade com proteínas pertencentes à família das ceratoplataninas. Essa família é constituída principalmente de proteínas produzidas por patógenos humanos e de plantas sendo associadas à sua toxicidade e processos infecciosos. A Sm1 purificada, levou a planta hospedeira à expressão sistêmica aumentada de quitinase (CHT), β 1-3 glicanase (GLU), peroxidase (POD6), hidroximetilglutaril

CoA redutase (HMG) e lipoxigenase, todas proteínas relacionadas a resposta de defesa. Além disso, apresentaram um acúmulo de peróxido de hidrogênio e de compostos fenólicos em seus cotilédones. Os cotilédones de algodão foram, ainda, tratados com a Sm1 (0,5 nmol/cotilédone) e então inoculados com o fungo patogênico *Colletotrichum sp.* Quase nenhuma lesão foi observada nas plantas que tiveram seus cotilédones previamente tratados com a proteína, ficando evidente que a Sm1 foi capaz de proteger a planta contra a doença fúngica (DJONOVIC et al., 2006).

Ainda da interação *Trichoderma virens* – algodoeiro, plantas de algodão quando cultivadas na presença do agente de biocontrole *Trichoderma virens* foram menos suscetíveis ao fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani*, e nesta situação apresentam um aumento na síntese de compostos terpenóides e de peroxidases. (HOWELL et al., 2000). Os efeitos do tratamento de sementes com isolados de *Trichoderma spp.* também foram observados em estudos desenvolvidos por HARMAN e colaboradores (2004). Mudanças de milho linhagem Mo17 que tiveram suas sementes tratadas com *T. harzianum* (T-22) e que posteriormente suas folhas foram inoculadas com *Colletotrichum graminicola*, apresentaram redução nos sintomas da antracnose se comparadas aos controles. Essas observações indicam que a colonização da raiz pelo isolado T-22 induziu resistência sistêmica nas mudas de milho.

Outra proteína elicitora de defesa, denominada Epl1 foi identificada como maior componente do secretoma de *Hypocrea atroviridis* (SEIDL et al., 2006). A análise da sequência desta proteína revelou ser uma proteína homóloga à Sm1 (VARGAS et al., 2008) e, também, membro da família das ceratoplataninas.

Resultados semelhantes aos acima citados, também já foram observados na interação *Trichoderma asperellum*/*Pseudomonas syringae*/pepineiro. Nesse estudo, as raízes das plantas de pepino foram incubadas com *T. asperellum* utilizando-se um sistema hidropônico de cultivo. Posteriormente, as folhas das plantas foram inoculadas com *P. syringae* pv. lachrymans. Quatro dias depois de inoculada a bactéria, as plantas que não foram previamente induzidas com *T. asperellum*, apresentaram uma ampla disseminação de lesões necróticas, enquanto que as plantas pré-tratadas com *T. asperellum*, mostraram sintomas significativamente menores. Houve também, uma maior expressão dos genes da fenilalanina amônia liase (PAL) e hidroperóxido liase (HPL) nas plantas previamente inoculadas com *T. asperellum*. Esta situação foi ainda sustentada pelo acúmulo de metabólitos secundários de natureza fenólica (YEDIDIA et al., 2003).

Na interação *T. harzianum* T39/feijoeiro (DE MEYER et al., 1998), foram feitas observações semelhantes às anteriores. O tratamento prévio da raiz ou das primeiras folhas do feijoeiro reduziu significativamente o diâmetro total das lesões causadas pelo fungo necrofítico *Botrytis cinerea*.

A capacidade de induzir resistência contra uma variedade de doenças causadas por vários grupos de fitopatógenos, dentre eles fungos, bactérias e vírus, em várias plantas, tem - se mostrado generalizada no gênero *Trichoderma*. Entretanto, muito mais precisa ser entendido sobre as moléculas desencadeadoras dessa resposta e os sistemas envolvidos.

Algumas mudanças bioquímicas e estruturais decorrentes da interação *Trichoderma* spp./ planta hospedeira já são bem compreendidas. Dentre elas a deposição aumentada de parede celular (calose), bem como o

aumento da atividade/expressão de enzimas como peroxidases, quitinases, glicanases e outras proteínas relacionadas a patogênese (YEDIDIA et al., 1999; 2000). Além disso, nessa interação é observado um aumento na produção de compostos terpenóides relacionados à defesa da planta, e de produção de giberelinas e auxinas promovendo seu crescimento (WOO et al., 2006).

Um dos mecanismos melhor estudado e compreendido de resistência em plantas é o rápido acúmulo de metabólitos antimicrobianos como as fitoalexinas (YEDIDIA et al., 2003). A síntese de fitoalexinas envolve a rápida ativação transcricional de genes codificadores de enzimas que são chave na biosíntese desses compostos. A fenilalanina amônia liase (PAL) catalisa a primeira etapa na via biosintética de fenilpropanoides que são os principais precursores para a formação de uma ampla gama de compostos antimicrobianos.

Essas novas descobertas estão mudando dramaticamente nosso conhecimento sobre os mecanismos de ação e o uso dos fungos do gênero *Trichoderma*.

Um crescente número de especialistas tem estudado a hipótese de que a indução de resistência sistêmica e não a capacidade antagônica é o mecanismo utilizado pela maioria das linhagens hoje comercializadas no mundo (WOO et al., 2006). Esse conceito é bastante atrativo uma vez que, muito ainda tem que ser descoberto sobre os genes e moléculas envolvidas nesse processo. Outro ponto importante nessa interação é que o efeito da indução de resistência sistêmica tem - se mostrado bastante dependente da combinação entre a linhagem de *Trichoderma spp.* e planta utilizada.

Dessa forma, este trabalho pode contribuir para a identificação e caracterização molecular do gene de uma proteína elicitora de defesa em isolados obtidos de solo do Cerrado, como também, para o entendimento da interação *Trichoderma harzianum* – feijoeiro.

2. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral a identificação, caracterização molecular e análise da expressão do gene codificador de uma proteína elicitora de defesa em isolados de *Trichoderma spp.* obtidos de solo do Cerrado, ainda não caracterizados quanto à capacidade de induzir resposta de defesa em feijoeiro.

2.1. Objetivos específicos

- Identificar isolados de *Trichoderma* de solo do Cerrado produtores de uma proteína elicitora de defesa;

- Obter a sequência gênica completa da proteína elicitora de defesa utilizando iniciadores desenhados com base na sequência do gene codificador da proteína Sm1 de *T. virens*.

- Sequenciar o produto da amplificação, analisar as sequências nucleotídica e da proteína predita;

- Analisar a expressão deste gene em isolados de *Trichoderma spp* de solos do Cerrado quando cultivados em meio de cultura contendo diferentes fontes de carbono.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Manutenção e cultivo dos fungos

Isolados de *Trichoderma spp.* de amostras de solo, coletados em diferentes regiões, áreas cultivadas e mata nativa no Brasil, foram gentilmente cedidos pela EMBRAPA – Arroz e Feijão – GO e mantidos em coleção no Laboratório de Enzimologia – UFG (Tabela 2). Os isolados foram cultivados em meio MYG (0,5% de extrato de malte, 0,25% de extrato de levedura, 1% de glicose e 2% de ágar) e uma solução de esporos foi feita, utilizando-se 50% de solução salina (NaCl 0,9%) e 50% de glicerol. Essa solução foi armazenada em freezer -80°C e foi usada para cultivos posteriores. Dessa coleção foram selecionados oito isolados coletados de áreas de Cerrado, levando em conta aqueles que apresentaram taxas significativas de inibição do crescimento do fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*, de produção de antibióticos, teste de inibição por pareamento de culturas, produção de quitinase, nagase, fosfatase, glicosidase, glicanase, protease e lipase. Cada isolado selecionado foi cultivado separadamente em placa contendo meio MYG e após esporulação foi feita nova solução de esporos com solução salina (NaCl 0,9%). Essa solução foi usada então, para posterior crescimento em meio líquido.

Tabela 2. Lista de isolados utilizados e suas respectivas áreas de coleta

Identificação EMBRAPA	Identificação laboratório de Enzimologia	Espécies	Cidades de coleta
T00	T00	<i>Trichoderma asperellum</i>	Desconhecida
17/06	1	<i>Trichoderma erinaceum</i>	Santo Antônio De Goiás – Go
475/02	37	<i>Trichoderma harzianum</i>	Formosa – Go
479/01	51	<i>Trichoderma harzianum</i>	
494/01	61	<i>Trichoderma harzianum</i>	Formosa – Go
483/02	70	<i>Trichoderma asperellum</i>	Formosa – Go
356/02	107	<i>Trichoderma asperellum</i>	Santo Antônio De Goiás – Go
364/01	111	<i>Trichoderma asperellum</i>	Santo Antônio De Goiás – Go

3.2. Condições de crescimento

Esporos (1×10^7 mL⁻¹) de *Trichoderma spp.* foram inoculados em frascos de 250 ml contendo 50 ml de meio TLE {CaCl₂ 0,1g L⁻¹, KH₂PO₄ 7,0 g L⁻¹, K₂HPO₄ 2,0 g L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 0,1 g L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,1 g L⁻¹, Bactopeptona g L⁻¹ e 0,1 mL de solução elementos traços}. Ao meio foi adicionado 1,5% de diferentes fontes de carbono (amido, celulose, frutose, galactose, glicose, lactose e sacarose) e outros substratos (Raiz de feijão macerada e sementes de feijão triturada). Os frascos foram incubados em

agitador rotatório à 28°C e 180 rpm. Após 24 ou 48 horas de cultivo, as culturas foram filtradas e os micélios utilizados para extração de DNA e RNA. As preparações de DNA e RNA, em seguida, foram utilizadas nas reações para obtenção do gene de uma proteína elicitora de defesa e na análise de sua expressão.

3.3. Obtenção do gene de uma proteína elicitora

Para detecção da presença do gene de uma proteína elicitora de defesa nos isolados em estudo, foram desenhados primers internos (RspF/RspR) de acordo com a sequência genômica de *T. virens* previamente publicada por DJONOVIC et al., (2006) e alinhada juntamente com outras sequências similares de *Trichoderma spp.* obtidas por alinhamento no programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) (Tabela 3). Os oligonucleotídeos (Sm1F/Sm1R), utilizados nos experimentos de PCR genômica e RT-PCR para obtenção do gene completo, também se encontram descritos na Tabela 3 e foram desenhados com base no mesmo alinhamento.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação de DNA genômico e cDNA de *Trichoderma spp.*

Característica	Sequência
Sequência sense – RspF	5'GCCAGATCCCTCGCTTCCCATACA 3'
Sequência antisense – RspR	5`CATGGCATCGAGCGCAATGTTGAA3`
Sequência sense – Sm1 F	5'ATGCAATTGTCCAACCTCTTC3'
Sequência antisense – Sm1 R	5'CTAGAGGCCGCGAGTTGCTC3'

3.3.1. Extração de RNA total

Para as extrações dos RNAs os micélios foram macerados com N₂ líquido em gral e pistilo até conseguir um pó fino. 100 mg desse pó foram ressuspensos em 1 ml de TRIzol (Invitrogen™), homogeneizados em vortex e incubado 5 minutos, à temperatura ambiente. Foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio, agitado por 15 segundos e incubado por 3 minutos à temperatura ambiente. Após isso, a amostra foi centrifugada a 12000 g por 15 minutos a 4 °C. Depois de centrifugada, a fase aquosa foi transferida para um tubo com 0,25 ml de isopropanol e 0,25 mL de uma solução de citrato de sódio 0,8 M e NaCl 1,2 M para a precipitação do RNA e retirada de carboidratos e proteoglicanas. Após a precipitação por 15 minutos à temperatura ambiente e centrifugação por 10 minutos a 12000 g, removido o sobrenadante e lavado o pellet com 1 mL de etanol 75%, centrifugado a 7.500 rpm por 5 minutos a 4° C, retirado o sobrenadante e seco à temperatura ambiente por 10 minutos e ressuspensado em 50 µL de água RNase free. A quantificação foi feita por espectrofotometria pela relação das leituras à 260/280nm. O RNA foi, então, utilizado para síntese do cDNA e análise de expressão.

3.3.2. Síntese de cDNA

O RNA total extraído foi tratado com DNase I para a posterior síntese de cDNA, utilizando-se a metodologia de RT-PCR (Invitrogen® - SuperScript III™). O cDNA sintetizado foi utilizado para estudos de expressão utilizando-se PCR quantitativo em tempo real como também, para a amplificação do gene completo da proteína elicitora de defesa.

3.3.3. Extração DNA

O micélio do isolado 37 obtido como descrito no Item 3.2 foi congelado com nitrogênio líquido e macerado em almofariz até sua completa pulverização. Ao pó resultante foram acrescentados 0,8 ml do tampão de extração de DNA (Tris-HCl 100mM, NaCl 1,4 M, 0,02% β -mercaptoetanol, 10 μ l de RNase A e EDTA 5mM pH 8,0). Esta amostra foi mantida em banho-maria a 65 °C sob suave agitação durante 20 minutos e em seguida centrifugada a 12000 x g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e a este foram adicionados 0,4 ml de fenol equilibrado em tampão Tris-HCl, pH 8,0 e 0,4 ml da solução clorofórmio/álcool isoamílico (49:1) e centrifugado a 12000 x g por 10 minutos. Novamente 0,4 ml, de clorofórmio e álcool isoamílico (49:1) foram adicionados ao sobrenadante coletado e em seguida centrifugado a 12000 x g durante 15 minutos. Após a extração do sobrenadante, foi adicionado 0,8 ml de isopropanol e em seguida centrifugado a 12000 x g por 15 minutos. O *pellet* DNA foi lavado em solução de etanol 70% (v/v) e ressuspenso em 100 μ l de água estéril.

3.3.4. Amplificação do gene da proteína elicitora de defesa por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de amplificação foram realizadas utilizando-se como molde 10 ng de DNA de *T. harzianum* ou 2 μ L da reação de transcrição reversa, 0,2 mM de dNTPs, tampão da *Taq* DNA polimerase, 3 mM de cloreto de magnésio, 1U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas), 10 pmol de oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 3), em um volume final de reação de 30 a 50 μ L.

As reações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial (94°C – 2 min), 30 ciclos de desnaturação (94°C –1 min), anelamento (48°C – 1 min), extensão (72°C – 40 s) e extensão final (72°C – 5 min). As reações de PCR foram feitas com *Taq* DNA polimerase (Fermentas), de acordo com as recomendações do fabricante.

Os produtos obtidos da reação de amplificação de DNA genômico e de transcrição reversa utilizando mRNAs foram clonados em vetor pGEM® T-Easy-Promega e então submetidos a sequenciamento.

3.4. Clonagem e sequenciamento do gene e cDNA da proteína elicitora de defesa de *T. harzianum*

3.4.1. Ligação do produto de amplificação ao vetor de clonagem

O produto da reação de amplificação gene de uma proteína elicitora obtido por PCR a partir do DNA genômico e cDNA utilizando os primers iniciadores 5' e 3'(Sm1F- 5' ATGCAATTGTCCAACCTCTTC3'/Sm1R- 5'CTAGAGGCCGCGAGTTGCTC3'), foi clonado no vetor pGEM® T- Easy (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

3.4.2. Transformação de bactéria

Para transformação, o sistema de ligação foi adicionado a uma alíquota de células competentes (até 10% do volume de células) e incubados no gelo por 30 minutos. O sistema de transformação foi submetido ao choque térmico a 37°C, durante 5 minutos ou 42°C, durante 90 segundos. Em seguida foi adicionado 1 ml de meio LB [Peptona de caseína (10g/L); extrato de levedura (5g/L); NaCl (10g/L) e pH ajustado para 7,2] e as células incubadas

por 1 hora a 37°C. Um volume de 50 a 200 µL de células foram semeadas em placas de Petri meio LB-Ágar (Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a 15g/L) com ampicilina (100 µg/mL) e X-gal.

3.4.3. Preparação do DNA plasmidial para sequenciamento

Minipreparação – Inoculou-se uma colônia de bactérias em 5ml de meio LB contendo ampicilina (100 mg/mL). Esse inóculo foi incubado por 16 horas a 200 rpm a 37 °C. Um volume de 3mL de cultura foi centrifugado a 5.000 x *g* por 2 minutos, descartando-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuscitado em 200µL de solução TE [tris-HCl (pH 8,0) 10mM e EDTA 1mM pH 8.0], adicionou-se 200µL de Solução 2 [NaOH 0,2M e SDS 1% (p/v)], agitando-se o tubo por inversão. A seguir, foram adicionados 200µL de Solução 3 (Acetato de potássio 5M pH 4,8), misturado por inversão, incubado no gelo por 5 minutos e centrifugado a 10.000 x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 750µL de isopropanol. A solução foi homogeneizada por inversão e submetida a uma centrifugação a 10.000 x *g* durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 200µL de solução TE. O precipitado lavado (sem ressuspender) com 1ml de etanol 70%. Repetiu-se a centrifugação anterior e o excesso de álcool foi removido. O precipitado foi secado por 5 a 10 minutos e ressuscitado em 50µL de TE + RNAase A (1µL da solução estoque de RNAase 10mg/µL para cada 100µL de TE). (Sambrook & Russell, 2001).

3.5. Sequenciamento e análise da sequência

Para a reação de sequenciamento foi utilizado 1 µL do plasmídeo (250 ng) e seguido protocolo do kit DYEnamic ET terminator (GE healthcare)

modificado. A reação foi realizada utilizando-se 1 μ L do *master mix*, 2,5 pM de primer T7 para um volume final de 10 μ L. As amostras foram sequenciadas no aparelho ABI prisma 3100 (Applied Biosystems).

Para análise comparativa e preditiva da proteína, utilizando a sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência nucleotídica do gene da proteína elicitora, foram utilizados os programas BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) e ExpPASy (<http://expasy.org/>), respectivamente.

3.6. Análise de expressão por PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)

O RNA total extraído do micélio foi tratado com DNase I. Com RNA total (5 μ g) de cada grupo de amostras foi feita transcrição reversa em cDNA na presença de oligo(dT), em um volume final de reação de 20 μ l usando o Kit Revertaid™ First Strand cDNA synthesis (Fermentas). O cDNA sintetizado foi diluído em 80 μ l de água e usado como molde para as reações de PCR em tempo real. As reações foram feitas no iQ5 real-time PCR system (Bio-Rad). Cada reação (20 μ l) continha 10 μ l de MAXIMA® SYBR-green PCR Master mix (Fermentas), primers iniciadores 5' e 3' (500nM de cada)(tabela 4), cDNA como molde e água livre de nuclease. As condições de ciclagem foram: 10 minutos a 95°C (1 ciclo), 15 segundos a 95°C seguido por 1 minuto a 60°C (40 ciclos). Foi feita, também, a curva de melting nas seguintes condições: 1 minuto a 95°C, seguida por 30 segundos a 55°C e uma rampa final a 95°C com a coleta contínua de dados (1 ciclo) para observação da formação de dímeros de primers e amplificação não específica. Os transcritos de β -actina (HS576338) e α -tubulina (HS574101) foram usados com controles internos para normalização da quantidade do RNA total presente em cada reação. O nível de expressão

dos genes foi calculado de acordo com o C_t pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados na qRT-PCR.

Característica	Sequência
Sequência sense – Sm1 F	5'ACGACGACGGCTCCCGGTCT3'
Sequência antisense – Sm1 R	5'TCCGATGTATGGGAAGCGAGGG3'

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Detecção do transcrito do gene de uma proteína elicitora em isolados de *Trichoderma* spp. de solo do Cerrado

As preparações de cDNA dos isolados das espécies *T. harzianum* (37, 51 e 61), *T. asperellum* (T00, 71, 107 e 111) e *T. erinaceum* (1) obtidos de solos do Cerrado após a reação de amplificação, apresentaram uma banda de aproximadamente 250 bp, correspondente ao tamanho esperado do fragmento do gene da proteína elicitora de defesa, Sm1, em *T. virens*. Transcritos de proteínas elicitoras de defesa já foram detectados em diferentes espécies de *Trichoderma* em condições de cultivo “in vitro” e na interação com plantas hospedeiras. No entanto, não havia sido identificado para as espécies *Trichoderma* obtidos de solo de Cerrado, demonstrando o potencial de utilização destes isolados não só para o controle biológico de fungos fitopatogênicos, mas também na indução de resposta de defesa em planta hospedeira.

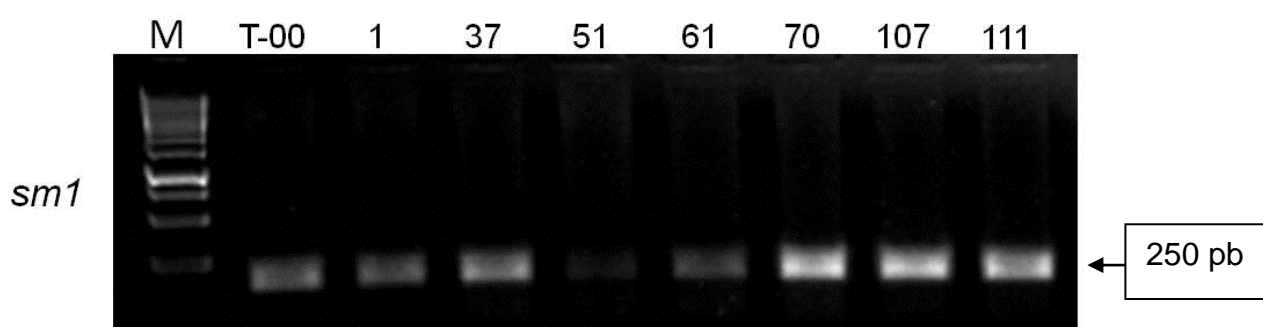


Figura 1. Análise dos produtos da reação de transcrição reversa e amplificação em gel de agarose a 1,5%, utilizando cDNA de isolados de *Trichoderma* como molde e primers da Tabela 3 dos materiais e métodos.

4.2. Amplificação da sequência completa do gene da proteína elicitora de defesa de *T.harzianum*

Para a obtenção do gene completo da proteína elicitora de defesa foi utilizado um novo par de primers (Tabela 3), desenhado com base na sequência completa do gene da proteína Sm1 e como molde cDNA proveniente da reação de RT-PCR e DNA genômico. Para ambos, foram obtidos produtos de amplificação de 417 bp que em seguida foram clonados e sequenciados (Figura 2).

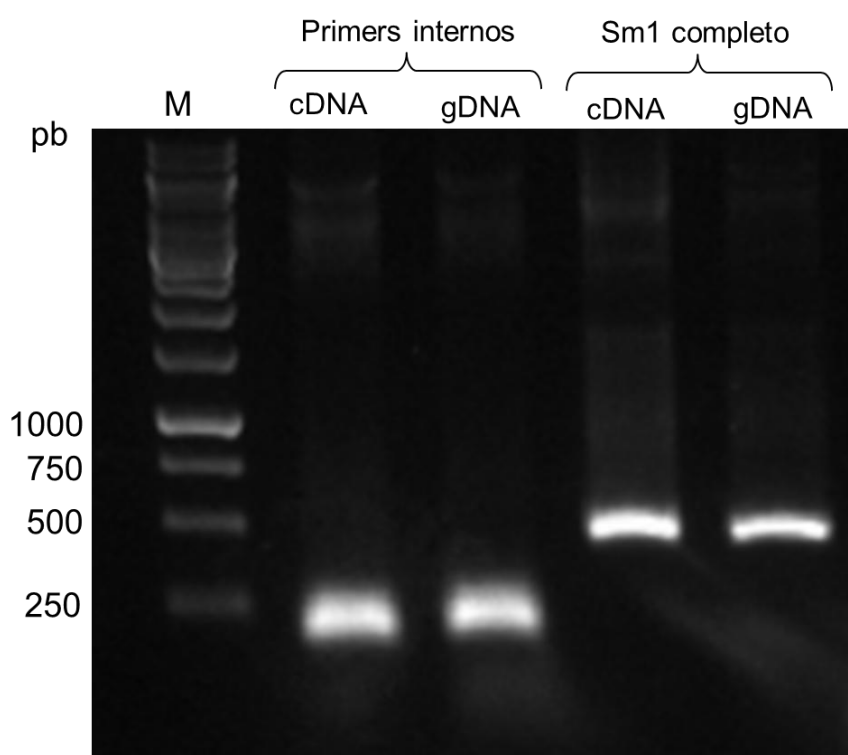


Figura 2. Análise dos produtos da reação de amplificação em gel de agarose a 1,5%, utilizando cDNA e DNA genômico do isolado de *Trichoderma harzianum* (37) como molde e primers da Tabela 3 dos materiais e métodos.

As sequências dos produtos de amplificação obtidos a partir do cDNA e DNA genômico contém uma ORF de 417pb. A sequência obtida da amplificação do DNA genômico não apresentou o intron como descrito para *T. virens* e *H. atroviridis* (DJONOVIC et al., 2006; SEIDL et al., 2006). A proteína

predita tem 138 aminoácidos, massa molecular de 14.38 KDa e ponto isoelétrico de 6.68. A proteína madura, após clivagem do peptídeo sinal de 18 aminoácidos possui massa molecular de 12,48 KDa e pl de 6.02.

```

1  atgcaattgtccaacctcttcaagcttgctctcttcaactgcccgt
1  M  Q  L  S  N  L  F  K  L  A  L  F  T  A  A
46  gtctctgctgataccgtctcgtacgataccggctacgatgacgca
16  V  S  A  ↑  D  T  V  S  Y  D  T  G  Y  D  D  A
91  tctcgttccctaaccgcccgtctcttgctccgacggcactaatggc
31  S  R  S  L  T  A  V  S  C  S  D  G  T  N  G
136 ctcatacaccagataccactggcagaccaggccagatccctcgc
46  L  I  T  R  Y  H  W  Q  T  Q  G  Q  I  P  R
181 ttcccatacattgggtgggtgccaggccgctcgtggtggaactcc
61  F  P  Y  I  G  G  A  Q  A  V  A  G  W  N  S
226 cctaactgcccacttgctggaagctcacctacagcggcaagacc
76  P  N  C  G  T  C  W  K  L  T  Y  S  G  K  T
271 atctacgtcttgccattgatcatgccggtgctggtttcaacatt
91  I  Y  V  L  A  I  D  H  A  G  A  G  F  N  I
316 ggtctcgacgccatgaatgctctgaccaacggtaatgctggtgccc
106 G  L  D  A  M  N  A  L  T  N  G  N  A  V  A
361 ctcggacgtgtttctgccactgcctctcaggtggctgtgagcaac
121 L  G  R  V  S  A  T  A  S  Q  V  A  V  S  N
406 tgcggcctctag 417
136 C  G  L  *

```

Figura 3. Sequência completa da proteína elicitora de defesa de *T. harzianum* (isolado 37). A seta indica o sítio de clivagem do peptídeo sinal e a marcação em negrito o códon de iniciação e terminação.

Esta ORF apresenta identidade com sequências de proteínas elicitoras de defesa de outros isolados de *Trichoderma spp.* e com outras proteínas pertencentes a família das ceratoplataninas como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5. Identidade da proteína elicitora de *T. harzianum* com outras proteínas pertencentes à família das cerato-plataninas.

Acesso	Descrição	Cobertura	E Value	Identidade máxima	Referencia
CAL80754.1	Proteína Epl1 (<i>Trichoderma atroviride</i>) >gb ADP09352.1 protein elicitora de resposta em planta Epl1 (<i>Trichoderma asperellum</i>)	99%	2e ⁻⁷³	97%	Vizcaino et al., 2006
CAL80753.1	Proteína Epl1 (<i>Trichoderma asperellum</i>)	99%	6e ⁻⁷³	97%	Vizcaino et al., 2006
ABE73692.1	Proteína elicitora de resposta em planta (<i>Hypocrea atroviridis</i>)	99%	1e ⁻⁶⁹	92%	Seidl et al., 2006
CAL80755.1	Proteína Epl1 (<i>Trichoderma viride</i>)	99%	5e ⁻⁶⁴	86%	Seidl et al., 2006
ADB82652.2	Proteína pequena 1 - sm1 (<i>Hypocrea lixii</i>)	99%	3e ⁻⁶³	85%	Peng & Xie, 2009
CAL80756.1	Proteína Epl1 (<i>Trichoderma viride</i>)	99%	3e ⁻⁶¹	83%	Seidl et al., 2006
ABE97920.1	snodprot 1 (<i>Hypocrea virens</i>)	99%	5e ⁻⁶¹	82%	Sible & Mukherje, 2006
AAZ80388.1	Pequena proteína 1 extracelular (<i>Hypocrea virens</i>) >emb CAL80759.1 Proteína Epl1 (<i>Trichoderma longibrachiatum</i>) >emb CAL80760.1 Proteína Epl1 (<i>Trichoderma longibrachiatum</i>) >emb CAL80757.1 Proteína Epl1 (<i>Hypocrea virens</i>)	99%	7e ⁻⁶¹	82%	Djonovic et al., 2006
EFW99471.1	Proteína Epl1 (<i>Grosmannia clavigera</i> kW 1407)	93%	1e ⁻⁵³	76%	Diguistini et al., 2011
XP 002999871.1	SnodProt1 [<i>Verticillium albo-atrum</i> VaMs.102] >gb EEY23801.1 SnodProt1 (<i>Verticillium albo-atrum</i> VaMs.102)	99%	4e ⁻⁵¹	71%	Ma et al., 2010
EFQ 31446.1	ceratoplatanina (<i>Glomerella graminicola</i> M1.001)	99%	2e ⁻⁴⁹	68%	Vaillancourt et al., 2010

De acordo com vários bancos de dados (SwissProt, EMBL e GenBankTM), as ceratoplataninas são uma pequena família de proteínas caracterizadas por possuir homologia em suas sequências, mas nem sempre com uma clara identidade funcional. Entretanto, elas são todas secretadas e, em alguns casos, estão envolvidas no fenômeno de reconhecimento biológico (BODDI et al., 2004).

As ceratoplataninas apresentam quatro resíduos de cisteínas conservadas envolvidas em duas pontes de sulfeto na proteína nativa (SCALA et al., 2004). A sequência obtida da proteína em estudo de *T. harzianum* apresentou esses quatro resíduos conservados conforme mostrado na Figura 4.

A proteína predita apresenta, ainda, os aminoácidos da posição 20 a 100 conservados, correspondendo a um domínio de conservação em proteínas da família das ceratoplataninas (PAZZAGLI et al., 1999).

```

gi|118402804|Ep11      MQLSNLFLKALFTA AVSADT VSYDTGYDDASRSLTVVSCBDGNGLIITRY 50
Trichoderma           MQLSNLFLKALFTA AVSADT VSYDTGYDDASRSLTAVSCBDGNGLIITRY 50
gi|284808701|small    MQLSNI FKLALFTA AVSADT VSYDTGYDDGSRSPNVVSCBDGPNGLETRY 50
gi|73672053|extracellular MQLSNI FTALFTA AVSADT VSYDTGYDNGSRSLNDVSCBDGPNGLETRY 50
gi|302404066|SnodProt1 MQLSNLLTIFTVATAAASAVSYDKGYDNGSRSLTAVSCBDGANGLITRY 50
gi|310795985|cerato-platanin MQLSSLVIFLSSVAAAAAVSYDTGYDDASRSM TAVSCBDGVNGLITRY 50
****.:.:..: .:.*:* :****.***:.*** . ***** ** ** :.*

gi|118402804|Ep11      HWQTQGGQIPRFPHYIGGAQAVAGWNSPNCGT CWKLTYSGKTIYVLAIDHTA 100
Trichoderma           HWQTQGGQIPRFPHYIGGAQAVAGWNSPNCGT CWKLTYSGKTIYVLAIDHAG 100
gi|284808701|small    HWSTQGGQIPRFPHYIGGVQAVAGWNSASCGT CWKLSYSGHTIYVLAVDHAA 100
gi|73672053|extracellular HWSTQGGQIPRFPHYIGGAAVAVAGWNSASCGT CWKLQYSGHTIYVLAVDHAA 100
gi|302404066|SnodProt1 GWQTQKQVKKFPYIGGAPAVAGWNSPNCGT CWELSYNGRTINVLAIIDHSA 100
gi|310795985|cerato-platanin GWQNQGVAGFPHIGGADVVGWNSPNCGT CWQLTYNGK SINVLAIIDHAS 100
*..* *: **:*..* .*.*****.*****:* *.*:* * **:**..

gi|118402804|Ep11      AGFNIGLDAMNALTNGNAVALGRVSATASQVAVSNCGL 138
Trichoderma           AGFNIGLDAMNALTNGNAVALGRVSATASQVAVSNCGL 138
gi|284808701|small    AGFNIALDATNALTGGQAVALGRVSATASQVAVKNCGL 138
gi|73672053|extracellular SGFNIALDAMNALTGGQAVQLGRVSATATQVPVKNCGL 138
gi|302404066|SnodProt1 NGFNIALDAMNALTGGQAVKLRVNASASKQVVKSKCGL 138
gi|310795985|cerato-platanin SGFNIALGAMNDLTNGQAVQLGRVDVQATQVGLNACGL 138
***:.*. * * **:*:** *****.. :.* . ***

```

Figura 4. Alinhamento múltiplo de seqüências preditas de proteínas elicitoras de defesa de espécies de *Trichoderma* e uma ceratoplatanina de *Phaeosphaeria nodorum* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Nas caixas cisteínas conservadas. Na caixa em negrito domínio de aminoácidos conservados em proteínas da família das ceratoplataninas.

4.3. Avaliação da expressão do gene da proteína elicitora de defesa em diferentes isolados de *Trichoderma spp.*

Com o objetivo de estudar a expressão do gene de uma proteína elicitora (Sm1) nos isolados de *Trichoderma spp.*, da Coleção Embrapa Arroz e Feijão, esporos de oito diferentes linhagens de *Trichoderma* foram inoculados em meio TLE líquido contendo 1,5% de glicose, sementes trituradas ou raiz macerada de feijão comum como fonte de carbono. O micélio foi filtrado, congelado em nitrogênio líquido e então macerado para extração de RNA. Após síntese do cDNA foi, então, feita a avaliação da expressão utilizando PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).

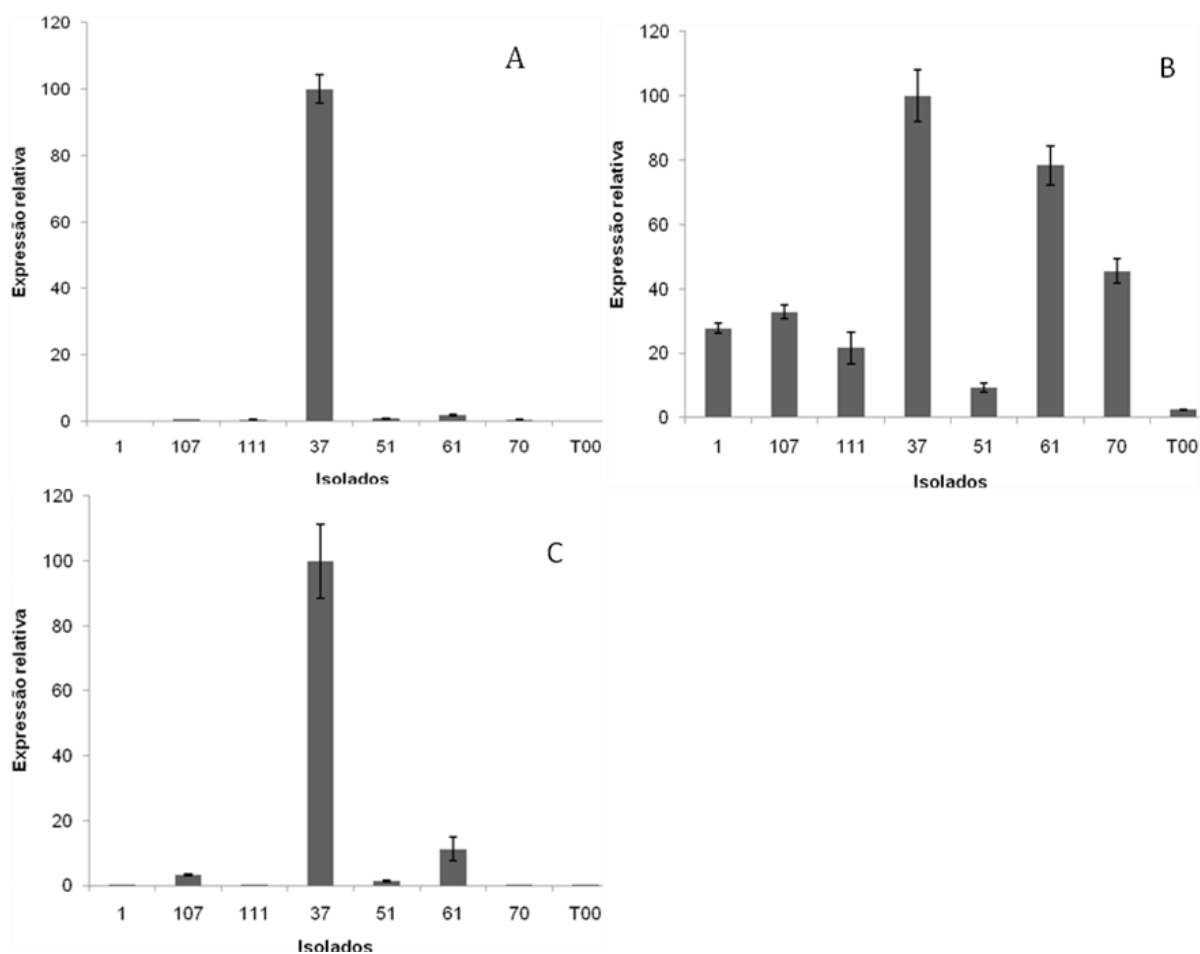


Figura 5. Análise da expressão do gene de uma proteína elicitora em isolados de *Trichoderma spp.* em diferentes condições de crescimento utilizando qRT-PCR. **A.** diferentes isolados crescidos em 1,5% de glicose. **B.** diferentes isolados crescidos em 1,5% de grãos de feijão triturados. **C.** diferentes isolados crescidos em 1,5% de raiz de feijoeiro macerada.

Independente da fonte de carbono utilizada no cultivo, o isolado 37 (*T. harzianum*) apresentou uma expressão significativamente maior do transcrito da proteína elicitora de defesa (Figura 5). Os demais isolados apresentaram expressão aumentada na presença do macerado de feijão e, com relação à raiz, esse aumento foi observado apenas para os isolados 61 e 107, com valores mais significativos para o primeiro. Como o isolado 37 apresentou expressão mais significativa do transcrito, este foi utilizado nos

experimentos seguintes de análise da expressão em diferentes condições de crescimento acrescentando, nessa análise, outras fontes de carbono.

4.4. Avaliação da expressão do gene da proteína elicitora de defesa de *Trichoderma harzianum* (37) crescido em diferentes fontes de carbono

Na análise quantitativa dos transcritos do gene em estudo de *T. harzianum* (37) foi observada a expressão em todas as fontes de carbono utilizadas (Figura 6). Os níveis mais significativos de expressão foram detectados para as fontes: galactose, glicose e amido, respectivamente. Sendo que os valores menos significativos de expressão foram detectados na presença de celulose e lactose. Já foi descrito que a expressão do gene da proteína elicitora de defesa, Sm1, de *T. virens* é aumentada na presença de glicose e da planta hospedeira (DJONOVIC et al., 2006).

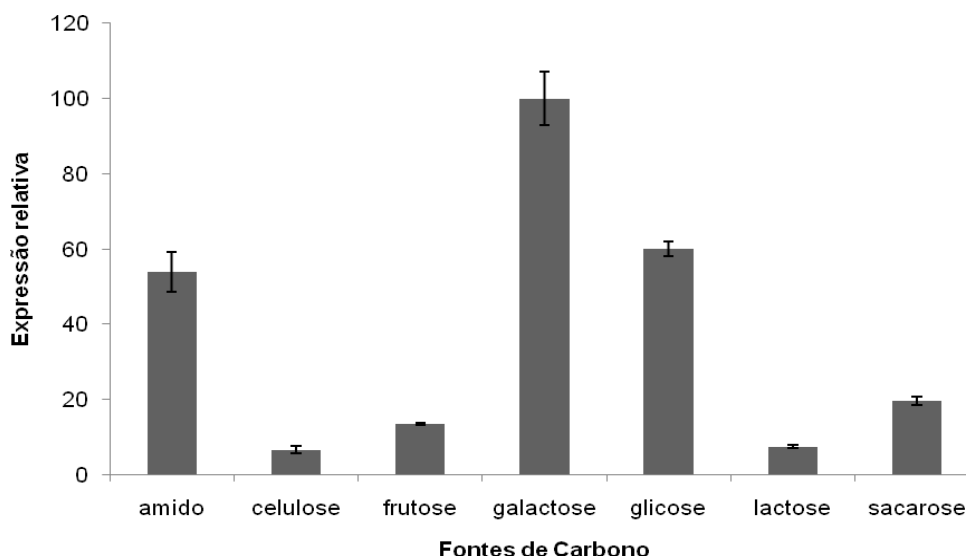


Figura 6. Gráfico de qRT-PCR representando os níveis de expressão do gene de uma proteína elicitora de *T. harzianum* (37) quando crescido em meio líquido contendo 1,5% de diferentes fontes de carbono.

Com relação à expressão em diferentes fontes de carbono, resultados semelhantes foram observados também para uma proteína elicitora de defesa de *H. atroviridis*, cuja expressão é aumentada na presença de glicose, arabinose e xilose. Além disso, foi demonstrado que existe também um controle da expressão deste transcrito na presença da parede celular do fungo fitopatogênico hospedeiro e este é reduzido em condições de estresse nutricional (SEIDL et al., 2006).

A expressão aumentada do transcrito da proteína elicitora do isolado 37 na presença de glicose e galactose (Figura 6), correlaciona-se com os dados de expressão obtidos para *T. virens* e *H. atroviridis*, indicando que a expressão do gene dessa proteína é aumentada quando as espécies de *Trichoderma* são cultivadas na presença de fontes de carbono de fácil assimilação, essa hipótese é corroborada pela diminuição de sua expressão em condição de estresse nutricional como demonstrado para *H. atroviridis*. Sugerindo, portanto, que esta proteína apesar de ser expressa na presença de glicose, não é uma proteína constitutiva, tendo sua expressão controlada por outras fontes de carbono e na presença de fungo e planta hospedeira (DJONOVIC et al., 2006; SEIDL et al., 2006).

A expressão do transcrito da proteína elicitora do isolado 37, também, apresentou aumento na presença de feijão macerado, com dados comparáveis aos obtidos para galactose e glicose que atuam como indutores de sua expressão (Figura 7). No entanto, esse aumento não foi observado na presença do macerado de raiz. Esses resultados correlacionam - se com os obtidos quando este isolado foi cultivado na presença de amido e celulose. Sugerindo que esse controle de expressão está relacionado à fonte de carbono

e não pode ser utilizado como um modelo que simule a interação com a planta hospedeira. Esse tipo de análise seria melhor avaliada em co-cultivos contendo fungo micoparasita e planta hospedeira.

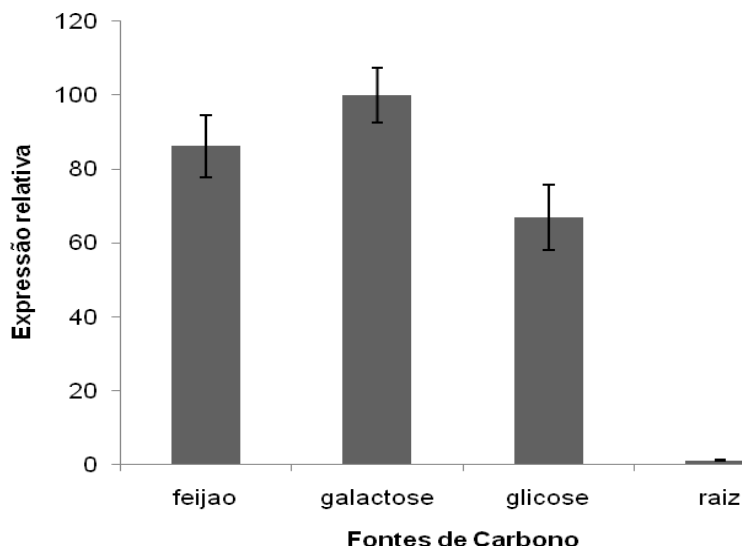


Figura 7. Gráfico de qRT-PCR representando os níveis de expressão do gene de uma proteína elicitadora de *T. harzianum* (37) quando crescido em meio líquido contendo 1,5% de diferentes fontes de carbono.

5. CONCLUSÃO

A proteína identificada foi classificada como uma proteína elicitora de defesa, pertencente à família das cerato-plataninas, com base nas análises de sequência. A expressão do gene da proteína elicitora é aumentada quando as espécies de *Trichoderma* são cultivadas na presença de fontes de carbono de fácil assimilação, tais como galactose e glicose. No entanto, a sua atividade biológica ainda precisa ser demonstrada.

6. PERSPECTIVAS

- Estudos de interação *Trichoderma spp.* – feijoeiro comum para observação de prováveis alterações na resposta de defesa da planta, desencadeadas pela presença do fungo não fitopatogênico.

- Purificação da proteína elicitadora de defesa de *T. harzianum* para estudo de sua função biológica e resposta desencadeada na planta hospedeira.

- Expressão da proteína de *T. harzianum* em estudo em *Saccharomyces cerevisiae*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A. S., SANCHEZ, C. P., CANDELA, M. E. (2000). Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. Eur. J. Plant Pathol. 106: 817–824.

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.

BAKER, B., ZAMBRYSKI, P., STASKAWICZ, B., DINESH-KUMAR, S. P. (1997). Signaling in plant–microbe interactions. Science 276: 726–733.

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

BIGIRIMANA, J., DE MEYER, G., POPPE, J., HOEFTE, M. (1997). Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent. 62: 1001–1007.

BODDI, S., COMPARINI, R.C., PAZZAGLI, L., CAPPUGI, G., SCALA, A. (2004). Cerato-platanin protein is located in the cell walls of ascospores, conidia and hyphae of *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *Platani*. Microbiology Letters. 233: 341-346.

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.

DE MEYER, G., BIGIRIMANA, J., ELAD Y., HOFTE, M. (1998). Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T 39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur J Plant Pathol.* 104, 279–286.

DIGUISTINI, S., WANG, Y., LIAO, N. Y., TAYLOR, G., TANGUAY, P., FEAU, N., HENRISSAT, B., CHAN, S. K., HESSE-ORCE, U., ALAMOUTI, S. M., TSUI, C. K., DOCKING, R. T., LEVASSEUR, A., HARIDAS, S., ROBERTSON, G., BIROL, I., HOLT, R. A., MARRA, M. A., HAMELIN, R. C., HIRST, M., JONES, S. J., BOHLMANN, J., BREUIL, C. (2011). Genome and transcriptome analyses of the mountain pine beetle-fungal symbiont *Grosmannia clavigera*, a lodgepole pine pathogen *Journal Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*

DJONOVIĆ 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. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 19(8):838-53.

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

GAFFNEY, T., FRIEDRICH, L., VERNOOIJ, B., NEGROTTO, D., NYE, G., UKNES, S., WARD, E., KESSMANN, H., RYALS, J. (1993). Requirement of

salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754 - 756.

GAMS, W. & BISSET, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Kubicek, P. & Harman, G. E. (eds.) (1998). *Trichoderma and Gliocladium: basic biology, taxonomy and genetics*, vol. 1. Taylor & Francis, London, p.3-34.

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 biological control strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathology*. 94(2): 171-176.

HARMAN, G. E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma spp.* *Phytopathology*. 190-194.

HARMAN, G. E., HOWELL, C. R., VITERBO, A., CHET, I., & LORITO, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:43-56.

HOWELL, C. R., HANSON, L. E., STIPANOVIC, R. D., PUCKHABER, L. S. (2000). Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90: 248–252.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE (2010). Produção agrícola municipal: Cereais, leguminosas e oleaginosas.

KOIKE, N., HYAKUMACHI, M., KAGEYAMA K., TSUYUMU, S., DOKE, N. (2001). Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth-promoting fungi: lignification and superoxide generation. *Eur. J. Plant Pathol.* 107:523–533.

KUBICEK, C. P., MACH, R. L., PETERBAUER, C. K., LORITO, M. (2001). *Trichoderma*: From genes to biocontrol. *J. Plant Pathol.* 83:11-23.

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 25: 402 – 408.

LO, C. T., LIAO, T. F., DENG, T. C. (2000). Induction of systemic resistance of cucumber to cucumber green mosaic virus by the root-colonizing *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 90: 43-56.

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.

LOTAN, T., FLUHR, R. (1990). Xylanase, a novel elicitor of pathogenesis related proteins in tobacco, uses a non-ethylene pathway for induction. *Plant Physiol.* 93, 811–817.

MA, L. J. J., KLOSTERMAN, S. J., SUBBARAO, K., DOBINSON, K., VERONESE, P., KANG, S., GOLD, S. E., YOUNG, S., JAFFE, D., GNERRE, S., BERLIN, A., HEIMAN, D., HEPBURN, T., SYKES, S., CHEN, Z., ALVARADO, L., KODIRA, C. D., LANDER, E., GALAGAN, J., NUSBAUM, C., BIRREN, B. (2010) Annotation of *Verticillium albo-atrum* VaMs.102. Dados não publicados.

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, nº 4.

OOSTENDORP, M., KUNZ, W., DIETRICH, B. & STAUB, T. (2001). Induced disease resistance in plants by chemicals. European Journal of Plant Pathology. 107: 19-28.

PAZZAGLI, L., CAPPUGI, G., MANAO, G., CAMICI, G., SANTINI, A., SCALA, A. (1999). Purification, characterization and amino acid sequence of Cerato – platanin, a new phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. The Journal of Biological Chemistry. 274(35): 24959-24964.

PERSOON, C.H. (1794). Dpositio methodica fungorum. Rõmers Neues Magazin Botanische 1:81-128.

PIETERSE, C. M. J., VAN WEES, S. C. M., VAN PELT, J. A., KNOESTER, M., LAAN, R., GERRITS, H., WEISBEEK, P. J., VAN LOON L. C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. Plant Cell. 10, 1571–1580.

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.

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

SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. (2001). Molecular Cloning – A Laboratory Manual, 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SAMUELS, G.L. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycological Research 100: 925-935.

SCALA, A., PAZZAGLI, L., COMPARINI, C., SANTINI, A., TEGLI, S., CAPPUGI, G. (2004). Cerato- Platanin, an early – produced protein by *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*, elicits phytoalexin synthesis in host and no-host plants. Journal of Plant Pathology. 86(1): 27-33.

SEAMAN, A. (2003). Efficacy of OMRI-approved products for tomato foliar disease control. New York State Integrated Pest Management Program publication 129: 164–167.

SEIDL, V.; MARCHETTI, M.; SCHANDL., R.; ALLMAIER, G. & KUBICEK C.P. (2006). 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 J.** 273(18):4346-59.

SIBLE,G. V. & MUKHERJEE, P. K. (2006). Cloning of two snodprot homologs from *Trichoderma virens*. Dados não publicados.

VAILLANCOURT, L., MA, L. J., THON, M., DICKMAN, M., YOUNG, S. K., ZENG, Q., KOEHRSEN, M., ALVARADO, L., BERLIN, A., BORENSTEIN, D., CHEN, Z., ENGELS, R., FREEDMAN, E., GELLESCH, M., GOLDBERG, J., GRIGGS, A., GUJJA, S., HEIMAN, D., HEPBURN, T., HOWARTH, C., JEN, D., LARSON, L., LEWIS, B., MEHTA, T., PARK, D., PEARSON, M., ROBERTS, A., SAIF, S., SHEA, T., SHENOY, N., SISK, P., STOLTE, C., SYKES, S., WALK, T., WHITE, J., YANDAVA, C., HAAS, B., GALAGAN, J., NUSBAUM, C., BIRREN, B. (2010). The Genome Sequence of *Glomerella graminicola* strain M1.001. Dados não publicados.

VAN LOON, L. C., BAKKER, P. A. H. M. & PIETERCE, C. M. J. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 453–483.

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.

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

WOO, S. L., RUOCCO, M., CILIENTO, R., LANZUISE, S., VINALE, F., FORMISANO, E., SCALA, V., TURRÀ, D., SCALA, F, ZOINA, A., ABADI, K., LORITO, M. (2003). Molecular factors involved in the interaction between plants, pathogens and biocontrol fungi. Page 368 in: Proc. 11th International Congress on Molecular Plant–Microbe Interactions. St. Petersburg, Russia.

W.A., Vargas, S. Djonovic, S.A., Sukno, C.M., Kenerley. (2008). Dimerization controls the activity of fungal elicitors that trigger systemic resistance in plants. J. Biol.Chem. 283: 19804–19815.

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):181-5.

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

YEDIDIA, I., BENHAMOU, N., KAPULNIK, Y., AND CHET, I. (2000). Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. Plant Physiol. Biochem. 38:863-873.

YEDIDIA, I., SHORESH, M., KEREM, Z., BENHAMOU, N., KAPULNIK, Y., CHET,I. (2003). Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas*

spingae pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. Appl. Environ. Microbiol. 69:7343-7353.