Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Eriston Vieira Gomes

Estudo de genes de *Trichoderma harzianum* associados ao micoparasitismo e seu papel no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*

Ribeirão Preto – São Paulo

2015

ERISTON VIEIRA GOMES

Estudo de genes de *Trichoderma harzianum* associados ao micoparasitismo e seu papel no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Roberto do Nascimento Silva

Ribeirão Preto – São Paulo

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Ficha Catalográfica

Gomes, Eriston Vieira

Estudo de genes de *Trichoderma harzianum* associados ao micoparasitismo e seu papel no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*/ Eriston Vieira Gomes; Orientador: Profº. Dr. Roberto do Nascimento Silva. Ribeirão Preto – São Paulo, 2015. p. 117: il.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014. Área de concentração: Bioquímica.

1. *Trichoderma harzianum*; 2. *Sclerotinia sclerotiorum*; 3. Micoparasitismo; 4. Expressão gênica; 5. Proteína Epl-1.

Nome: GOMES, Eriston Vieira

Título: Estudo de genes de *Trichoderma harzianum* associados ao micoparasitismo e seu papel no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Membro 1: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Membro 2: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Membro 3: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Membro 4: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Membro 5: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Ribeirão Preto – São Paulo

2015

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- 1) Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo: 2012/16895-4).
- 2) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.
- 3) Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência – FAEPA (FMRP/USP).
- 4) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP

À minha esposa Alessandra Christinne Guimarães Moreira (“coisinha”), presente em todos os momentos, um porto seguro, um exemplo vivo de que Deus nos ama e nos concede a presença de um anjo, mesmo sem o devido merecimento e que representa com fidelidade aos dizeres “... Na alegria e na tristeza, na saúde e na doença, na pobreza e na miséria...” e agora também ao Felipe (nosso filho) que vai chegar em um momento muito especial, seja bem vindo!

À minha filha Evelin Ribeiro Gomes, que só me traz alegrias, que sempre me recebe com o mesmo sorriso, a quem eu, sem o menor direito, proporcionei um imenso vazio..., o da minha ausência (“*mea culpa, mea culpa, mea maxima culpa*”). Obrigado por me amar mesmo assim.

Aos meus pais Eurípedes Rodrigues Gomes e Sebastiana de Lourdes Gomes, os quais, até hoje, me proporcionam o suporte psicológico, moral e financeiro para que eu possa alcançar meus objetivos.

Aos meus irmãos, primos, sobrinhos, e restante de meus familiares.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente à Deus, por me proporcionar a capacidade física e intelectual de enfrentar esse desafio e pela força nos momentos de fraqueza.

Um especial agradecimento ao meu orientador, prof. Dr. Roberto do Nascimento, que me proporcionou a oportunidade de estar em uma excelente instituição; trabalhando com uma proposta extremamente interessante, fascinante e estimulante, com pessoas de igual estirpe; por ter acreditado em meu trabalho e me guiado nesse caminho, o qual foi em minha vida pessoal e profissional, sem dúvidas, um “divisor de águas”.

Ao meu orientador de Estágio de Pesquisa no Exterior, prof. Dr. Santiago Gutierrez, membros de seu laboratório e sua família, que acolheu a mim e minha esposa de maneira tão dedicada, amistosa e carinhosa. O qual me proporcionou o suporte intelectual, moral e psicológico para realizar um bom trabalho e ter nos brindado com um mergulho na cultura e tradições desse fascinante país que é a Espanha (*Gracias Santi, te echamos de menos*).

Aos professores Cirano José Ulhoa (Universidade Federal de Goiás) e Valdirene Monteiro (Universidade Estadual de Goiás), pelo apoio, incentivo e orientações durante o trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM): Zuleica Aparecida Soares de Moraes, Silvinha, Amanda Cristina Campos Antoniêto, Karoline Maria Vieira Nogueira, Mariana do Nascimento Costa, Renato Graciano de Paula, Wellington Ramos Pedersoli, Júlio Bortolossi e Marcela Suriani. Obrigado pela amizade, pelo carinho e convivência.

Ao departamento de Bioquímica e Imunologia, departamento de Genética e ao departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, principalmente aos membros da secretaria (Ivone e Ronaldo) e aos professores, funcionários e colegas dos demais laboratórios.

À todos os amigos, colegas e pessoas que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

Você Aprende...

Depois de algum tempo, você aprende a diferença, a sutil diferença, entre dar a mão e acorrentar uma alma... E começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança. E aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão... E aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam... Descobre que se levam anos para se construir confiança e apenas segundos para destruí-la, e que você pode fazer coisas em um instante das quais se arrependará pelo resto da vida. Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida... Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa, por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pode ser a última vez que as vejamos... Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto. Aprende que não importa onde já chegou, mas onde está indo, mas se você não sabe para onde está indo, qualquer lugar serve.... Aprende que paciência requer muita prática. Descobre que algumas vezes a pessoa que você espera que o chute quando você cai é uma das poucas que o ajudam a levantar-se... Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens, poucas coisas são tão humilhantes e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso.... Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém, algumas vezes você tem que aprender a perdoar-se a si mesmo... Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte... Portanto... plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!

William Shakespeare

RESUMO

GOMES, E. V. **Estudo de genes de *Trichoderma harzianum* associados ao micoparasitismo e seu papel no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*.** 2015. 117 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2015.

Fungos da espécie *Trichoderma harzianum* são estudados como agentes de controle biológico de fitopatógenos que habitam o solo, sendo sua estratégia um processo complexo que pode ocorrer por diferentes mecanismos ou uma combinação deles, incluindo micoparasitismo. Neste trabalho, foram analisadas consequências da deleção do gene que codifica a proteína Epl-1, descrita como elicitora de resistência em plantas nos processos de: modulação da expressão de genes envolvidos no processo de micoparasitismo de *T. harzianum* contra o fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*; estabelecimento do processo de micoparasitismo; interação entre *T. harzianum* e plantas de feijão comum. Os resultados mostram que a deleção do gene *epl-1* alterou a modulação da expressão de todos os genes relacionados ao processo de micoparasitismo analisados. Além disso, Epl-1 apresentou um papel no processo de modulação de expressão desses genes em *T. harzianum*, no reconhecimento da própria parede celular e da parede de diferentes hospedeiros, na interação com fitopatógenos hospedeiros, no processo de formação de estruturas de micoparasitismo, bem como na indução de resistência local e sistêmica em plantas de feijão comum.

Palavras-chave: *Trichoderma harzianum*, Micoparasitismo, *Sclerotinia sclerotiorum*, Epl-1.

ABSTRACT

GOMES E. V. **Study of *Trichoderma harzianum* genes associated with mycoparasitism and its role in biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum*.** 2015. 117p. Thesis (PhD) - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2015.

Fungal species *Trichoderma harzianum*, are studied as soilborne plant pathogens biological control agent and its strategy is a complex process, which can occur by different mechanisms or a combination thereof, including mycoparasitism. In this work, the consequences of *epl-1* gene deletion, which encoding for Epl-1 protein, described as plants resistance elicitor, were analyzed on: modulation of gene expression involved in *T. harzianum* mycoparasitism process against phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*; mycoparasitism establishment process and *T. harzianum* interaction with bean plants. The results showed that *epl-1* encoding gene deletion altered the expression modulation of all analyzed genes related to mycoparasitism process. Furthermore, Epl-1 presented a role in modulating expression of these genes in the process of self and host cell wall recognition; the interaction with host plant pathogens in formation of mycoparasitism structures as well as local and systemic resistance in beans plants.

Keywords: *Trichoderma harzianum*, Mycoparasitism, *Sclerotinia sclerotiorum*, Epl-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida de <i>S. sclerotiorum</i>	17
Figura 2: Morfologia característica de <i>Trichoderma harzianum</i>	18
Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura do processo de micoparasitismo de <i>Trichoderma harzianum</i> em isolado de <i>S. sclerotiorum</i>	20
Figura 4: Construção do vetor de deleção do gene <i>epl-1</i> de <i>T. harzianum</i>	28
Figura 5: Construção da linhagem <i>T. harzianum</i> RecEpl-1-GFP.....	29
Figura 6: Esquema do método para classificar linhagens de <i>Trichoderma</i> em ensaios de atividade antagonica em placa.....	30
Figura 7: Análise <i>in silico</i> da sequência de Epl-1 de <i>T. harzianum</i>	36
Figura 8: Representação dos prováveis motivos de regulação na região promotora do gene <i>epl-1</i> de <i>T. harzianum</i>	37
Figura 9: Esquema de seleção de transformantes.....	39
Figura 10: Análises de hibridização (<i>Southern blot</i>).	40
Figura 11: Construção da linhagem complementar <i>T. harzianum</i> RecEpl-1-GFP.....	41
Figura 12: Ensaio <i>in vitro</i> do potencial antagonico em confronto direto em placa.....	43
Figura 13: Análises de microscopia de fluorescência de Epl-1 fusionada com GFP.....	44
Figura 14: Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) entre linhagens de <i>T. harzianum</i>	45
Figura 15: Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) entre linhagens de <i>T. harzianum</i> e <i>S. sclerotiorum</i>	47
Figura 16: Ensaio de confronto direto.	49
Figura 17: Expressão relativa de genes de <i>T. harzianum</i> relacionados ao micoparasitismo em ensaios de confronto direto em placa contra isolados de <i>S. sclerotiorum</i>	49
Figura 18: Expressão relativa de genes de <i>T. harzianum</i> relacionados ao micoparasitismo em ensaios de confronto direto em placa contra isolados de <i>S. sclerotiorum</i>	50
Figura 19: <i>Heat map</i> e categorização de grupos da expressão de genes relacionados ao micoparasitismo de <i>T. harzianum</i>	52
Figura 20: Análise da razão de expressão de genes relacionados à defesa em raízes de feijão comum.	53
Figura 21: Germinação e desenvolvimento de um esporo de <i>B. cinerea</i> sobre a superfície de uma folha de planta de tomate.....	67

Figura 22: Análises de RT-qPCR da expressão relativa de genes de virulência de <i>B. cinerea</i>	78
Figura 23: Análises de RT-qPCR da expressão relativa de genes de virulência de <i>B. cinerea</i>	80
Figura 24: Níveis de expressão relativa de genes relacionados à defesa pertencentes às vias metabólicas de SA e JA em plantas de tomate de quatro semanas.....	83
Figura 25: Níveis de expressão relativa de genes relacionados à defesa pertencentes às vias metabólicas de SA e JA em culturas hidropônicas de tomate.	85
Figura 26: Níveis de expressão relativa do gene <i>TomLoxA</i> em raízes de culturas hidropônicas de tomate.	86
Figura 27: Ensaio de antibiograma.	90
Figura 28: Representação esquemática da via biosintética de terpenos	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação dos oligonucleotídeos utilizados (Capítulo I).....	27
Tabela 2: Relação dos oligonucleotídeos utilizados (Capítulo II).....	74
Tabela 3: Quantificação de Ergosterol (TRB - 10µg/mL).....	87
Tabela 4: Quantificação de Ergosterol (TRB - 25µg/mL).....	87
Tabela 5: Quantificação de Esqualeno (TRB - 10µg/mL).....	88
Tabela 6: Quantificação de Esqualeno (TRB - 25µg/mL).....	89

SUMÁRIO

Capítulo I: Estudo de genes de <i>Trichoderma harzianum</i> associados ao micoparasitismo e seu papel no biocontrole de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	12
1 Introdução	13
2 Revisão Bibliográfica.....	15
2.1 Fitopatógenos	15
2.1.1 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	16
2.2 – O gênero <i>Trichoderma/Hypocrea</i>	17
2.3 – <i>T. harzianum</i> e Micoparasitismo	20
2.4 – Interação Planta- <i>Trichoderma</i> spp.	21
2.4 Resistência Induzida em Plantas.....	22
2.6 A Família de Proteínas Cerato-Plataninas	22
3 - Justificativa	23
4 Objetivos.....	25
5 Materiais e Métodos	25
5.1 Cultivo e Manutenção dos fungos	25
5.2 Genes de <i>T. harzianum</i> Seleccionados Para Análises de Micoparasitismo	26
5.3 Deleção de Genes Associados ao Micoparasitismo em <i>T. harzianum</i>	26
5.3.1 Deleção de <i>epl-1</i> em <i>T. harzianum</i>	26
5.3.2 Complementação de linhagem mutante de <i>T. harzianum</i> com reintegração de <i>epl-1</i> fusionado com gene que codifica à GFP	28
5.4 Ensaio de Confronto Direto em Placa.....	29
5.4.1 Ensaio de Confronto Direto em Placa entre Linhagens de <i>T. harzianum</i> e Fungos Fitopatogênicos.....	29
5.5 Testes de Cultura Dupla e Microscopia Eletrônica de Varredura	30
5.6 Manipulações de DNA/RNA.....	31
5.7 Ensaio em Plantas	31
5.7.1 Ensaio em Plantas de Feijão.....	32
5.8 Análises de qRT-PCR.....	32
5.8.1 Análises de Expressão em Genes de Micoparasitismo de <i>T. harzianum</i>	32
5.8.2 Análise de Expressão de Genes de Defesa em Plantas de Feijão	33
6 Resultados	34
6.1 Análises “ <i>in silico</i> ” de <i>epl-1</i> em <i>T. harzianum</i> : Características e Provável Sistema de Regulação	34

6.2 Deleção e Recuperação do gene <i>epl-1</i> em <i>T. harzianum</i> e Seleção de Transformantes.	38
6.3 Proteína Epl-1 não é Essencial para o Potencial Antagônico de <i>T. harzianum</i>	42
6.4 Proteína Epl-1 de <i>T. harzianum</i> é Transportada por Vesículas e Conduzida Predominantemente para a Parede Celular	43
6.5 Proteína Epl-1 de <i>T. harzianum</i> está envolvida no reconhecimento e no processo de enovelamento micoparasítico da hifa no hospedeiro.....	44
6.6 Ausência de Epl-1 Afetam os Níveis de Expressão de Genes de Micoparasitismo em Confronto Direto	48
6.7 Análises da expressão de genes relacionados à defesa em plantas de feijão foi modificado por Epl-1.....	52
7 Discussão	53
Capítulo II: O Papel da Proteína Epl-1 de <i>Trichoderma harzianum</i> na Interação com Fungos e Plantas Hospedeiros	62
1 Introdução	65
1.1 A cultura do Tomate no Brasil	65
1.2 Botrytis cinerea.....	66
1.3 <i>Trichoderma</i> como agentes de biocontrole	68
2 Justificativa	69
3 Objetivos.....	69
4 Materiais e Métodos	70
4.1 Cultivo e Manutenção dos fungos	70
4.2 Ensaio de Confronto Direto em Placa entre Linhagens de <i>T. harzianum</i> e <i>B. cinerea</i> 05.10	70
4.3 Ensaio em Plantas de Tomate	71
4.4 Análise de Expressão de Genes de Defesa em Plantas de Tomate e Genes de Virulência em <i>B. cinerea</i>	72
4.5 Quantificação de Esqualeno e Ergosterol.....	75
4.6 Antibiógrama do Sobrenadante Extraído de Culturas de <i>T. harzianum</i> contra <i>B. cinerea</i>	75
4.7 Testes em Condições de Estresse	76
4.7.1 Resposta a Temperatura.....	76
4.7.2 Resposta a Salinidade	76
6 Resultados	76
6.1 Epl-1 de <i>T. harzianum</i> reprime a expressão relativa de genes de virulência de <i>B. cinerea</i> 05.10 após o contato das hifas	76

6.2 Proteína Epl-1 de <i>T. harzianum</i> está envolvida na indução do efeito <i>primer</i> em plantas de tomate	81
6.3 Efeito das Linhagens de <i>T. harzianum</i> na Expressão de Genes Relacionados à Defesa em Culturas Hidropônicas de Plantas de Tomate	84
6.4 Proteína Epl-1 de <i>T. harzianum</i> está envolvida nos estágios iniciais de colonização de raízes de plantas de tomate	85
6.5 Epl-1 de <i>T. harzianum</i> afeta a produção de produtos da via metabólica dos terpenos...	87
6. 6 Ensaio de Antibiograma	89
7 Discussão	90
8 Conclusões e Perspectivas	96
9 – Bibliografia Fundamental.....	97
ANEXOS	114
1 - Artigos Publicados no Período	114
1.1 Artigos Originais:	114
1.2 Artigos de Revisão:	114
2 Artigos Submetidos	114
3 Participações em Cursos, Anais e Congressos	114

A scanning electron micrograph (SEM) showing a dense network of Trichoderma harzianum hyphae. The hyphae are long, thin, and branched, with a distinct longitudinal texture. They are intertwined with a more complex, layered structure that appears to be the substrate or a target organism. The image is in grayscale, highlighting the intricate morphology of the fungal filaments.

Capítulo I

Estudo de genes de *Trichoderma harzianum* associados ao micoparasitismo e seu papel no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*

1 Introdução

O aumento da produção de alimentos de maneira sustentável continua sendo o grande desafio do setor agrícola no Brasil e no mundo. A agricultura moderna tem gerado impactos ambientais que comprometem a sustentabilidade dos ecossistemas agrícolas a médio e longo prazo, embora esteja elevando a produtividade e permitindo atingir níveis de produção que atendem às demandas do mercado. Um sistema de produção agrícola por si só já reduz a diversidade biológica do ambiente a partir da transformação de um ecossistema em um agrossistema. Esse desequilíbrio é quase que completo quando se trata de monoculturas, que são agrossistemas extremamente simplificados e, portanto, mais suscetíveis ao aparecimento de espécies nocivas à cultura plantada, sendo que o cultivo de plantas geneticamente homogêneas favorece o aumento da população de patógenos e pragas de forma epidêmica (SOARES; PORTO, 2010).

A agricultura sempre desempenhou um papel importante na geração de riquezas no Brasil. Até a década de 50, o crescimento da produção agrícola se dava por conta da expansão da área cultivada. A partir da década de 60, o uso de máquinas, adubos e defensivos químicos passaram a ter também, importância no aumento da produção agrícola. De acordo com os parâmetros da “Revolução Verde”, incorporou-se um pacote tecnológico à agricultura, tendo a mudança da base técnica resultante passando a ser conhecida como modernização da agricultura brasileira (SANTOS, 1986).

A produção brasileira de grãos mais que dobrou em duas décadas, atingindo 188,7 milhões de toneladas em 2013, principalmente em decorrência de ganhos de eficiência, sendo que nesse período a taxa de crescimento da produtividade (3,2%), foi quase duas vezes superior à da área (1,7%). Na safra 2013/14, foram produzidas 193,5 milhões de toneladas e para a safra 2014/15 a expectativa é da ordem de 200 milhões de toneladas. O crescimento da produção agrícola deve continuar acontecendo com base na produtividade. As projeções indicam que entre 2012 e 2022 a produção de grãos deve aumentar em 21,1%, enquanto a área deverá expandir-se em 9,0% segundo estimativas do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MINISTERIO DA AGRICULTURA E PLANEJAMENTO, 2014).

Para atingir essa meta, as perdas nas lavouras brasileiras devem ser minimizadas sendo

que grande parte dessas perdas no Brasil e no mundo são atribuídas a fungos patogênicos que habitam solos onde, todos os anos, milhões de dólares são gastos no seu controle (OARD; RUSH; OARD, 2004). Nas lavouras brasileiras, infecções causadas por patógenos “de solo” como *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, e pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, causam perdas de até 100% na produção de culturas suscetíveis (CAFE FILHO; LOBO JÚNIOR, 2000; HALL; NASSER, 1996). Estes fungos são parasitas não especializados, em geral polípagos, que utilizam matéria orgânica como substrato e apresentam alta capacidade de colonizar resíduos vegetais no solo e infectar culturas de tipos diferentes e, portanto, causar doenças com sintomas semelhantes (POLETTTO et al., 2006).

A principal estratégia de controle destes patógenos, mundialmente utilizada, ainda é a aplicação de fungicidas químicos. Esta medida de controle, apesar de relativamente eficiente, é um processo oneroso, leva à seleção de patógenos resistentes e ao surgimento de pragas secundárias (PIRES; FONTES; SUJII, 2003). Além disso, 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; FONTES; SUJII, 2003). Nos últimos anos, devido à pressão imposta pelas leis de impacto ambiental, à crescente preocupação da população com o meio ambiente e saúde, bem como pela necessidade de desenvolvimento de métodos de controle mais eficientes, surgiu a demanda por novas estratégias neste controle (FRIGHETTO, 2000).

Novas alternativas no combate a estes fitopatógenos já são utilizadas, como o controle biológico, que se baseia no uso de microrganismos antagonistas. Este controle pode ser direto, quando os antagonistas são aplicados vivos diretamente nas culturas, ou indireto, através da aplicação de seus metabólitos (MELO; AZEVEDO, 2000; POLETTTO et al., 2006).

O potencial das espécies do gênero *Trichoderma* como agentes de controle biológico de plantas infectadas, foi reconhecido primeiramente por Weidling no começo da década de 1930 (WEIDLING, 1934), que descreveu a ação micoparasítica de *Trichoderma* em *Rhizoctonia* e *Sclerotinia* e seus efeitos benéficos no controle da patologia na planta. Isso estimulou várias pesquisas nessa área e hoje, algumas espécies vêm sendo utilizadas com

sucesso, inclusive comercialmente, no controle biológico de fungos fitopatogênicos de interesse na agricultura.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Fitopatógenos

Albert Bernard Frank em 1885 (FRANK, 1885 apud TRAPPE, 2005) introduziu o termo “micorriza” do grego que significa literalmente “raízes de fungo”. Fungos micorrízicos formam uma relação simbiótica com raízes de plantas de maneira similar às bactérias de nódulos de raízes de leguminosas. Nessa relação os fungos recebem carboidratos das plantas e em retribuição suprem as plantas com nutrientes, hormônios, etc. Essa propriedade foi provavelmente crucial para permitir que as plantas se mudassem do ambiente aquático, no qual as fontes de nutrientes estavam diretamente disponíveis, para o solo no habitat terrestre onde se desenvolvem rapidamente zonas de depleção após a absorção de elementos por órgãos como as raízes (CORRADI; BONFANTE, 2012). Entretanto, uma pequena minoria de espécies de fungos se desenvolveu e quebrou o tênue equilíbrio do benefício mútuo para se tornarem patógenos de plantas. Na maioria das populações de plantas existem indivíduos que são resistentes à infecção fúngica onde patógenos geralmente acessam o interior de plantas tanto pela penetração direta da superfície de folhas e/ou raízes quanto pela entrada através de lesões e aberturas naturais, tais como os estômatos de folhas. Fungos patogênicos de plantas desenvolveram diferentes modos de interação com suas plantas hospedeiras. Alguns patógenos sintetizam e secretam metabólitos secundários tóxicos como primeiros recursos para colonização, matam as células hospedeiras e vivem a partir dos compostos orgânicos. Outros fungos, por outro lado, vivem a partir de nutrientes fornecidos por hospedeiros vivos por períodos de tempo prolongados e não produzem toxinas. Esses contrastantes modos de nutrição são conhecidos como necrotróficos e biotróficos respectivamente. A combinação desses dois estilos de vida e estratégias nutricionais onde patógenos exibem um período vida biotrófico transiente seguido por um estilo de vida necrotrófico, sendo assim chamado de hemibiotrófico (GARDINER; KAZAN; MANNERS, 2013).

2.1.1 *Sclerotinia sclerotiorum*

Em 1886, Anton De Bary (DE BARY, 1886 apud VAN KAN, 2006) descreveu a habilidade de *S. sclerotiorum* em matar e macerar células vegetais. *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary, é um dos mais importantes fitopatógenos de solo, infectando aproximadamente 400 espécies de plantas e causando danos econômicos a uma grande variedade de culturas (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; STEADMAN, 1979). O mofo branco, causado por *S. sclerotiorum*, é uma doença comum em muitos países dos cinco continentes (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; PURDY, 1979), sendo mais comuns em plantas das famílias *Solanaceae*, *Cruciferae*, *Umbelliferae*, *Compositae*, *Chenopodiaceae* e *Fabaceae* (WILLETTS; WONG; KIRST, 1980). O primeiro registro de ocorrência deste patógeno no Brasil foi feito em 1920 atacando batata (*Solanum tuberosum*) no Estado de São Paulo. Para a cultura do feijoeiro, o ataque deste patógeno foi relatado pela primeira vez em 1954, no Rio Grande do Sul (CHAVES, 1964). Este fitopatógeno foi disseminado pelas regiões sul e sudeste nas décadas de 40 e 50 como um patógeno secundário para feijão comum e outros vegetais. A primeira epidemia severa deste patógeno no Brasil foi registrada em 1976, envolvendo sementes de lavouras de soja no Estado do Paraná e, a partir dali, sementes infectadas foram levadas para a região dos cerrados nos anos de 1980. Em quase 10 anos, *S. sclerotiorum* se tornou presente em 50% das lavouras de feijão comum irrigadas com pivô central, causando severas epidemias de mofo branco e se tornando o principal patógeno dessa cultura nessas regiões. Registros mostraram que *S. sclerotiorum* está presente em quase todas as áreas irrigadas por pivô central, podendo causar até 100% de perda na produção de suas hospedeiras (LOBO JÚNIOR, 2002).

Como seu nome indica *S. sclerotiorum* produz escleródios, os quais são estruturas melanizadas de longa duração (HEGEDUS; RIMMER, 2005). O escleródio consiste de uma massa compacta de hifa hialina entrelaçada, envolvida por uma camada de células com pigmentos negros (JONES; WATSON, 1969). O escleródio apresenta estrutura dura e resistente, que consiste de uma porção interior colorida chamada de medula e, externamente, um revestimento protetor negro chamado de casca. A casca contém pigmentos de melanina os quais são altamente resistentes à degradação, enquanto a medula consiste de células ricas em glicanas e proteínas. A forma e o tamanho do escleródio dependem do hospedeiro onde eles são produzidos ou das plantas infectadas (NELSON, 1998).

S. sclerotiorum é capaz de se reproduzir sexuadamente e assexuadamente. A reprodução sexuada ocorre através da germinação carpogênica do escleródio resultando na produção do apotécio e então dos ascósporos, sendo que a partir de apenas um ascósporo é possível completar o seu ciclo de vida. A reprodução assexuada, a qual é considerada a mais comum, ocorre pela germinação miceliogênica do escleródio resultando diretamente em novos escleródios ou micélio que eventualmente produz escleródio (ALDRICH-WOLFE; TRAVERS; NELSON, 2015) (Fig. 01).

Figura 1: Ciclo de vida de *S. sclerotiorum*. 1- Sobrevivência; germinação miceliogênica do escleródio no solo e infecção da planta. 2 – Germinação carpogênica do escleródio e desenvolvimento do apotécio. 3 – Formação e dispersão dos ascósporos. 4 – Infecção da planta e germinação dos ascósporos. 5 – Desenvolvimento micelial; colonização da planta; desenvolvimento da doença; formação de escleródios; decaimento da planta no solo. Adaptado de ilustração feita pela Universidade de Agronomia do Estado de Iowa - EUA - (http://masters.agron.iastate.edu/classes/514/lesson05/images/white_mold_life_cycle.jpg)

2.2 – O gênero *Trichoderma*/*Hypocrea*

O gênero *Trichoderma* compreende um grupo de fungos saprófitas e micoparasitas, componentes ativos da microbiota do solo, que são amplamente utilizados como agentes de controle biológico. Espécies do gênero *Trichoderma* são derivados clonais do gênero *Hypocrea* que perderam a capacidade de completar o ciclo sexual (Anamorfos) (KUHLIS et al., 1996), como por exemplo *Hypocrea lixii* como o estado teleomorfo de *T. harzianum* (CHAVERRI et al., 2003). A subcomissão internacional de *Trichoderma/Hypocrea* (ISTH) definiram 104 espécies que foram caracterizadas em nível molecular (DRUZHININA; KOPCHINSKIY, 2015). Para facilitar a identificação das diferentes espécies de *Trichoderma* foram criadas ferramentas online, como *TrichOKey* e *TrichoBLAST* baseadas nas análises das sequências das regiões ITS1 e ITS2; dois íntrons (*tef1_int4* [longo], *tef1_int5* [curto]) e um éxon (*tef1*-exon6 [longo]) do gene que codifica o fator 1-alfa de elongação de transcrição (*tef1*); uma porção do éxon entre o 5º e o 7º motivos conservados da subunidade 2 do gene da RNA polimerase de eucariontes (*rpb2_exon*). Essa base de dados é atualizada constantemente e permite identificar virtualmente novos isolados de *Trichoderma* e classifica-los dentro de possíveis novas espécies (DRUZHININA; KOPCHINSKIY, 2015).

A maioria das espécies do gênero *Trichoderma* produzem grandes quantidades de conídios, geralmente de cor verde ou amarelado, uninucleados e ovoides. Os conidióforos são muito ramificados, semelhantes a arbustos com forma piramidal (Figura 2) (KIRK et al., 2001).

Figura 2: Morfologia característica de *Trichoderma harzianum*. **A)** Fungo crescendo sobre madeira em decomposição. **B)** Colônia crescendo em meio BDA. **C)** Conidióforos. **D)** Conídios uninucleados (SAMUELS et al., 2012).

As espécies deste gênero caracterizam-se por utilizarem uma grande variedade de compostos como fonte de carbono e nitrogênio, serem resistentes a inibidores produzidos por

outros microrganismos e tolerantes a diferentes tipos de fungicidas (KULLNIG et al., 2001). Além disso, seu rápido crescimento, produção de clamidósporos e sua elevada capacidade de degradar carboidratos estruturais e não estruturais os tornam de elevado interesse para fins de controle biológico, uma vez que estas características ecológicas os possibilitam competir, colonizar e proteger importantes pontos de entrada de patógenos nas plantas hospedeiras, como raízes, lesões e tecido em senescência (KUBICEK et al., 2001).

A habilidade de *Trichoderma* spp. em antagonizar, parasitar ou até mesmo matar outros fungos tem sido a razão para a exploração de algumas espécies (especialmente *T. harzianum*, *T. atroviride* (*Hypocrea atroviridis*), *T. virens* (*Hypocrea virens*), *T. asperellum* e *T. asperelloides*) para o controle biológico de fungos fitopatogênicos no campo (HARMAN et al., 2004). Descobertas mais recentes de que esses fungos podem também se estabelecer na rizosfera, estimular o crescimento e induzir reações de defesa em plantas, levaram a uma busca adicional na pesquisa de aplicações de *Trichoderma* como biofertilizantes (HARMAN, 2011).

Espécies de *Trichoderma* são conhecidas pela sua atividade no biocontrole contra fungos fitopatogênicos (HARMAN et al., 2004; LORITO et al., 2010; MONTEIRO et al., 2010). Essa atividade é desempenhada de várias maneiras diferentes, tais como a produção de enzimas hidrolíticas extracelular (BENÍTEZ et al., 2004) ou a produção de metabólitos secundários com atividade antifúngica (CARDOZA et al., 2011; MALMIERCA et al., 2012, 2013; TIJERINO et al., 2011).

A produção de antibióticos por *Trichoderma* é geralmente combinada com outros mecanismos de biocontrole tais como, o micoparasitismo e a produção de enzimas de degradação de parede celular, competição por nutrientes/espaco físico e indução de resistência em plantas. Espécies de *Trichoderma* são prontamente isoladas do solo por métodos convencionais e são usados na exploração biotecnológica de produção de enzimas e controle biológico (ALMEIDA et al., 2007; LOPES et al., 2012; MONTEIRO; ULHOA, 2006).

Estudos genômicos e proteômicos foram desenvolvidos para identificar novas enzimas hidrolíticas (LOPES et al., 2012; MONTEIRO et al., 2010; SEIDL et al., 2009; STEINDORFF et al., 2012), para elucidar o sinergismo entre diferentes enzimas hidrolíticas, entre enzimas hidrolíticas e antibióticos (REITHNER et al., 2005) e para investigar a sinalização celular durante a formação das enzimas de degradação de parede celular (SILVA et al., 2009; SILVA et al., 2004).

2.3 – *T. harzianum* e Micoparasitismo

Micoparasitismo é o mecanismo mais estudado para a espécie *T. harzianum* e ocorre em várias etapas, que vão desde o reconhecimento até a morte do fungo hospedeiro (BENÍTEZ et al., 2004). Durante o processo de micoparasitismo as enzimas hidrolíticas produzidas agem sinergicamente, sendo que a primeira barreira encontrada pelo fungo é a parede celular, portanto, o entendimento do processo de indução dessas enzimas se faz necessário no sentido de selecionar as linhagens de *Trichoderma* mais eficientes para o biocontrole de pragas.

O complexo processo de micoparasitismo consiste de vários eventos, incluindo reconhecimento, ataque, subsequente penetração e morte do hospedeiro (Figura 3). Durante esse processo *Trichoderma* secreta enzimas de degradação de parede celular (celulases, quitinases, glucanases, etc.), que hidrolisa a parede celular do fungo hospedeiro, subsequentemente liberando oligômeros (HOWELL, 2003; WOO et al., 2006). É provável que fatores relacionados à acessibilidade do substrato, por exemplo, proteção da parede celular, são determinantes para a degradação da parede do fungo hospedeiro e reconhecimento da própria parede. Sendo assim, um melhor entendimento da regulação das enzimas de degradação de parede celular irá ajudar a elucidar os eventos que ativam o ataque micoparasítico em *Trichoderma* (GRUBER; SEIDL-SEIBOTH, 2012).

Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura do processo de micoparasitismo de *Trichoderma harzianum* em isolado de *S. sclerotiorum*. **A** – Microscopia eletrônica de varredura do início do processo de enovelamento micoparasítico da hifa de *T. harzianum* na hifa do hospedeiro *S. sclerotiorum*. Aumento de 2.000x. **B** – Microscopia eletrônica de

varredura da fixação da hifa de *T. harzianum* na parede celular de *S. sclerotiorum* e início da formação de estruturas micoparasíticas como o apressório (seta). Aumento de 8.000x.

2.4 – Interação Planta-*Trichoderma* spp.

Algumas linhagens de *Trichoderma* podem colonizar sítios específicos localizados em raízes de plantas (METCALF; WILSON, 2001), mas linhagens rizosfera-competentes colonizam toda a superfície da raiz por semanas (THRANE; TRONSMO; JENSEN, 1997) ou meses (HARMAN, 2000). A colonização da superfície de raízes por linhagens de *Trichoderma*, às vezes apresentam características morfológicas remanescentes a aquelas vistas durante o processo de micoparasitismo, com a hifa invadindo a epiderme da raiz, sendo que a penetração do tecido radicular é geralmente limitada à primeira ou segunda camada de células (METCALF; WILSON, 2001; YEDIDIA; BENHAMOU; CHET, 1999; YEDIDIA et al., 2000).

A capacidade de *Trichoderma* spp. em induzir resistência local e sistêmica em plantas foi demonstrado em *T. harzianum* em lavouras de feijão, algodão, tabaco, alface, tomate e milho (AHMED; SÁNCHEZ; CANDELA, 2000; DE MEYER et al., 1998; HANSON; HOWELL, 2004; HARMAN et al., 2004), em *T. asperellum* com pepino (YEDIDIA; BENHAMOU; CHET, 1999; YEDIDIA; SHORESH, 2003; YEDIDIA et al., 2000) e com *T. virens* em algodão (HOWELL et al., 2000), entretanto pouco é conhecido sobre os indutores dessas respostas.

A indução de resistência em plantas por *Trichoderma* spp. tem sido pouco estudada, quando comparado com as respostas que são induzidas por rizobactérias, talvez devido ao fato dos pesquisadores que estudam *Trichoderma* tenham focado em fatores que estão associados com os efeitos diretos em outros fungos, especialmente micoparasitismo e antibiose (HARMAN et al., 2004).

Três classes de compostos produzidos por linhagens de *Trichoderma* que induzem resistência em plantas são conhecidos. Existem proteínas com função enzimática ou outras funções, homólogos de proteínas codificadas por genes de avirulência (*Avr*), oligossacarídeos e outros compostos de baixo peso molecular que são liberados de parede celular de fungos ou de plantas pela atividade de enzimas de *Trichoderma* (HARMAN et al., 2004).

2.4 Resistência Induzida em Plantas

Resistência localizada e sistêmica induzida ocorre em todas, ou na maioria das plantas, em resposta ao ataque de microrganismos patogênicos, dano físico provocado por insetos ou outros fatores, tratamento com vários produtos químicos indutores e a presença de microrganismos não patogênicos (KUC, 2001; OOSTENDORP et al., 2001).

Muitos progressos foram feitos no sentido de elucidar as vias envolvidas no processo de resistência em plantas, em vários casos, ácido salicílico ou ácido jasmônico, juntamente com etileno ou óxido nítrico, induzem a uma cascata de eventos que levam à produção de uma variedade de metabólitos e proteínas com diversas funções (HAMMERSCHMIDT; M'ETRAUX; VAN LOON, 2001; VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). Diferentes vias são induzidas por diferentes indutores, embora pareça haver uma sobreposição ou uma competição entre as vias (BOSTOCK; KARBAN; THALER, 2001).

2.6 A Família de Proteínas Cerato-Plataninas

Fungos filamentosos produzem uma gama de pequenas proteínas que são secretadas e que apresentam em suas estruturas várias cisteínas, mas as propriedades e funções dessas proteínas ainda não são bem compreendidas. Até agora algumas dessas proteínas tem sido atribuídas às famílias de proteínas, e.g. hidrofobinas e/ou Cerato-Plataninas (KUBICEK et al., 2011; MARTIN et al., 2008). A partir do banco de dados de famílias de Proteínas *Pfam* (PUNTA et al., 2010) a proteína Cerato-Platanina (CP) é descrita como o primeiro membro da “Família Cerato-Platanina” (PF07249). Essa família consiste de 44 proteínas de aproximadamente 150 resíduos de aminoácidos com alta similaridade à CP, sendo secretadas por aproximadamente 30 espécies de fungos.

CP é uma pequena proteína, de baixo peso molecular, constituída de 120 aminoácidos, moderadamente hidrofóbica sendo produzida pelo fungo Ascomiceto *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *Platani* (PAZZAGLI et al., 1999). CP compartilha algumas características estruturais e funcionais com a família das hidrofobinas: (i) baixa massa molecular; (ii) hidrofobicidade; (iii) sequência Cys – Ser – Asn está alinhada com a sequência assinatura das hidrofobinas

(Cys – Cys – Asn), exceto pela substituição conservada Cys!Ser; (iiii) alta homologia da região N-terminal de CP com a de cerato-ulmina, uma hidrofobina de *Ophiostoma* spp. (EBBOLE, 1997; WESSELS, 1994). Entretanto, CP difere das hidrofobinas por apresentar quatro cisteínas, todas envolvidas em duas pontes dissulfeto e possuir um perfil de hidropaticidade distinto, diferente das classes I e II de hidrofobinas (diferenciadas de acordo com a sua solubilidade, hidropaticidade e espaço entre as cisteínas), as quais apresentam oito resíduos de cisteínas posicionalmente conservadas das quais quatro ocorrem em duplas e são encontradas nas superfícies externas da parede celular de hifas e conídios, mediando interações entre o fungo e o ambiente (DRUZHININA et al., 2012).

Estudos estruturais de CPs baseados em Ressonância Magnética Nuclear mostraram que estas proteínas apresentam características que são similares a endoglucanases tipo “Barwin” (proteínas básicas, contendo 125 aminoácidos e seis resíduos de cisteínas que se combinam para formar três pontes dissulfeto) e expansinas de plantas, as quais estão envolvidas na extensão de parede celular. Esses estudos indicaram também um “bolso” de ligação de *N*-acetilglicosamina, tendo em vista o fato de que a quitina, que é composta de monômeros de *N*-acetilglicosamina, é um componente estrutural da parede celular de fungos (DE OLIVEIRA et al., 2011).

Algumas proteínas da família das Cerato-Plataninas foram reportadas sendo fitotoxinas ou alergênicas em humanos, provavelmente devido a sua abundante expressão, a qual se faz facilmente reconhecida pelo sistema imune (PAZZAGLI et al., 1999; YANG et al., 2009). CP também é reportada como sendo abundantemente liberada em estágios iniciais de desenvolvimento de fungos filamentosos em meio de cultura sob agitação ou ligadas à parede celular de fungos e de induzir respostas de defesa em plantas, tais como a produção de fitoalexinas e/ou morte celular em plantas hospedeiras e não hospedeiras (BODDI et al., 2004; PAZZAGLI et al., 1999; SCALA et al., 2004), como foi mostrado para Sm1 de *Trichoderma virens* e Epl-1, de *T. atroviride* homóloga a Sm1 (DJONOVIC et al., 2007; DJONOVIC et al., 2006a; SEIDL et al., 2006; VARGAS et al., 2008).

3 - Justificativa

A redução ou eliminação da aplicação de pesticidas sintéticos em agricultura é altamente desejável. Um dos meios mais promissores para se alcançar essa meta é pelo uso de

novas ferramentas baseadas em agentes biológicos no controle de pragas, indução de resistência natural em plantas contra organismos fitopatogênicos e/ou a integração dessas técnicas com menores doses de produtos químicos para o controle de patógenos de plantas, minimizando assim o impacto ambiental, a contaminação de alimentos com agrotóxicos e a consequente intoxicação de animais, produtores rurais e consumidores. Nesse sentido, recentes estudos têm mostrado que espécies de fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* apresentam várias características biológicas interessantes, tais como, micoparasitismo (principalmente com a produção de enzimas de degradação de parede celular de fungos fitopatogênicos); indução de crescimento e resistência em plantas de interesse econômico (ativação de vias metabólicas relacionadas ao desenvolvimento radicular e partes aéreas; indução de resistência local e sistêmica ao ataque de fitopatógenos); antibiose (produção de compostos voláteis e não voláteis com atividade antimicrobiana).

As principais metas deste trabalho são:

- Aumentar a compreensão do papel de determinados genes envolvidos no processo de micoparasitismo de *T. harzianum*, em função do controle do desenvolvimento de *S. sclerotiorum* e outros patógenos de plantas em lavouras de diferentes culturas;
- Melhorar o entendimento do processo de indução de resistência local e sistêmica em plantas por *T. harzianum*, no intuito de desenvolver novas tecnologias no combate a pragas, diminuindo a utilização de agrotóxicos, consequentemente seu impacto ambiental;
- Determinar o papel da proteína Epl-1 no processo de micoparasitismo, indução de resistência em plantas e produção de compostos bioativos com a finalidade de desenvolver linhagens e produtos mais eficientes no combate a fitopatógenos.

Este trabalho tem sinergia com o projeto financiado pelo CNPq "**Estudos da sinalização celular, proteômica diferencial, transcriptoma e funcionais durante o antagonismo de *T. harzianum* contra *S. sclerotiorum* durante a indução de defesa e de resistência em feijão, *Phaseolus vulgaris***", o qual envolve uma colaboração, coordenada pelo Professor Dr. Cirano José Ulhoa (UFG) com pesquisadores das Universidades de Goiás (UFG e UEG), *Durham* no Reino Unido, Brasília (UnB), Ribeirão Preto (FMRP - USP) e Embrapa (Centro de estudos do Arroz e Feijão), trabalhando para gerar conhecimentos que possam ser aplicados no desenvolvimento de novos produtos e processos biotecnológicos, aplicados para o controle de

fungos patogênicos que causam impacto devastador na produção de feijão e soja nas Regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil.

4 Objetivos

- (A) Escolha e determinação de genes de *T. harzianum* envolvidos no processo de micoparasitismo;
- (B) Nocautes de genes de *T. harzianum* para determinar seus papéis no processo de micoparasitismo em *S. sclerotiorum*;
- (C) Realizar o confronto direto, *in vitro*, de isolados mutantes de *T. harzianum* contra isolados selvagens e de isolados de *S. sclerotiorum*;
- (D) Análise do nível de expressão de genes envolvidos no processo de micoparasitismo.
- (E) Documentação do processo de antagonismo entre *T. harzianum* e *S. sclerotiorum* por microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- (F) Realizar o confronto, *in vivo*, em casa de vegetação dos isolados mutantes de *T. harzianum* contra isolados de *S. sclerotiorum*, em culturas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*);
- (G) Avaliação de atividade das principais enzimas envolvidas no processo de micoparasitismo, tanto no tipo selvagem quanto nos mutantes gerados.

5 Materiais e Métodos

5.1 Cultivo e Manutenção dos fungos

Neste estudo, foram utilizados isolados de *T. harzianum* (All-42), *S. sclerotiorum*, *Fusarium solani* e *Rhizoctonia Solani* provenientes da Coleção de fungos do Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Goiás e da EMBRAPA Arroz e Feijão respectivamente, sendo mantidos com repiques periódicos em meio BDA (10% (m/v) de batata, 1% (m/v) de glicose e 2,5% (m/v) de ágar) e estocados a 4°C. *T. harzianum* (All-42), foi crescido em meio batata-dextrose ágar (BDA) a 28 °C até esporulação, sendo

posteriormente filtrado e crescido em meio líquido. O micélio foi então congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para posterior extração de DNA genômico. *Escherichia coli* JM109 e DH-5α foram utilizadas para manipulação de DNA.

5.2 Genes de *T. harzianum* Selecionados Para Análises de Micoparasitismo

Inicialmente foram selecionados para análise os genes que codificam às proteínas Epl-1 (ID da Proteína: 508110) e Exoglucanase (ID da Proteína: 129594) de *T. harzianum*, baseado em dados preliminares obtidos pelo grupo de pesquisa citado no tópico Justificativa.

As sequências de aminoácidos e de nucleotídeos dos genes analisados neste trabalho foram obtidas a partir do banco de dados de *T. harzianum* (<http://genome.jgi.doe.gov/Triha1/Triha1.home.html>), sendo utilizados para as análises “*in silico*”, desenho de oligonucleotídeos para análise dos níveis de expressão durante ensaios de confronto direto em placa e construção do vetor de deleção.

5.3 Deleção de Genes Associados ao Micoparasitismo em *T. harzianum*

5.3.1 Deleção de *epl-1* em *T. harzianum*

As linhagens *Knockout* foram geradas a partir da linhagem selvagem de *T. harzianum* utilizando os oligonucleotídeos listados na Tabela 1. Para a construção do vetor de deleção, o gene de resistência a Higromicina B (*hph* - hygromycin B phosphotransferase-encoding) sob controle do promotor de *Aspergillus nidulans*, *gpdA* e sequência terminadora *trpC*, segundo MACH; SCHINDLER; KUBICEK, (1994), foi retirado do Vetor pRLMex30 por digestão com enzimas de restrição apropriadas e inserido em vetor pBlue-script SK+ (Stratagene, La Jolla, CA), sendo então denominado de pBShph. Para a construção do vetor de deleção de *epl-1*, 950 pb da região promotora (Epl-1 P) e 1.000 pb da região terminadora (Epl-1 T) de *epl-1* foram amplificadas utilizando DNA genômico como molde. Os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas de restrição apropriadas e clonadas em vetor pBShph (Figura 4). Foram utilizados, o vetor de deleção final (como DNA molde) e o conjunto de

oligonucleotídeos mais externos (Epl1KpnIF e Epl-1BamHIR), para gerar o cassete linear de deleção de *epl-1*.

Tabela 1: Relação dos oligonucleotídeos utilizados, sua sequência de nucleotídeos e o tamanho dos fragmentos gerados (amplicon). WT: *T. harzianum* (selvagem); $\Delta epl-1$: *T. harzianum* ($\Delta epl-1$).

Oligonucleotídeo	Sequência	Amplicon (pb)
Epl1KpnIF	ATGGGTACCGCTGTGGCGATGCTTCTCCAAGT	
Epl1XhoIR	ATGCTCGAGTTTGCCTCCTCCCTTC	950
Epl1HindIIIF	ATGAAGCTTGGTTATTGCATTGCATTGTG	
Epl1bBamHIR	ATGGGATCCTCCTTTGCCATTGCAGAATC	1000
MSEpl1F	TTGGCGATGGCTGGATACTACGAT	WT: 1090
MSEpl1R	TGCCACGTCGATCAGCTTACAAGA	<i>epl-1</i> : 3457
HphF	GCGGAGGCCATGGATGCGAT	
HphR	GCGCTTCTGCGGGCGATTTG	596
RecEpl-1MSF	ATGCAATTGTCCAGCCTC	
RecEpl-1MSF	CTTGACAGCGACCTGGC	466

As transformações dos fungos foram conduzidas com a geração de protoplasto como descrito previamente (GRUBER et al., 1990). Transformantes foram selecionados pela resistência a higromicina B (100µg/ml). Os transformantes selecionados foram analisados por PCR e por hibridização (*SouthernBlot*) utilizando o conjunto de oligonucleotídeos MSEpl-1 (Tabela – 1) para detectar aqueles com o cassete de deleção pBShphEpl-1 inserido no locus do gene *epl-1*.

Figura 4: Construção do vetor de deleção do gene *epl-1* de *T. harzianum*. **A** – Vetor pBluescript SK+ com cassete de seleção *hph* (pBSshph) com seus respectivos sítios de restrição. **B** – Vetor de deleção completo, pBSshphEpl-1 com as regiões promotora e terminadora de *epl-1* em seus respectivos sítios de clonagem.

5.3.2 Complementação de linhagem mutante de *T. harzianum* com reintegração de *epl-1* fusionado com gene que codifica à GFP

O cassete Epl-1::GFP foi construído de acordo com COLLOT et al., (2006); GOLDMAN et al., (2003) e COLABARDINI et al., (2012) (Figura 5). O sinal de GFP foi detectado com imagens de microscopia de fluorescência (aumento óptico de 40×) sob fluorescência verde obtido por iluminação com luz 480 nm e flash com duração de 750 ms. PCR do gene *epl-1* utilizando o conjunto de oligonucleotídeos RecEpl-1MS gerou fragmentos de 366 pb a partir do DNA total das linhagens selvagem e complementar (RecEpl-1-GFP) e sem produto de amplificação para a linhagem mutante de *T. harzianum* $\Delta epl-1$. Análises de RT-qPCR da expressão relativa de *epl-1* foram feitas utilizando as linhagens selvagem, mutante $\Delta epl-1$ e complementar (RecEpl-1-GFP).

Figura 5: Construção da linhagem *T. harzianum* RecEpl-1-GFP. Representação esquemática da construção do cassete de recuperação fusionado com GFP.

5.4 Ensaios de Confronto Direto em Placa

5.4.1 Ensaios de Confronto Direto em Placa entre Linhagens de *T. harzianum* e Fungos Fitopatogênicos

Para examinar inicialmente o antagonismo das linhagens (selvagem e mutante) de *T. harzianum* contra três fungos patogênicos de plantas (*S. sclerotiorum*, *R. solani* e *F. solani*), discos de meio BDA contendo colônias em crescimento ativo foram retirados dos limites de placas de culturas frescas dos fungos e colocados na superfície de placas contendo meio BDA fresco, separados por um espaço de 8 cm. As respectivas placas foram então incubadas a 25°C

com fotoperíodo de 12 h. As avaliações foram feitas quando o patógeno cobriu completamente toda a superfície da placa controle, sem *Trichoderma*. Avaliação de antagonismo foi realizada de acordo com a classificação proposta por BELL D. K., WELLS H. D., (1982) modificado (Figura 6): nota 1 – *Trichoderma* cresceu sobre o patógeno e cobriu toda a superfície do meio; nota 1,5 – *Trichoderma* ocupa 7/8 da superfície do meio; nota 2 – *Trichoderma* ocupa 6/8 da superfície do meio; nota 2,5 – *Trichoderma* ocupa 5/8 da superfície do meio; nota 3 – *Trichoderma* ocupa aproximadamente metade da superfície do meio; nota 3,5 – *Trichoderma* ocupa 3/8 da superfície do meio; nota 4 – *Trichoderma* ocupa 1/3 da superfície do meio; nota 5 – o patógeno cresce completamente sobre a linhagem de *Trichoderma*. O experimento foi conduzido com três repetições para cada linhagem de *Trichoderma*.

Figura 6: Esquema do método modificado de BELL D. K., WELLS H. D., (1982) para classificar linhagens de *Trichoderma* em ensaios de atividade antagônica em placa. TRIC. – Linhagens de *T. harzianum*. PAT. – Linhagens de patógenos.

5.5 Testes de Cultura Dupla e Microscopia Eletrônica de Varredura

Discos de meio BDA (5 mm de diâmetro) foram retirados da extremidade de colônias em crescimento ativo de culturas frescas das linhagens *T. harzianum* e *S. sclerotiorum* e

colocados na superfície de placas contendo meio BDA. As placas foram incubadas a 28° C e após 24 h de contato, amostras de micélio da região de interação foram coletadas e examinadas por MEV. As amostras de micélio, retiradas da região de interação de cultura dupla foram fixadas por 2 h a 4° C em 2% (v/v) de glutaraldeído e 2% (w/v) de tetróxido de ósmio no mesmo tampão. As espécimes foram então lavadas com tampão e desidratadas em 30-100% (v/v) de álcool, ponto crítico seco em CO₂ seguido de banho de ouro.

5.6 Manipulações de DNA/RNA

Todas as manipulações de DNA foram realizadas de acordo com técnicas padrão (SAMBROOK; FRISCH; MANIATIS, 1989). Para as hibridizações (*SouthernBlot*), DNAs genômicos foram hibridizados em tampões contendo 40% de formamida. Membranas com os respectivos DNAs genômicos foram pré-hibridizadas e hibridizadas a 42°C por 2 e 12 h, respectivamente. As membranas foram então lavadas duas vezes com tampão salino citrato de sódio 2X (SSC [SSC 1X – 0.15 M NaCl + 0.015 M de citrato de sódio]) e 0.1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) por 5 min. cada à temperatura ambiente e duas vezes com 0.5X SSC e 0.1% SDS por 15 min. cada a 65°C. A sonda foi obtida por amplificação de PCR a partir de DNA genômico utilizando o conjunto de oligonucleotídeos MSEpl1 (Tabela 1) e marcados utilizando o kit digoxigenina (DIG) de marcação de DNA (Roche, Mannheim, Germany) seguindo as instruções do fabricante. Marcação, hibridização e detecção imunológica foram conduzidas com marcação não radioativa e kit de detecção imunológica com substrato de detecção quimioluminescente CDP Star (Roche, Mannheim, Germany), como descrito em CARDOZA et al., (2011).

RNA total foi isolado a partir do micélio de cada amostra usando kit RNA TRIzol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de RNA foram determinadas por espectrofotometria OD 260/280 e a integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%.

5.7 Ensaios em Plantas

5.7.1 Ensaios em Plantas de Feijão

O crescimento de plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) foi conduzido em triplicata usando 10 plantas para cada replicata experimental sob duas condições (1 – com *T. harzianum* WT – condição controle e 2 - com *T. harzianum* $\Delta epl-1$), totalizando 60 plantas. A superfície de sementes de *P. vulgaris* foi esterilizada por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% de clorina ativa por sete minutos, seguido por três lavagens com água autoclavada, sendo um minuto cada lavagem. Após a esterilização, as sementes foram germinadas em placas de petri de vidro estéreis contendo 2% de agar – 2% de glicose, previamente autoclavados. As sementes foram mantidas em câmara de germinação BOD a 28° C com fotoperíodo de 16 horas de luz/ 8 horas de escuridão. Após quatro dias, as sementes foram colocadas em um sistema de cultivo hidropônico, similar ao descrito por DJONOVIC et al., (2006) e YEDIDIA; BENHAMOU; CHET, (1999). Tubos cônicos de 50mL adaptados foram colocados em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio Murashige e Skoog (MS) adicionado solução vitamínica Gamborg's preparada de acordo com as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich, Co., Wisconsin, USA) e selado com filme de plástico. Este sistema foi desenvolvido para permitir a germinação, crescimento e a interação das plantas de feijão com as linhagens de *Trichoderma* e o contato das sementes com o meio com imersão parcial. As sementes foram crescidas com um fotoperíodo de 16 horas de luz por 4 dias em câmara de germinação BOD com agitação branda. Após esse período, o meio foi substituído por meio MS fresco acrescido de 0.05% de sacarose e inoculado com 10^7 esporos/mL de *Trichoderma* de cada linhagem, diretamente nas raízes das plântulas. As folhas e raízes foram coletadas após 24, 48 e 72 h após a inoculação, sendo estocadas a -80° C até a extração de RNA. Como controle, um grupo de plantas foram crescidas na ausência de isolados de fungos.

5.8 Análises de qRT-PCR

5.8.1 Análises de Expressão em Genes de Micoparasitismo de *T. harzianum*

No sentido de coletar micélio da zona de interação, ensaios de confronto direto foram

realizados em placa contendo meio BDA, cobertas com folhas de papel celofane estéreis. Isolados de *T. harzianum* selvagem e mutante foram testados contra isolados de *S. sclerotiorum*. Discos de agar retirados de colônias em crescimento de cada fungo foram colocados em lados opostos de placas de 9 cm de diâmetro e incubados a 28°C com fotoperíodo de 12 h, como descrito em CARSOLIO et al., (1994). Os micélios foram coletados antes do contato entre eles, no momento do contato (após 4 dias) e quando a zona de interação apresentava aproximadamente 1 cm (após 7 dias). Os ensaios de confronto foram feitos como se segue: (1) - *T. harzianum* (wt) x *T. harzianum* (wt) como placa controle; (2) - *T. harzianum* (wt) x *S. sclerotiorum*; (3) - *T. harzianum* (wt) x *T. harzianum*- Δ *epl-1* e (4) - *T. harzianum*- Δ *epl-1* x *S. sclerotiorum*.

Aproximadamente 0.5 µg de RNA foram isolados dos micélios provenientes dos ensaios de confronto em placa, tratados com DNase I (Thermo scientific, Fermentas, Vilnius, Lithuania) e transcritos ao reverso para cDNA usando o kit First Strand cDNA Maxima™ Synthesis, de acordo com instruções do fabricante. Os cDNAs foram diluídos 1/50 e usados para análises de PCR em tempo real no Sistema Bio-Rad CFX96™ utilizando SsoFast™ Eva Green® Supermix (Bio-Rad, San Francisco, CA, USA) para detecção do sinal, de acordo com as instruções do fabricante. Gene que codifica α -actina (*act*) foi usado como controle endógeno (*housekeeping*) de acordo com STEIGER; MACH; MACH-AIGNER, (2010). Foi usado o seguinte programa de amplificação: 95°C por 10 minutos, seguido por 39 ciclos de 95°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos, seguido por uma curva de dissociação de 60°C a 95°C com um incremento de 0.5°C por 10 segundos. Os valores de expressão gênica foram calculados de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando *T. harzianum* x *T. harzianum* (sem contato) como amostra de referência. As análises de expressão gênica foram conduzidas com três replicatas biológicas e técnicas. As análises dos dados foram feitos utilizando o programa GraphPad Prism v 5.1.

5.8.2 Análise de Expressão de Genes de Defesa em Plantas de Feijão

As extrações de RNA dos tecidos de raízes foram realizadas usando *Mini Spin kit* Invitrap® para RNA de Plantas – (Invitex, Berlin, Germany), de acordo com instruções dos fabricantes. A integridade dos RNAs foi analisada por eletroforese em gel de agarose

desnaturante a 1%. Um total de 5µg de RNA isolado de cada amostra foi tratado com DNase I (Fermentas, Lilnius, Lithuania) e então a transcrição ao reverso para cDNA foi realizada na presença de oligo (dT), em um volume final de reação de 20µL usando o kit de síntese de cDNA *Revertaid First Strand* (Fermentas). Os cDNAs foram diluídos em 80 µL de água e usadas como molde para as reações de qPCR. Cada reação continha 10 µL do kit para PCR *MAXIMA®SYBR-Green Master Mix* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 500 nM de cada oligonucleotídeo, 10 µL de cDNA e água livre de nucleases. Os experimentos foram realizados em triplicatas para cada amostra e para os tempos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação das linhagens de *Trichoderma*. Os transcritos de *β-actina* foram usados como referência interna para normalizar a quantidade total de RNA presente em cada reação. Os níveis de expressão dos genes foram calculados a partir do ciclo limiar (*threshold*) de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os experimentos foram conduzidos em triplicata para cada amostra e os resultados foram comparados por ANOVA one-way com teste de Dunnett ($\alpha = 5\%$) para analisar as diferenças entre as condições relacionadas e o controle usando GraphPad Prism versão 5.00 para Windows. Cinco genes foram analisados: *chit*, o qual codifica para uma quitinase; *glu1*, que codifica para uma β -1,3-glucanase; *pod3* que codifica para uma peroxidase; *lox1*, que codifica para uma lipoxigenase e *pal*, o qual codifica para uma fenilalanina amônia liase.

As condições dos ciclos foram 10 minutos a 95 ° C (1 ciclo), 15 segundos a 95 ° C seguido por 1 minuto a 60 ° C (40 ciclos), seguido das condições de curva de desnaturação: 10 segundos a 95 ° C, seguido por 1 minuto a 60 ° C e uma rampa final até 90° C com coleta contínua de dados (1 ciclo) para observação da formação de dímeros de oligonucleotídeos e amplificação não específica. Foi usado o sistema *Step One Plus software TM Real-Time PCR* Applied Biosystems® (Foster City, CA, USA).

6 Resultados

6.1 Análises “*in silico*” de *epl-1* em *T. harzianum*: Características e Provável Sistema de Regulação

Neste trabalho, através de análises *in silico*, nós determinamos que o gene *epl-1* em *T. harzianum* (ID: 508110) codifica uma proteína de 138 aminoácidos, com 100% de similaridade com Epl-1 de *T. viride* (*Hypocrea rufa*) e 94% de identidade com Sm1 de *T. harzianum* descrita por FREITAS et al., (2014). O gene apresenta uma sequência transcrita de 691 pb e uma região codificante (ORF) de 417 pb com um intron de 64 pb. De acordo com o programa ExPASy – ProtParam (GASTEIGER et al., 2003), essa proteína apresenta um peso molecular teórico de 14356.1 Da e PI – 6.23. Os primeiros 18 aminoácidos correspondem a um peptídeo sinal para secreção.

Análises da sequência de aminoácidos de Epl-1 de *T. harzianum*, utilizando o programa NetOGlyc 3.1, indicou um potencial sítio de *O*-glicosilação (Figura 7A), porém não foram detectados sítios para *N*-glicosilação (dados não mostrados). Além disso, foram observados sete potenciais sítios de *O*- β -*N*-acetil-glicosilação através do programa YinOYang 1.2 (Figura 6B) e cinco sítios de fosforilação utilizando o programa NetPhos 2.0. (Figura 6C).

Figura 7: Análise *in silico* da sequência de Epl-1 de *T. harzianum*. **A** – Análise de potenciais sítios de *O*-glicosilação na sequência de Epl-1 de *T. harzianum*. A linha vermelha horizontal indica o potencial limiar (*threshold*) de *O*-glicosilação. As linhas verticais azuis indicam a posição do sítio na sequência da proteína. Sítios com linhas verticais azuis que ultrapassam a linha vermelha *threshold* representam potenciais sítios de *O*-glicosilação. **B** - Análise de potenciais sítios de *O*- β -*N*-Acetil-glicosilação na sequência de Epl-1 de *T. harzianum*. A linha azul horizontal indica o potencial limiar (*threshold*) de *O*- β -*N*-Acetil-glicosilação. As linhas verticais verdes indicam a posição do sítio na sequência da proteína. Sítios com linhas verticais verdes que ultrapassam a linha azul *threshold* representam potenciais sítios de *O*- β -*N*-Acetil-glicosilação. **C** - Análise de potenciais sítios de fosforilação na sequência de Epl-1 de *T. harzianum*. A linha cinza horizontal indica o potencial limiar (*threshold*) de fosforilação. As linhas verticais coloridas indicam o potencial aminoácido e a posição do potencial aminoácido na sequência da proteína. Sítios com linhas verticais coloridas que ultrapassam a linha cinza *threshold* representam potenciais sítios de fosforilação.

Para verificar a presença de motivos regulatórios putativos no gene *epl-1* de *T. harzianum*, 2105 pb a jusante (*upstream*) do códon de iniciação ATG e 2000 pb a vazante (*downstream*) do códon de terminação ATT foram analisados usando o programa SCOPE (CARLSON et al., 2007) (Figura 8). Análises da região 5' revelaram dois sítios TATAA Box e quatorze sítios CAAT Box relacionados à iniciação de transcrição (TILBURN et al., 1995). Foram encontradas na região promotora do gene *epl-1* de *T. harzianum*, apenas uma das quatro sequências requeridas para ligação putativa de proteínas regulatórias envolvidas no processo de micoparasitismo (MYC) ou Myres (Elementos de Resposta de Micoparasitismo – *Mycoparasitism Response Elements*) (MYC1 – 5'-GCTTCA-3') (CORTES et al., 1998). Essa região apresenta também seis cópias da sequência consenso (5'-SYGGRG-3') a qual está

associada com a ligação do repressor catabólico de carbono de *Aspergillus nidulans* CREA (KULMBURG, P., MATHIEU, M., DOWZER, C., KELLY, J., AND FELENBOK, 1993; SOPHIANOPOULOU et al., 1993); uma cópia do motivo 5'-HGATAR-3', o qual media a regulação global de nitrogênio (KUDLA et al., 1990; MINEHART; MAGASANIK, 1991; RAVAGNANI et al., 1997); três cópias do motivo 5'-GCCARG-3', o qual é um sítio de reconhecimento para a proteína de regulação em função do pH, PacC em *Aspergillus* spp. (TILBURN et al., 1995) e o pentanucleotídeo CCCCT (C4T) relacionado com a regulação de elementos de resposta ao estresse (STRE – *Stress Response Elements*) em fungos (CORTES et al., 1998; KOBAYASHI; MCENTEE, 1993; MARCHLER et al., 1993). A análise da região 3' permitiu a identificação de cinco sítios putativos de poliadenilação (AAATA) porém sem nenhum motivo TAAATAA.

Figura 8: Representação dos prováveis motivos de regulação na região promotora do gene *epl-1* de *T. harzianum*. Os números indicam a posição relativa ao códon de iniciação de tradução. Setas indicam a orientação do motivo nas fitas senso (5' → 3') e antisense (5' ← 3') respectivamente.

6.2 Deleção e Recuperação do gene *epl-1* em *T. harzianum* e Seleção de Transformantes

A estratégia para produção de mutantes *knockout* do gene *epl-1* foi baseada na recombinação homóloga por dupla sobreposição cruzada (*cross-over*). Portanto, protoplastos de *T. harzianum* (All-42) foram transformados com um DNA linear incluindo um cassete de expressão de higromicina B, flanqueado por dois fragmentos homólogos às regiões 5' e 3', como descrito em Materiais e Métodos. Análises de PCR da região do gene *epl-1* de transformantes mitoticamente estáveis, utilizando o conjunto de oligonucleotídeos MSEpl-1 (Tabela – 1 e Figura 9A) mostraram bandas correspondentes, ao gene da linhagem selvagem (1.090 pb); ao cassete de deleção completo (3.457 pb) e do gene para resistência a higromicina B (*hph* 600 pb) (Figura 9B e C respectivamente).

Figura 9: Esquema de seleção de transformantes. **A** – Representação esquemática da região genômica contendo o gene *epl-1* e os respectivos sítios de anelamento do conjunto de oligonucleotídeos para seleção de mutantes (MSEpl-1) (setas negras). **B** – Seleção de mutantes: Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação por PCR do gene *epl-1*. WT – *T. harzianum* linhagem selvagem (1090 pb); 1 – 12 – Seleção de transformantes $\Delta epl-1$ mitoticamente estáveis (3457 pb). **C** – Eletroforese em gel de agarose do gene de resistência a higromicina B (*hph*) para seleção de mutantes. WT – *T. harzianum* linhagem selvagem (sem amplificação); 1 - 12 - Seleção de transformantes $\Delta epl-1$ mitoticamente estáveis (600pb). Indivíduos marcados com retângulos laranja foram selecionados para análises adicionais. (1kb) Marcador de peso molecular. Seis transformantes que apresentaram bandas para o

cassete de deleção completo e *hph* foram selecionados e um deles foi escolhido para análise de hibridização (*Southern blot*).

O DNA total isolado e digerido com endonuclease *EcoRV* apresentou dois padrões de hibridização para a linhagem selvagem (800 pb e aproximadamente 1.500 pb) (Figura 10A e C) e um padrão de hibridização para a linhagem mutante $\Delta epl-1$ (aproximadamente 4.500 pb) (Figura 10A e C). A deleção de *epl-1* ($\Delta epl-1$) também foi confirmada por análises de PCR quantitativa em tempo real (RT – qPCR).

Figura 10: Análises de hibridização (*Southern blot*). **A** – Representação do gene *epl-1* na linhagem selvagem de *T. harzianum* com os sítios de restrição *EcoRV*; os fragmentos formados após a digestão com seus respectivos tamanhos (linhas verticais em negro); e os sítios de anelamento para o conjunto de oligonucleotídeos (MSEpl-1) usados para construção da sonda e hibridização. **B** – Representação do cassette de deleção de *epl-1* com os sítios de restrição *EcoRV*; o fragmento formado após a digestão com seu respectivo tamanho (linha vertical em negro); e o sítio de anelamento do conjunto de oligonucleotídeos para a hibridização da sonda. **C** – Análise de hibridização (*Southern blot*) do DNA total das linhagens selvagem (Th – WT) e mutante $\Delta epl-1$ (T. h - $\Delta Epl-1$) de *T. harzianum* digeridos com endonuclease *EcoRV*; (λ HindIII) Marcador de Peso Molecular Lambda digerido com endonuclease *HindIII*.

Subsequentemente, a linhagem mutante *T. harzianum* $\Delta epl-1$ foi complementada com o gene *epl-1* fusionada com o gene que codifica a proteína fluorescente verde (*GFP*) (Figura

11A). Os transformantes *T. harzianum epl-1* complementares (RecEpl-1-GFP) foram selecionados pela sua habilidade em crescer em meio mínimo, livre de uridina e uracila; sinal de GFP em imagens de microscopia de fluorescência (Figura 11B); PCR e eletroforese do produto de amplificação do gene *epl-1* (Figura 11C); e análises de RT-qPCR da expressão relativa de *epl-1* de todas as linhagens de *Trichoderma* (Figura 11D), como descrito em Materiais e Métodos.

Figura 11: Construção da linhagem complementar *T. harzianum* RecEpl-1-GFP. **A** – Representação esquemática da construção do cassete de recuperação fusionado com GFP. **B** – Microscopia de fluorescência da linhagem *T. harzianum* RecEpl-1-GFP (aumento óptico de 40×). **C** – Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação do gene *epl-1*. WT – linhagem selvagem de *T. harzianum* (466 pb); ThΔEpl-1 – linhagem mutante Δ*epl-1* de *T. harzianum* (sem produto de amplificação); Th RecEpl-1-GFP – linhagem *epl-1* complementar de *T. harzianum* (466 pb). Marcador de peso molecular – 1kb. **D** – Níveis de expressão relativa (linear) do gene *epl-1* nas diferentes linhagens de *T. harzianum*. (Th) linhagem selvagem de *T. harzianum*; (Δ*epl1*) linhagem mutante Δ*epl1* de *T. harzianum*; (RecEpl-1) linhagem complementar de *T. harzianum* RecEpl-1-GFP; (ND) Não detectado.

6.3 Proteína Epl-1 não é Essencial para o Potencial Antagônico de *T. harzianum*

Foram realizados ensaios “*in vitro*” do potencial antagônico das linhagens de *T. harzianum* contra três patógenos de plantas (*S. sclerotiorum*, *R. solani* e *F. solani*), para classificar as linhagens (BELL D. K., WELLS H. D., 1982 - método modificado), como descrito na seção Materiais e Métodos. A deleção do gene *epl-1* em *T. harzianum* aparentemente não afetou sua habilidade em antagonizar patógenos de plantas, indicando que essa proteína não é essencial para o reconhecimento do hospedeiro. As linhagens selvagem e mutante foram classificadas como “Eficientes” contra todas as linhagens de fitopatógenos testadas, mostrando sinais de hiperparasitismo de ambas as linhagens (selvagem e mutante $\Delta epl-1$) de *Trichoderma*, sendo possível observar uma discreta melhora na avaliação de antagonismo na linhagem mutante contra *R. solani*, comparado com a linhagem selvagem (Figura 12).

Figura 12: Ensaio *in vitro* do potencial antagônico em confronto direto em placa. (Th) *T. harzianum* selvagem; (Δ Epl1) *T. harzianum* Δ epl-1; (Ss) *S. sclerotiorum*; (Rs) *R. solani*; (Fs) *F. solani*.

6.4 Proteína Epl-1 de *T. harzianum* é Transportada por Vesículas e Conduzida Predominantemente para a Parede Celular

Análises de microscopia de fluorescência da linhagem de *T. harzianum* que expressa Epl-1 fusionada com GFP, através da técnica de *time lapse*, mostrou um intenso e dinâmico fluxo de vesículas contendo Epl-1 através da hifa do fungo na presença do patógeno *S.*

sclerotiorum. Também foi possível observar a fusão dessas vesículas na membrana plasmática e posterior secreção e acúmulo de Epl-1 na parede celular de *Trichoderma* (Figura 13).

Figura 13: Análises de microscopia de fluorescência de Epl-1 fusionada com GFP. **A** – Microscopia de fluorescência da hifa da linhagem RecEpl-1-GFP de *T. harzianum* em aumento óptico de 20x. **1** – Campo claro; **2** - GFP; **3** – Sobreposição. **B** - Microscopia de fluorescência da hifa da linhagem RecEpl-1-GFP de *T. harzianum* em aumento óptico de 40x. **1** – Campo claro; **2** - GFP; **3** – Sobreposição. A seta indica o predomínio de Epl-1 na região de parede celular e seu transporte através da hifa por vesículas.

6.5 Proteína Epl-1 de *T. harzianum* está envolvida no reconhecimento e no processo de enovelamento micoparasítico da hifa no hospedeiro

A interação entre linhagens de *T. harzianum* e *S. sclerotiorum* foi analisada utilizando MEV. Na zona de interação entre linhagens selvagens de *T. harzianum*, foi possível observar uma massa micelial homogênea sem degradação de hifa aparente (Figura 14A). Na zona de interação entre as linhagens selvagem e mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum*, foi possível observar uma clara linha de interação separando ambas as linhagens, além da presença de detritos provenientes de uma provável degradação enzimática das hifas, indicando um não

reconhecimento entre ambos os isolados (Figura 14B). A característica de auto reconhecimento foi reestabelecida na interação entre as linhagens RecEpl-1-GFP, as quais apresentaram crescimento paralelo das hifas entre os dois isolados e não foi observado detritos de degradação (Figura 14C).

Figura 14: Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV). **A** – Análises de MEV da interação entre linhagens selvagem de *T. harzianum* (T). **1** – Placa de dupla cultura de isolados selvagem de *T. harzianum*. **2** – Análises de MEV da interação de isolados selvagens de *T. harzianum*. Voltagem de aceleração de 2.5 kV; aumento de 250X. **3** – Análises de MEV da interação entre isolados selvagem de *T. harzianum*. Voltagem de aceleração 2.5 kV; aumento de 500X. **B** – Análises de MEV da interação entre linhagens selvagem (T) e mutante $\Delta epl-1$ ($\Delta epl-1$) de *T. harzianum*. **1** – Placa de dupla cultura de linhagens selvagem e mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum*. **2** – Análises de MEV da interação de linhagens selvagem e mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum*. Voltagem de aceleração de 2.5 kV; aumento de 250X. **3** – Análises de MEV da interação entre linhagens selvagem e mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum*. Voltagem de aceleração 2.5 kV; aumento de 500X. **C** – Análises de MEV da interação entre isolados de

T. harzianum RecEpl-1-GFP (RecEpl-1-GFP). **1** – Placas de duplo cultivo de isolados de *T. harzianum* RecEpl-1-GFP. **2** – Análises de MEV da interação de isolados de *T. harzianum* RecEpl-1-GFP. Voltagem de aceleração 30 kV; aumento de 250X. **3** – Análises de MEV da interação de isolados de *T. harzianum* RecEpl-1-GFP. Voltagem de aceleração 30kV; aumento 500X. Barras = 500 µm e 100 µm.

Na interação entre a linhagem selvagem de *T. harzianum* e *S. sclerotiorum*, foi observado o típico processo de micoparasítico de *Trichoderma* com o enovelamento da hifa em torno do hospedeiro (Figura 15A). Interessantemente, nota-se o processo de interação micoparasítica entre a linhagem *T. harzianum* $\Delta epl-1$ e *S. sclerotiorum*, porém o típico enovelamento da hifa não foi observado (Figura 15B). Além disso, a capacidade de enovelamento da hifa de *Trichoderma* foi reestabelecida na interação entre a linhagem *T. harzianum* RecEpl-1-GFP com *S. sclerotiorum* (Figura 15C), indicando que a Epl-1 interfere diretamente no processo de micoparasitismo. Resultados similares foram observados durante a interação entre linhagens de *T. harzianum* e *R. solani* (dados não mostrados).

Figura 15: Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV). **A** – Análises de MEV da interação entre linhagem selvagem de *T. harzianum* (T) e *S. sclerotiorum* (Ss). **1** – Placa de dupla cultura de linhagem selvagem de *T. harzianum* e *S. sclerotiorum*. **2** – Análises de MEV da interação de linhagem selvagens de *T. harzianum* e *S. sclerotiorum*. Voltagem de aceleração de 5 kV; aumento de 900X. **B** – Análises de MEV da interação entre linhagem mutante $\Delta Epl-1$ ($\Delta Epl-1$) de *T. harzianum* e *S. sclerotiorum* (Ss). **1** – Placa de dupla cultura de linhagem mutante $\Delta Epl-1$ de *T. harzianum* e *S. sclerotiorum*. **2** – Análises de MEV da interação de linhagens mutante $\Delta Epl-1$ de *T. harzianum* e *S. sclerotiorum*. Voltagem de aceleração de 5 kV; aumento de 900X. **C** – Análises de MEV da interação entre isolados de *T. harzianum* RecEpl-1-GFP (RecEpl-1-GFP) e *S. sclerotiorum*. **1** – Placas de duplo cultivo de isolados de *T. harzianum* RecEpl-1-GFP e *S. sclerotiorum*. **2** – Análises de MEV da interação

de isolados de *T. harzianum* RecEpl-1-GFP. Voltagem de aceleração 5 kV; aumento de 900X. Barra = 20 μ m.

6.6 Ausência de Epl-1 Afetam os Níveis de Expressão de Genes de Micoparasitismo em Confronto Direto

Ensaio de confronto direto foram realizados entre linhagens de *T. harzianum* e *S. sclerotiorum*. RNAs miceliais da área de confronto foram isolados antes (BC), Durante (C) e após o contato das hifas (AC) (Figura 16).

Figura 16: Ensaio de confronto direto. (T) *T. harzianum* selvagem; (Δ Epl-1) *T. harzianum* Δ epl-1; (S) *S. sclerotiorum*; BC – Antes do contato das hifas; C – Contato das hifas; AC – Após o contato das hifas.

Os níveis de expressão relativa de *epl-1* e onze genes marcadores de micoparasitismo foram analisados para determinar o efeito de Epl-1 na modulação da expressão de genes de micoparasitismo. No confronto entre as linhagens selvagem e mutante Δ epl-1 de *T. harzianum*, oito genes foram induzidos, dos quais *exg1*, fosfatase ácida, *chit42*, *papA* e *PRA1* foram os mais proeminentes.

Figura 17: Expressão relativa de genes de *T. harzianum* relacionados ao micoparasitismo em ensaios de confronto direto em placa contra isolados de *S. sclerotiorum*. (T) *Trichoderma harzianum* (WT), (S) *Sclerotinia sclerotiorum*, (Δ Epl1) *T. harzianum* Δ epl1, (BC) antes do contato das hifas, (C) após o contato das hifas, (ND) não detectado. Os dados foram apresentados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figura 18: Expressão relativa de genes de *T. harzianum* relacionados ao micoparasitismo em ensaios de confronto direto em placa contra isolados de *S. sclerotiorum*. (T) *Trichoderma harzianum* (WT), (S) *Sclerotinia sclerotiorum*, ($\Delta Epl1$) *T. harzianum* $\Delta epl1$, (NC) antes do contato das hifas, (C) após o contato das hifas, (ND) não detectado. Os dados foram apresentados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Em relação ao confronto entre as linhagens selvagem e mutante $\Delta epl1$ de *T. harzianum* e *S. sclerotiorum*, todos os genes analisados mostraram notáveis diferenças em seus níveis de expressão, indicando uma percepção alterada do hospedeiro e de si mesmo (Figuras 17 e 18). A expressão gênica entre as condições C e AC não foram significativamente diferentes ($p > 0.05$) (dados não mostrados).

Os dados de expressão de qPCR foram usados para gerar *heat maps* para determinar os efeitos da deleção de *epl1* na modulação da expressão de genes de micoparasitismo utilizando o programa Mev MultiExperiment Viewer (SAEED et al., 2003). Na condição BC, apesar das expressões gênicas relativamente estáveis com leves variações, diferenças significativas foram observadas na modulação dos genes em todas as condições analisadas (Figura 19A).

Figura 19: *Heat map* e categorização de grupos da expressão de genes relacionados ao micoparasitismo de *T. harzianum*. **A** – *Heat map* das análises de expressão de qPCR de genes de micoparasitismo antes do contato das hifas. **B** – *Heat map* das análises de expressão de qPCR de genes de micoparasitismo após o contato das hifas. Th – *T. harzianum* wild type; $\Delta epl-1$ – *T. harzianum* $\Delta epl-1$; Ss – *S. sclerotiorum*.

Entretanto, no momento AC, as diferenças na modulação da expressão dos genes se tornaram mais evidentes, como observado nos confrontos entre as linhagens selvagem e mutante de *Trichoderma* e *Trichoderma* vs. *Sclerotinia* (Figura 19B). Outro dado relevante foi o agrupamento dos genes de acordo com seu padrão de expressão. Para a condição BC, três grupos distintos foram formados: Grupo 1 (*PRA1* e *sprT*), Grupo 2 (*epl-1* e *gh92*) e Grupo 3 (*nag1* e *chit33*), o genes restantes apresentaram perfis de expressão diferentes (Figura 19A). E para a condição AC foram formados os seguintes grupos: Grupo 1 (*epl-1* e *gh92*); Grupo 2 (*PRA1*, *fosfatase ácida* e *chit42*) e Grupo 3 (*phyAT*, *papA*, *mutAW*, *nag1* e *chit33*) (Figura 19B).

6.7 Análises da expressão de genes relacionados à defesa em plantas de feijão foi modificado por Epl-1

Neste estudo, os efeitos de Epl-1 de *T. harzianum* em elicitar a expressão de cinco genes relacionados à defesa em plantas de feijão foram analisados 24 h após a inoculação de ambas as linhagens, selvagem em mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum*. Plantas sem o inóculo de *Trichoderma* foram usadas como controle. A razão entre os níveis de expressão de plantas inoculadas com a linhagem mutante em relação à selvagem apresentou uma indução dos genes *lox* e *glu* (19.1 e 6.5 vezes respectivamente) (Figura 20). Também foi observada a indução do gene *pod3* 72 h após a inoculação (dados não mostrados).

Figura 20: Análise da razão de expressão (*fold change*) de genes relacionados à defesa em raízes de feijão comum, 24 h após inoculação com as linhagens selvagem e mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum*. CHIT - *bch1*; GLU - *glu1*; LOX – *lox*; PAL – *pal*; PER - *pod3*. Os dados foram apresentados usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

7 Discussão

A bioquímica e a genética do processo de micoparasitismo têm sido amplamente estudadas em várias espécies de *Trichoderma*, devido a sua importância como agentes de controle de pragas na agricultura. Várias enzimas, proteínas e efetores envolvidos no reconhecimento de fungos e respostas micoparasíticas foram identificados (KUBICEK et al., 2011; MONTEIRO et al., 2010; OMANN et al., 2012). Neste estudo, a proteína Epl-1 de *T. harzianum*, um fator de virulência que induz defesa local e sistêmica em plantas, foi constatado ser importante durante a interação com ele mesmo e com diferentes organismos hospedeiros e que desempenha um papel essencial no processo de micoparasitismo, afetando o auto reconhecimento de *T. harzianum*, regulando a expressão de genes relacionados com o micoparasitismo, modulando o envelhecimento micoparasítico e a indução de genes relacionados à defesa em plantas de feijão.

Proteínas da família CP estão envolvidas no crescimento, desenvolvimento, reconhecimento, adesão, morfogênese de parede celular de fungos (PAZZAGLI et al., 2009), antagonismo (FRISCHMANN et al., 2013) e parasitismo (YU et al., 2012). Entretanto, poucos dados sobre a função primária das CPs estão disponíveis. O membro da CP analisado

nesse estudo apresentou 100% de identidade com Epl-1 de *Trichoderma viride* (*Hypocrea rufa*) e 94% de identidade com Sm1 de *T. harzianum* descrita por FREITAS et al., (2014). FRISCHMANN et al., (2013) descreveram três genes de *epl* no genoma de *T. atroviride* onde, *epl-1* foi predominantemente expresso durante o crescimento da hifa, *epl-2* durante a formação de esporos, sugerindo que essas duas proteínas estão envolvidas em diferentes processos biológicos e a expressão de *epl-3* não foi detectada sob a maioria das condições de crescimento. Os autores também argumentaram que o “*knockout*” simples e duplo dos genes *epl-1* e *epl-2* não revelaram um fenótipo detectável, indicando que essas proteínas não são essenciais para o crescimento e desenvolvimento do fungo. Assim, considerando seu alto grau de homologia quando comparado com diferentes espécies e a presença de algumas dessas proteínas na parede celular de fungos, sugere que essas proteínas podem ter um importante papel no estilo de vida do fungo (FRISCHMANN et al., 2013).

No presente trabalho, a expressão do gene *epl-1* foi fortemente induzida, especialmente durante a condição C, sendo esses dados consistentes aos constatados para expressão de Epl-1 durante o confronto entre *T. atroviride* e *R. solani* (SEIDL; DRUZHININA; KUBICEK, 2006). Assim, nós construímos uma linhagem mutante (*T. harzianum* $\Delta epl-1$) para determinar as consequências da ausência dessa proteína durante o processo de interação com sigo mesmo e com plantas e patógenos hospedeiros. Além disso, nós construímos uma linhagem de *T. harzianum* *epl-1* complementar (RecEpl-1-GFP) utilizando a proteína Epl-1 fusionada com GFP para análises complementares e para determinar a sua localização celular e dinâmica de transporte sob condições de confronto.

Comparações de sequências de DNA que flanqueiam a região promotora de genes co-regulados podem ser úteis para identificar sequências regulatórias conservadas; tais regiões poderiam ser sítios de ligação para ambos; proteínas específicas e reguladoras (CORTES et al., 1998; GWYNNE et al., 1987). Assim, nós identificamos motivos e elementos promotores que poderiam estar envolvidos na regulação de *epl-1* e/ou modificações em *T. harzianum*. CORTES et al., (1998), descreveram quatro motivos relacionados à MYC nas regiões promotoras dos genes de *ech42* e *prb1* em *T. atroviride* (MYC1, MYC2, MYC3 e MYC4). LORITO et al., (1996), propôs um modelo o qual sequências alvos para o regulador CreA em *Aspergillus nidulans* (o qual corresponde ao Cre1 em *T. harzianum*) e complexos específicos para micoparasitismo, se sobrepõem ou estão bem próximos no genoma. Nesse estudo, análises *in silico* da região promotora do gene *epl-1* de *T. harzianum* indicou um dos motivos

relacionados à MYC (MYC1), o qual estava presente em quatro cópias e sempre próximo à sequência de CreA (Figura 7); sendo assim um possível alvo para regulação de MYC. Porém, análises adicionais serão necessárias para confirmação desse aspecto. Além disso, a presença de sequências de resposta ao estresse (C4T) (CORTES et al., 1998; KOBAYASHI; MCENTEE, 1993; MARCHLER et al., 1993), poderiam explicar a rápida indução de *epl-1* observada em dados de qPCR a partir de confronto direto em placas contra *S. sclerotiorum*, o qual corresponde à uma condição de estresse e devido a presença de indutores provenientes da parede celular do patógeno, como descrito para outros genes (CORTES et al., 1998; FLORES; CHET; HERRERA-ESTRELLA, 1997). Outro dado *in silico* interessante é o sítio de *O*- β -N-Acetil-glicosilação na sequência da proteína Epl-1 (Figura 6B), considerando que proteínas da família CP exibem atividade de ligação a oligossacarídeos e que os resíduos envolvidos nesse processo são bem conservados (DE OLIVEIRA et al., 2011; FRISCHMANN et al., 2013), esse dado sugere que Epl-1 poderia desempenhar um papel no reconhecimento de polissacarídeos e agir diretamente no processo de interação com diferentes hospedeiros. Nesse sentido, análises de microscopia de fluorescência indicaram a presença de Epl-1 predominantemente na parede celular de *T. harzianum* em condições de confronto. Além do fato do transporte de Epl-1 pela hifa ser através de vesículas em um fluxo proteico altamente dinâmico, sendo fortemente induzido na presença do patógeno (Figura 13). Esses dados estão de acordo com as análises de qPCR as quais indicaram uma indução da expressão de *epl-1* após o contato das hifas em ensaios de confronto direto com *S. sclerotiorum* (Figura 17A).

Inicialmente nós não observamos diferenças fenotípicas entre as linhagens selvagem e mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum*, em relação a testes de crescimento (placas de dupla cultura; Figuras 14A1 e 14B1) e interação (placas de ensaio de potencial antagônico; Figura 12), como reportado para outras espécies de *Trichoderma* (FRISCHMANN et al., 2013; GADERER et al., 2015). Entretanto, microscopicamente as diferenças se tornaram bastante evidentes, como mostrado pelas análises de MEV. Estudos prévios indicaram que *T. harzianum* apresenta diferentes mecanismos de reconhecimento do hospedeiro e o processo de micoparasitismo depende do tipo de patógeno e sua composição de parede celular (MONTEIRO et al., 2010). O processo de micoparasitismo por *Trichoderma* ocorre por conexão aos carboidratos da parede celular e também existem evidências de que lectinas presentes na parede do hospedeiro possam fazer parte do processo de reconhecimento (INBAR, J. & CHET, 1992). Uma vez

conectada, a hifa se enrola firmemente no hospedeiro formando estruturas relacionadas com o micoparasitismo (e.g. ganchos e corpos tipo apressório). O próximo passo é a produção de enzimas de degradação de parede (BENÍTEZ et al., 2004). Nesse estudo, análises de MEV mostraram excessiva degradação de hifa nos confrontos entre as linhagens selvagem e mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum*, com uma linha de degradação muito bem definida na zona de interação (fato não observado no confronto entre as linhagens selvagens; Figura 14A e B). Entretanto, não foram observadas degradação de hifa ou fragmentos durante confronto entre as linhagens complementares (RecEpl-1-GFP) (Figura 14C). Esses dados poderiam estar relacionados com o não reconhecimento da hifa de *Trichoderma* o qual, como sugerido por CORTES et al., (1998), poderia levar à uma intensa liberação de enzimas líticas tais como (β -1,3-glucanase [*exg1*], quitinase [*nag1*, *chit33* e *chit42*] e proteases [*papA*, *PRA1* e *sprT*]), resultando na digestão dos principais componentes da parede celular. Essa evidência pode ser embasada pelo fato de que a maioria dos genes relacionados ao micoparasitismo foram induzidos durante o confronto entre as linhagens selvagem e mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum* após o contato das hifas (Figuras 17 e 18). As expressões alteradas desses genes se tornam evidentes observando o *heat map* gerado a partir dos dados de qPCR dos confrontos das linhagens de *T. harzianum* após o contato das hifas (Figura 19B), sugerindo uma percepção alteada da linhagem selvagem de *Trichoderma* após o contato com a linhagem mutante $\Delta epl-1$ e o patógeno hospedeiro.

Considerando a localização celular, provável regulação e interação com a parede celular de Epl-1 de *T. harzianum*, sua função no processo de micoparasitismo pode ser então especulada. Primeiro, Epl-1 poderia atuar como uma molécula de reconhecimento no sentido de identificar a sua própria hifa e/ou a hifa do hospedeiro, evitando assim sua auto degradação. Alternativamente, essa proteína poderia ter uma função de proteção, tal como escamas de peixe, contra a ação de suas próprias enzimas de degradação, enzimas do hospedeiro e outros metabólitos, preservando assim a integridade de sua própria parede celular durante o confronto contra sua preza. GRUBER; SEIDL-SEIBOTH, (2012), hipotetizaram que a degradação da parede celular do hospedeiro e a sua própria parede é regulada pela acessibilidade ao substrato, onde a proteção da parede celular é observada na hifa sadia mas não durante o ataque micoparasítico, envelhecimento da hifa e autólise. Eles argumentaram ainda que a acessibilidade à quitina da parede celular poderia ser o principal determinante e a acessibilidade da hifa saudável poderia ser limitada pela proteção conferida

por proteínas da parede celular. De acordo com essa teoria, durante o processo de micoparasitismo, o fungo hospedeiro é enfraquecido pelos numerosos metabolitos secundários bem como as enzimas hidrolíticas, que são altamente destrutivos para sua hifa, conduzindo então para uma parcial morte celular, aumentando assim a acessibilidade aos carboidratos da parede celular da preza. Isso levaria então à liberação enzimática de oligômeros, principalmente oligossacarídeos, que por sua vez induzem a produção de ainda mais enzimas hidrolíticas, produzindo assim um dano ainda maior à parede celular do hospedeiro, cenário similar ao observado em nosso estudo durante o confronto entre as linhagens selvagem e mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum* (Figura 14B). Proteínas hidrofóbicas de parede celular e proteínas de ligação a carboidratos poderiam ser candidatos adequados para proporcionar essa função de proteção de parede, tal como QID74 de *T. harzianum* (ROSADO et al., 2007), que mostrou estar envolvido na proteção e aderência a superfícies hidrofóbicas, atuando como proteínas conhecidas como hidrofobinas. Pequenas proteínas secretadas, ricas em cisteínas bem como proteínas de ligação a carboidratos, tal como Epl-1, foram sugeridas em também estarem envolvidas no aspecto de proteção e regulação da degradação da parede celular pela sua capacidade de ligação a oligossacarídeos curtos, influenciando assim a indução de enzimas de degradação de parede, ou mesmo pela sua ligação à quitina, mascarando e protegendo este polissacarídeo contra degradação. Assim, os genes relacionados ao micoparasitismo poderiam ser altamente induzidos durante os confrontos de *Trichoderma* (Figuras 17 e 18), devido às enzimas liberadas na região de interação que, sem essas proteínas, encontram mais acesso à parede da linhagem mutante, degradando assim mais substrato, consequentemente liberando mais produtos que agem como elicitores e induzem a produção de mais enzimas que são importantes no processo de micoparasitismo, tais como β -1,3-exoglucanase e quitinases (CORTES et al., 1998; MARCHLER et al., 1993).

Análises de MEV mostraram que a linhagem selvagem de *T. harzianum* se enovelou perfeitamente em torno da hifa de *S. sclerotiorum*, como previamente reportado para outros fitopatógenos (HARMAN et al., 2004; MONTEIRO et al., 2010), entretanto embora a linhagem mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum* pôde reconhecer e parasitar o hospedeiro, as estruturas de enovelamento não puderam ser detectadas (Figura 15B), indicando que a ausência de Epl-1 também afetou a interação de micoparasitismo. Esse dado pode ser evidenciado pelo fato de que a habilidade de enovelamento foi recuperada pela linhagem

RecEpl-1-GFP (Figura 15C); entretanto, o mecanismo pelo qual a Epl-1 afeta o enovelamento micoparasítico da hifa ainda é desconhecido.

Numerosas moléculas de sinalização de origem microbiana que iniciam respostas de defesa em plantas (elicitores) já foram caracterizadas (NIMCHUK et al., 2003). Células de plantas expostas aos elicitores respondem com uma bateria de mudanças celulares relacionadas à defesa (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996; YANG; SHAH; KLESSIG, 1997). VARGAS et al., (2008), mostraram que monômeros de Sm1 e Epl-1 podem sofrer interações intermoleculares formando dímeros, resistentes ao tratamento com SDS/ β -mercaptoetanol (e outros detergentes em várias temperaturas), sugerindo uma interação covalente entre essas subunidades (não sendo pontes dissulfeto). Eles também sugeriram que a forma monomérica das proteínas Sm1 e Epl-1 foram capazes de ativar resposta de defesa em folhas de milho, não sendo detectada atividade na forma dimérica. Assim, foi especulado que a planta apresenta mecanismos específicos de reconhecimento, possibilitando distinguir entre as formas, monomérica e dimérica ou ainda detectar características especiais da forma monomérica que não estão expostas quando as subunidades estão unidas. Caracterizações bioquímicas dessas proteínas mostraram que dois fatores principais podem controlar seu estado oligomérico e assim suas atividades elicitoras, a primeira é a glicosilação, onde a presença de moléculas de açúcar poderia fornecer um bloqueio físico à união das subunidades proteicas, prevenindo assim a sua dimerização. Dessa forma, o potencial sítio de *O*-glicosilação (Figura 6A), observado em análises *in silico* nesse estudo, indica que Epl-1 de *T. harzianum* poderia ter esse tipo de controle de dimerização. Outro fator que poderia controlar o estado oligomérico dessas proteínas é a oxidação de um resíduo de triptofano (Trp). É sabido que a oxidação de Trp pode estar envolvida na agregação e inativação de algumas proteínas (ZHANG et al., 2003). Nesse caso, foi demonstrado que a forma dimérica de Epl-1 apresentou um sítio altamente conservado de resíduo de Trp no seu estado oxidado. A análise *in silico* desse sítio conservado, alinhando a sequência da proteína Epl-1 de *T. harzianum* apresentou 100% de identidade com Sm-1 de *T. virens* (YHWSTQGQIPR) e 91% de identidade com a proteína Epl-1 de *T. atroviride*. Portanto, foi proposto que o acúmulo de espécies reativas de oxigênio em células de plantas poderia estimular a oxidação desse sítio oxidativo nesse grupo de proteínas e, conseqüentemente, sua agregação alterando o reconhecimento e ativação da resposta em plantas (VARGAS et al., 2008).

A ativação do mecanismo de defesa em plantas ocorre através de uma sucessão de eventos e sinais que iniciam com o reconhecimento pela planta de microorganismos patogênicos/não patogênicos, que culmina na formação de barreiras físicas e ativação de resposta química, levando à proteção contra invasão (HARMAN et al., 2004). A resposta de defesa da planta incluem três principais mecanismos: a) Resposta Hipersensitiva (HR), b) Resistência Sistêmica Adquirida (SAR), que inclui indução de proteínas relacionada à patogênese (proteínas - PR) e c) Resistência Sistêmica Induzida (ISR), a qual inclui a produção de compostos, tais como ácido jasmônico (JA) e peróxido de hidrogênio. O mecanismo usado por espécies de *Trichoderma* para disparar a resposta de defesa em plantas ainda não é completamente compreendido, entretanto estudos sobre a expressão diferencial de genes e alterações nos padrões de expressão de proteínas de folhas e raízes de plantas hospedeiras durante a associação com espécies de *Trichoderma* têm sido conduzidos (SHORESH; HARMAN; MASTOURI, 2010). A síntese de proteínas PR, envolvendo peroxidases, quitinases, β -1,3-glucanases e lipoxigenase, pode ser considerada uma das alterações mais óbvias na interação planta-patógeno. Outras respostas paralelas à infecção incluem, aumento de expressão de genes relacionados à síntese de fitoalexinas e fenilalanina amônia liase (PAL), adicionado ao depósito de lignina e aumento dos níveis de ácido salicílico (SA) (VERBERNE et al., 2000). PEREIRA et al., (2014), descreveram a interação entre *T. harzianum* (All-42) com a planta hospedeira *P. vulgaris* na presença ou ausência do fungo fitopatogênico *F. solani* e *R. solani*, onde a linhagem de *Trichoderma* foi capaz de promover o crescimento de plantas de feijão, aumentando seu tamanho, a área foliar e radicular, o número de raízes secundárias, apresentando também a habilidade em modificar o sistema arquitetônico da raiz. Os autores também sugeriram que plantas de feijão comum desafiadas por *T. harzianum* apresentaram padrões de expressão diferenciados para genes de resposta de defesa, comparados às plantas não desafiadas ou desafiadas apenas por *F. solani* ou *R. solani*. Neste estudo, nós analisamos o efeito da proteína Epl-1 em elicitar genes de resposta de defesa em plantas, tais como *bch1*, *glu1*, *lox* e *pod3* (PEREIRA et al., 2014), incluindo um gene que codifica a uma fenilalanina amônia liase (*pal*). Assim, como em outros trabalhos (HARMAN et al., 2004; PEREIRA MENEZES SARA et al., 2014; SHORESH; HARMAN; MASTOURI, 2010; SHORESH; YEDIDIA; CHET, 2005), nossos resultados também mostraram uma indução de *lox* e *glu1*, especialmente nas primeiras 24 h após as plantas serem desafiadas com as linhagens de *Trichoderma*. Interessantemente, o mutante

$\Delta epl-1$ apresentou uma expressão de *lox* vinte vezes maior que a apresentada pela linhagem selvagem (Figura 20).

Uma pequena quantidade de β -1,3-glucanase é sintetizada e secretada no espaço intercelular; com o crescimento do fungo parasita ou simbiote nesse espaço, a enzima inicia o processo de degradação da parede celular do fungo. Quando o fungo invasor penetra as células da planta os vacúolos são rompidos, levando à liberação de enzimas que inibem a ação do patógeno (MAUCH; STAEHELIN, 1989). Em nosso estudo, esse gene foi fortemente induzido após a inoculação da linhagem mutante $\Delta epl-1$ (Figura 20), sugerindo mais uma vez a ação de Epl-1 como uma proteína de proteção da parede do fungo. A indução de *glu1* em plantas de feijão inoculadas com *T. harzianum* $\Delta epl-1$ comparado com plantas inoculadas com a linhagem selvagem foi consistente com resultados de plantas desafiadas com patógenos como *R. solani* (HARMAN et al., 2004; PEREIRA MENEZES SARA et al., 2014; SHORESH; HARMAN; MASTOURI, 2010; SHORESH; YEDIDIA; CHET, 2005). Assim, sem a proteína Epl-1, as plantas de feijão poderiam reconhecer *T. harzianum* como um patógeno, sendo que as proteínas PR, tais como β -1,3-glucanase (PR2) e quitinases (PR3), as quais são conhecidas por romper a parede celular de fungos, podem ser induzidas por SA, bem como pelo ataque de patógenos (DJONOVIC et al., 2006; STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997), ou poderia também indicar uma sinalização cruzada (*cross-talk*) entre as vias de defesa ISR e SAR.

A ausência da proteína Epl-1 no sistema *T. harzianum*-planta, observado nesse estudo, não afetou estatisticamente a expressão dos genes *bch1* e *pod3* nas primeiras 24 h, embora uma indução tardia de *pod3* foi observada 72 h depois da inoculação das linhagens de *T. harzianum* (dados não mostrados). Assim, baseado nos níveis de expressão de *bch1*, nós podemos especular que outras CPs tais como Epl-2 e Epl-3, poderiam interagir com a quitina e os oligômeros derivados de quitina liberados pelo fungo devido à interação planta-microorganismo, sendo então capturados por essas CPs, de acordo com suas afinidades (KISHIMOTO et al., 2010; PAZZAGLI et al., 2014), mantendo assim o nível de expressão de *bch1* estável. Salas-Marina (2015), argumentaram que *T. atroviride* e *T. virens* poderiam induzir resistência sistêmica à doenças em plantas de tomate, acompanhada pelo aumento dos níveis de expressão de genes relacionados a defesa da via de SA; entretanto, em nosso estudo, esse gene foi levemente afetado em plantas inoculadas com linhagens mutantes $\Delta epl-1$, sugerindo que a indução da via de resistência do SA por linhagens de *T. harzianum* seja Epl-1

independente ou que esse mecanismo age mais em função da sensibilidade do que no acúmulo do hormônio PAL.

Embora o atual papel de Epl-1 na fisiologia de *Trichoderma* ainda não esteja completamente esclarecido, as informações disponíveis sobre essa proteína e os dados gerados nesse estudo sugerem que Epl-1 desempenha um papel fundamental na bem sucedida adaptação de *Trichoderma* em seu ambiente, especialmente durante a interação com fungos e plantas hospedeiros. Assim, um melhor entendimento das funções de proteínas tais como Epl-1 e seu papel no processo de interação, serão necessários para a melhoria das estratégias no combate de patógenos de plantas e para produzir lavouras mais resistentes a organismos fitopatogênicos e assim reduzir o impacto ambiental causado por pesticidas e outros compostos químicos.

RESUMO

O gênero *Trichoderma* é bem conhecido pela habilidade de algumas espécies em atuar como importantes agentes de biocontrole contra fungos fitopatogênicos; biofertilizantes; no aumento da tolerância de plantas ao estresse biótico e abiótico e também em induzir respostas de defesa em plantas através da produção e secreção de moléculas elicitoras. Nesse estudo, nós analisamos os efeitos da proteína Epl-1 de *T. harzianum* no processo de interação com o fitopatógeno *Botrytis cinerea* e com plantas de tomate em períodos iniciais e tardios após a inoculação de diferentes linhagens de *T. harzianum*. Os resultados mostraram que a proteína Epl-1 de *T. harzianum* afetou a expressão de genes de virulência em *B. cinerea*; genes relacionados à defesa de diferentes vias de sinalização em plantas de tomate em estágios precoce e tardio de interação; ativação do efeito *primer* em plantas de tomate; a interação nos primeiros estágios da colonização de raízes em plantas de tomate; e na produção de compostos de metabolismo secundário da via dos terpenos.

ABSTRACT

Trichoderma is well known for the ability of some species to act as important biocontrol agents against phytopathogenic fungi; biofertilizers; increase tolerance of plants to biotic and abiotic stresses; and also to induce plant defense responses via the production and secretion of elicitor molecules. In this study, we analyzed the effects of the *Trichoderma harzianum* Epl-1 protein in the interaction process with the phytopathogen *Botrytis cinerea* and with tomato plants in earlier and later periods after *Trichoderma* strains inoculation. The results showed that *T. harzianum* Epl-1 protein affected the eliciting of the virulence genes in *B. cinerea*; tomato defense-related genes from different signaling pathways in earlier and later periods after interaction; the activation of the primer effect in tomato plants; the interaction at the first stage of tomato roots colonization; and in production of secondary metabolites compounds in terpenes pathway.

1 Introdução

1.1 A cultura do Tomate no Brasil

No Brasil, a cadeia produtiva do tomate é uma das mais importantes da indústria alimentícia. Segundo estudo sobre “Desenvolvimento do Sistema Agroindustrial do Tomate” devido às características intrínsecas na produção, beneficiamento, processamento e comercialização, os cultivos de tomate são destinados ao consumo *in natura* e ao abastecimento industrial constituindo-se em duas cadeias produtivas distintas desde as variedades utilizadas, formas de cultivo até o consumo final (CAMARGO, 2006). A safra 2014/2015 de tomate apresenta dados de produção em queda, a variação da área plantada é de -12,9%, a produção de -17,1% e a produtividade apresenta baixa de 1,3%, o que vem se tornando uma tendência nos últimos anos, como mostram os gráficos 1 e 2 de produção e produtividade respectivamente. Os três principais estados produtores, Goiás (21,7%), Minas Gerais (18,7%) e São Paulo (16%) estimam redução da área plantada, porém o principal fator limitante da produção nesta safra é o clima que se mostrou até o momento com precipitações pluviométricas abaixo do necessário para o bom desenvolvimento da cultura. Mesmo em áreas que utilizam a irrigação teme-se que a falta de chuva diminua ainda mais os níveis dos reservatórios e que estes sejam insuficientes para atender a área com a cultura. Assim, como São Paulo enfrenta uma severa crise hídrica estima-se que a redução da área plantada seja de 22,5% e de rendimento médio de 13,6%, portanto a expectativa de queda da produção nesse estado é de 33%. O resultado da menor oferta de tomate no mercado e a expectativa de baixa oferta durante o ano pode ser sentida pelo consumidor que encontrou valores maiores ao comprar este fruto. Para o produtor, no mês de janeiro, o CEPEA/ESALQ registrou nas regiões produtoras em média alta de 27% em relação a dezembro de 2014 (IBGE, 2015).

Gráfico 1: Produção anual de tomates no Brasil. Dados (IBGE, 2015).

Gráfico 2: Produtividade anual de tomates no Brasil. Dados (IBGE, 2015).

1.2 *Botrytis cinerea*

B. cinerea (teleomorfo *Botryotinia fuckeliana*), um parente próximo de *S. sclerotiorum*, é um fungo ascomiceto responsável pelo desenvolvimento do mofo cinza em centenas de espécies de plantas, inclusive o tomate (ELAD, Y. WILLIAMSON, B. TUDZYNSKI, P. DELEN, 2004). A grande variedade de sintomas em diferentes órgãos e plantas pode sugerir que *B. cinerea* possui um amplo “arsenal de armas” para atacar sua

planta hospedeira, sendo um dos modelos mais estudados entre fungos necrotróficos. Seu processo de infecção é geralmente descrito pelos seguintes estágios: adesão do conídio, germinação, formação do apressório, penetração da superfície, seguido da morte do tecido hospedeiro, formação da lesão primária, expansão da lesão, maceração tecidual e esporulação (Figura 21) (VAN KAN, 2006).

Figura 21: Germinação e desenvolvimento de um apressório sobre a superfície de uma folha de planta de tomate. **Abreviações:** a, apressório; c, conídio; g, tubo germinativo. Pontas de setas indicam a demarcação de uma área em volta do sítio de contato onde a superfície epidermal se apresenta modificada, possivelmente por polissacarídeos cobrindo o apressório (VAN KAN, 2006).

Sendo um organismo necrotrófico, esse fungo é notavelmente equipado com múltiplas enzimas de degradação de parede celular que permitem a colonização e a liberação de carboidratos para seu consumo. Sua capacidade para degradar a cutícula e a parede celular do hospedeiro foi extensivamente estudada (KARS; VAN KAN, 2004; TEN HAVE et al., 2004). Além disso, *B. cinerea* secreta fitotoxinas não específicas para matar células de um grande espectro de plantas. Entre os numerosos metabólitos isolados o mais conhecido é o sesquiterpeno botrydial (BOT), o qual é produzido durante a infecção da planta (DEIGHTON et al., 2001), induzindo à clorose seguida do colapso celular, o qual aparentemente facilita tanto a penetração quanto a colonização da planta hospedeira (COLMENARES et al., 2002). Além do botrydial e seus derivados, isolados mais agressivos de *B. cinerea* também produzem uma segunda classe de toxinas, derivadas do ácido botcínico (REINO et al., 2004; TANI et al., 2006), que são as botcininas, poliquetídeos com um papel de virulência redundante ao de BOT (DALMAIS et al., 2011) e botrylactonas que são também poliquetídeos sendo sua

Hospedeiros

atividade biológica ainda não avaliada (MASSAROLI et al., 2013). Juntamente com essas toxinas, *B. cinerea* produz espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais se acumulam nos estágios iniciais da infecção, levando à morte do tecido da planta (SCHOUTEN et al., 2002; TENBERGE, 2004).

1.3 *Trichoderma* como agentes de biocontrole

Algumas espécies de *Trichoderma* são conhecidas pela sua atividade de biocontrole contra vários fungos fitopatogênicos (HARMAN et al., 2004; LORITO et al., 2010; MONTEIRO et al., 2010). Essa atividade é conduzida de diferentes formas, tais como micoparasitismo (ALMEIDA et al., 2007; MONTEIRO; ULHOA, 2006); produção de enzimas hidrolíticas extracelulares (BENÍTEZ et al., 2004; MONTEIRO et al., 2010); proteínas que podem estar envolvidas na competição por nutrientes conferindo uma vantagem nutricional (ELAD, 2000); e produção de metabólitos secundários com atividade antifúngica (CARDOZA et al., 2011; MALMIERCA et al., 2012, 2013; TIJERINO et al., 2011). Além disso, algumas linhagens de *Trichoderma* podem interagir diferentemente com raízes, resultando no aumento do potencial de crescimento de plantas, resistência a doenças e tolerância ao estresse biológico e ambiental (HERMOSA et al., 2012; SHORESH; HARMAN; MASTOURI, 2010). Outro aspecto importante é o efeito de biofertilização que pode ocorrer sem que haja contato físico entre os agentes de biocontrole (ABCs) e a planta onde há, por exemplo, produção de moléculas semelhantes à citoquininas, como zeatina e giberelina GA3, por algumas cepas de *Trichoderma* que podem atuar como fatores de crescimento em plantas (OSIEWACZ, 2002). *Trichoderma* também pode solubilizar micronutrientes presentes no solo tais como ferro, fósforo e magnésio, promovendo uma melhor assimilação pela planta (HARMAN et al., 2004). Além disso, a colonização de raízes de plantas por linhagens de *Trichoderma* frequentemente aumenta o crescimento e o desenvolvimento da própria raiz, assim como a produtividade do cultivo, que pode aumentar em até 300% como no caso de alface, pimentão e tomate tratados com linhagens de *T. harzianum* T22 e *T. atroviride* P1 (VINALE et al., 2008), além de que, proteínas da família das cerato plataninas (CPs), tais como Sm1/Epl-1 produzidas por *Trichoderma virens* e *Trichoderma atroviride* respectivamente, são elicitores efetivos capazes de disparar reações de defesa em plantas, tanto local quanto sistematicamente (DJONOVIC et al., 2006; SEIDL;

DRUZHININA; KUBICEK, 2006).

2 Justificativa

Métodos tradicionais usados para proteger lavouras de doenças são baseados no uso de pesticidas químicos. Aplicações de fungicidas podem ter efeitos drásticos no ambiente e consumidores, além de serem aplicados em maiores quantidades que herbicidas e inseticidas na produção agrícola (FRASER, 1994). Métodos químicos não são econômicos em longo prazo, pois eles poluem a atmosfera, prejudicam o ambiente, deixam resíduos nocivos e podem levar ao desenvolvimento de linhagens resistentes dos organismos alvos com o uso repetitivo desses agrotóxicos (NASEBY; PASCUAL; LYNCH, 2000). Uma das mais promissoras estratégias para reduzir ou até mesmo eliminar o tratamento químico é baseado no uso de ABCs, que resultam em aumento de eficiência, produtividade, com um mínimo impacto ambiental (CHET; INBAR, 1994). Nesse sentido, o uso de linhagens de *Trichoderma* se faz extremamente relevante, além de que o uso dessa ferramenta também pode proporcionar uma melhora na produtividade por área plantada; plantas mais tolerantes ao estresse biótico, como ao ataque de pragas como *B. cinerea*; e ao estresse abiótico como variações drásticas no clima, que temos recentemente observado. Assim, as principais metas desse estudo foram, analisar o papel da proteína Epl-1 de *T. harzianum*:

- na interação com o patógeno hospedeiro *B. cinerea*;
- como elicitor de genes relacionados à defesa em plantas de tomate em períodos iniciais e tardios após a inoculação de linhagens de *Trichoderma*;
- no processo de colonização de raízes de plantas de tomate;
- na produção de compostos na via metabólica dos terpenos;
- na produção de compostos de vias metabólicas secundárias;
- Na proteção do fungo contra condições de estresse.

3 Objetivos

(A) Efeito de linhagens de *T. harzianum*, selvagem e mutante, na expressão de genes de virulência em *B. cinerea*;

Capítulo II: O Papel da Proteína Epl-1 de *Trichoderma harzianum* na Interação com Fungos e Plantas Hospedeiros

- (B) Efeito de linhagens de *T. harzianum*, selvagem e mutante, na expressão de genes envolvidos no sistema de resposta de defesa em plantas de tomate, em presença ou ausência do patógeno *B. cinerea*;
- (C) Verificar o papel da proteína Epl-1 na expressão de genes chave na via metabólica de terpenos;
- (D) Quantificar a produção de ergosterol/esqualeno em diferentes linhagens de *Trichoderma*;
- (E) Análises “*in vitro* e *in vivo*” de Epl-1 no crescimento de plantas de tomate;
- (F) Ensaios antifúngicos “*in vitro*” com diferentes linhagens de *Trichoderma* contra o patógeno *B. cinerea*;
- (G) Ação da proteína Epl-1 na proteção de *T. harzianum* contra condições de estresse.

4 Materiais e Métodos

4.1 Cultivo e Manutenção dos fungos

Neste estudo, foram utilizadas as linhagens selvagem e mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum* descritas no primeiro capítulo dessa tese de doutorado. Isolados de *B. cinerea* (05.10) foram provenientes do Laboratório de Microbiologia, Escola de Engenharias Agrícolas da Universidade de León (Unileon), Campus Ponferrada, Espanha. Os isolados foram mantidos em meio MEA (2% glicose, 2% extrato de malte, 1% peptona, 2% agar [pH 5.6]).

4.2 Ensaios de Confronto Direto em Placa entre Linhagens de *T. harzianum* e *B. cinerea* 05.10

Ensaios de confronto usando micélio crescido por cinco dias em meio PPG (2% flocos para purê de batata Maggi®; 2% Glicose; 2% Ágar), a 28° C a partir de esporos de linhagens de *T. harzianum* e *B. cinerea* 05.10 crescidos por 7 dias em meio MEA a 21° C com um fotoperíodo de 16 h de luz. Um disco de 7 mm de diâmetro de agar com micélio de *B. cinerea* foi colocado na extremidade de uma placa de petri de 150 mm contendo 50 mL de meio MEA

coberto por uma membrana de papel celofane estéril em sua superfície, para facilitar a recuperação do micélio da placa. Essas placas foram incubadas a 21° C com um fotoperíodo de 16 h de luz. Após 4 dias de crescimento da linhagem de *B. cinerea* (cerca de 40 mm de diâmetro), um disco de agar da cultura de *T. harzianum* foi colocada na superfície oposta ao disco de *B. cinerea*. As placas de confronto foram incubadas a 28° C por 7 dias. Os fungos geralmente começam a interagir quatro dias após a adição dos discos de *Trichoderma*. Amostras de micélio foram coletadas 12 h antes do início da interação (antes do contato) e a partir das regiões de interação após o contato, para extração de RNA e posterior análise por qPCR.

4.3 Ensaaios em Plantas de Tomate

A superfície de sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Marmande) foram esterilizadas, sendo lavadas por 10 min. em etanol 70%, 10 min. em hipoclorito de sódio e vigorosamente lavadas em água destilada estéril por três repetições de 10 min. cada. Ensaio “*in vivo*” foi usado para avaliar a habilidade das linhagens de *Trichoderma* em promover o crescimento das plantas de tomate. Sementes de tomate foram cobertos com uma suspensão aquosa contendo 2×10^8 esporos de *Trichoderma* por mL (1 mL de suspensão de esporos/30 sementes) e então secados ao ar em uma placa de petri aberta (*overnight*) sob câmara de fluxo laminar. As sementes de tomate tratadas foram semeadas em potes (32 potes por condição) contendo solo comercial de campo argiloso (Kekkilä 50/50; Projar S.A., Valencia, Spain), com a seguinte composição: 90% de matéria orgânica (casca de coco e turfa), 10% de cinzas, 50% de umidade, 1-4/1-6 graus de decomposição (von Post), pH 5.5 a 6.6, 0.2% de nitrogênio, 0.1% de fósforo total, 0.5% de cálcio, 0.1% de magnésio, 0,2% de ferro, 1.5 mg/kg de cloretos e 80 g/litros de peso seco, previamente autoclavado a 121° C por 1h por dois dias sucessivos. Potes com sementes de tomate não tratadas foram usadas como controle. Os potes foram incubados em estufa a $22^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$ com regos quando necessário. Medidas do tamanho e diâmetro do caule foram feitos após 4 semanas. Plantas com 4 semanas obtidas das sementes cobertas com *T. harzianum* (selvagem e mutante) e controle foram inoculadas com 15µl de suspensão conidial de *B. cinerea* (1×10^6 esporos/mL) em tampão de germinação (20 mM glicose e 20 mM KH_2PO_4) sobre a superfície das folhas. Plantas inoculadas foram incubadas em uma câmara úmida sob condições descritas acima. Duas inoculações foram

feitas por folha em quatro folhas por planta em dezesseis plantas por tratamento e duas replicatas para cada experimento. Após 4 dias, as lesões necróticas foram medidas. Folhas antes e após a inoculação do patógeno foram coletadas e o RNA isolado. Em paralelo, plantas não inoculadas foram usadas como controle.

Culturas hidropônicas de tomate-*Trichoderma* foram conduzidas como descrito previamente (RUBIO et al., 2012). Primeiramente, sementes de tomate estéreis foram colocadas dentro de caixas *Phytatray II* (Sigma, St. Louis, MO) (30 sementes por caixa) sobre uma tira de gaze estéril suportada por uma malha de alumínio, o qual mantém as sementes 1 cm acima de 100 ml de meio Murashige e Skoog (MS) (Duchefa, Netherlands) e mantidos a 22° C em câmara fitotécnica com luz e umidade controladas, como descrito acima, por 2 semanas. Esporos das linhagens de *Trichoderma* (10⁷ esporos) foram usados para inocular frascos de 250 mL contendo 100 mL de meio PDB. Cada linhagem foi cultivada a 28° C e a 200 RPM no escuro por 48 h. Micélio foi então retirado por filtração, lavado com água estéril e usado para inocular as caixas de *Phytatray* que contém as plantas de tomate de duas semanas. As culturas hidropônicas de tomate-*Trichoderma* foram mantidas a 22° C e a 80 RPM por 20 h. Finalmente, o micélio de *Trichoderma* ligado as raízes forma recuperadas com leves jatos de água fria e usadas para análises de expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (qPCR).

4.4 Análise de Expressão de Genes de Defesa em Plantas de Tomate e Genes de Virulência em *B. cinerea*

Para realizar estudos comparativos da consequência da deleção do gene *epl-1* nos níveis de expressão de genes de defesa em plantas de tomate e genes de virulência em *B. cinerea*, foram conduzidas análises de qPCR usando o sistema Step One Plus™ (Applied Biosystems, Foster City, CA). As reações foram realizadas em um volume total de 20 µl, sendo composto pelos seguintes componentes/reacção: 10 µl Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.4 µl *Forward Primer* 10 µmol l⁻¹, 0.4 µl *Reverse Primer* 10 µmol l⁻¹ (Tabela 2), 5 µl cDNA e H₂O para um volume final de 20 µL. O programa Rest 2009© (PFAFFL, 2002) foi usado para calcular os valores de expressão relativa e a significância das diferenças entre os níveis de expressão gênica. Para os estudos comparativos, foram usados oligonucleotídeos de genes relacionados à defesa em plantas de

Hospedeiros

tomate, virulência em *B. cinerea* (Tabela 2) e genes de referência para controle endógeno (*housekeeping*) previamente descritos (CARDOZA et al., 2011; PINEDO et al., 2008; TUCCI et al., 2011). Para os genes de planta de tomate, foram analisados genes marcadores de ambas as vias relacionadas com defesa, do ácido salicílico (SA) (*PR1b1* e *PR-P2*) e do Jasmonato (JA) (*PINI*, *PINII* e *TomLoxA*), sob as seguintes condições: Plantas de tomate + *T. harzianum* (selvagem) versus Plantas de tomate (condição 1); Plantas de tomate + *T. harzianum* Δ *epl-1* versus Plantas de tomate (condição 2); Plantas de tomate + *T. harzianum* (selvagem) versus Plantas de tomate + *T. harzianum* Δ *epl-1* (condição 3); Plantas de tomate + *T. harzianum* (selvagem) + *B. cinerea* versus Plantas de tomate + *T. harzianum* Δ *epl-1* + *B. cinerea* (condição 4); Plantas de tomate + *B. cinerea* versus Plantas de tomate (condição 5). Os genes de α -actina e *BcEF1b* foram usados como controle endógeno para plantas de tomate e *B. cinerea* respectivamente.

Para a quantificação da habilidade de colonização de raiz por linhagem mutante de *T. harzianum* em comparação com selvagem como linhagem controle, foram usados oligonucleotídeos para os genes *GAPDH* de tomate e α -actina de *T. harzianum* (Tabela 2). A quantificação da quantidade de cDNA de *Trichoderma* nas raízes de tomate foi realizada quantificando por PCR o nível relativo do gene de α -actina de *Trichoderma* em relação ao nível do gene de *GAPDH* de tomate na mesma amostra. Uma vez que a qPCR foi realizada, os Cts são convertidos para nanogramas de cDNA usando duas curvas de calibração as quais haviam representados os valores de Ct para concentrações conhecidas de cDNA (em tomate ou *T. harzianum*). Usando essa técnica, a razão da colonização de raiz pela linhagem selvagem de *T. harzianum* foi assumida como valor 1 e os valores para o transformante Δ *epl-1* foram comparados aplicando simples cálculos matemáticos.

Hospedeiros

Tabela 2: Descrição de oligonucleotídeos e seus respectivos genes. Th. *T. harzianum*; Bc: *B. cinerea*.

Gene	Oligonucleotídeos	Sequências (5' → 3')	Organismo
<i>α-actina</i>	Actin-F	CAC CAC TGC TGA ACG GGA A	Th
	Actin-R	GGA GCT GCT CCT GGC AGT TT	
<i>GADPH</i>	GADPH-tom-F	GGT GCC AAG AAG GTT GTG AT	Tomate
	GADPH-tom-R	TGG TCA TGA GAC CCT CAA CA	
<i>PR1b1</i>	PR1b1-F	GCA CTA AAC CTA AAG AAA AAT GGG	Tomate
	PR1b1-R	AAG TTG GCA TCC CAA GAC ATA	
<i>PRP2</i>	PRP2-F	GGA ACA GGA ACA CAA GAA ACA GTG A	Tomate
	PRP2-R	CCC AAT CCA TTA GTG TCC AAT CG	
<i>PINI</i>	PINI-F	TGA AAC TCT CAT GGC ACG AAA AG	Tomate
	PINI-R	GGC CAC ATT TGT TTT CCT TCG	
<i>PINII</i>	PINII-F	GGC CAA ATG CTT GCA CCT TT	Tomate
	PINII-R	CGT GGT ACA TCC GGT GGG ATA	
<i>TomLoxA</i>	TomLoxA-F	TGA ACC ATG GTG GGC TGA AA	Tomate
	TomLoxA-R	CTG CCC GAA ATT GAC TGC TG	
<i>SucS</i>	SacS-F	ATG AAC CGA GTG AGG AAT GG	Tomate
	SacS-R	GCT GGA CCA CCG TGA TTA GT	
<i>BcEF1b</i>	BcEF1b-F	GCT GCC AAG TCT GTT GTC ACA	Bc
	BcEF1b-R	CAA TGC TAC CAT GTC GGT CTC A	
<i>BcBOT1</i>	BD8	GGC TCC CGT GCT TGC A	Bc
	BD20	GCG AGG TGA AGA AGT TAG AGA AGG T	
<i>BcBOT2</i>	BD5	CAG GTT ATC CCT TTG CAT GAG TAG T	Bc
	BD17	TTA CAC TGG TGA ATG ATG TTT TGT CTT	
<i>BcBOT3</i>	BD12	CTA AGG GCT CGC GGA GTT G	Bc
	BD24	GCA TTG CGC TGG CAA GA	
<i>BcBOT4</i>	BD1	GGG AAC CAG GGT CAA TGT CA	Bc
	BD13	GCT TGA ATT CCC AGG GAT CTG	
<i>BcBOT5</i>	BD28	CAC GAA CTG GAC AAA GGC TAA A	Bc
	BD29	ACC ACC CGC AAT CAA AGC	

Hospedeiros

<i>Bcsod1</i>	BcSOD-F	ACA TTT CAA CCC ACA CGG	Bc
	BcSOD-R	CAG AGC CAG TAG CAT TTC CT	
<i>BcatrB</i>	BcABC-F	CCG AAG TCA CCG ATT CAT T	Bc
	BcABC-R	GGC GAT TTG AGC GAT ACA	
<i>BMP1</i>	BcMAPK-F	CCG CAA ATG TTC TAC ACA GAG	Bc
	BcMAPK-R	CAG AGT TAT CTT CTT GGG ATG C	
<i>Bcpg1</i>	BcPG1-F2	TGT CAA GAA CTC TGC CAA CG	Bc
	BcPG1-R2	AGT GAT GGG GAC ACC TGA AG	
<i>YOH1</i>	YOH1-F	CGT TGG TGG CGT AAA AGA TT	Bc
	YOH1-R	TGA CTC CCC TCT CCT CGA TA	

4.5 Quantificação de Esqualeno e Ergosterol

No intuito de verificar se a deleção do gene *epl-1* em *T. harzianum* afetou a via metabólica fúngica de Terpenos, 1×10^6 conídios mL^{-1} de cada linhagem analisada foram pré-inoculadas em frascos contendo 100 mL de meio CM (5% de extrato de malte (p/v), 5% de extrato de levedura (p/v) e 5% de glicose (p/v)) e crescidos por 24 h a 28° C e 250 RPM. 10 mL de pré-inóculo foram inoculados em frascos contendo 100 mL de meio PDB e frascos contendo 100 mL de meio PDB acrescidos de 10 ou 25 $\mu\text{g/ml}$ de terbinafina (TRB), o qual é uma droga antifúngica que especificamente inibe a proteína esqualeno epoxidase, codificada pelo gene *erg1*, envolvida na síntese de oxidoesqualeno a partir de esqualeno na via de terpeno em fungos. Essas culturas foram crescidas por 96 h a 28° C e 250 RPM. A quantidade de ergosterol e esqualeno foram calculados como previamente descrito por CARDOZA et al., (2007) e GHIMIRE; HEI; JAE, (2009) respectivamente. Todas as medidas foram feitas em duplicatas.

4.6 Antibiógrama do Sobrenadante Extraído de Culturas de *T. harzianum* contra *B. cinerea*

Placas de bioensaio foram feitas inoculando 1×10^5 esporos/mL de *B. cinerea* em meio MEA (1% agar) morno (50°C). O sobrenadante de culturas de 96 h das linhagens de *T.*

harzianum (selvagem e $\Delta epl-1$) foi extraído com etil acetato e finalmente dissolvidos em acetonitrila como previamente descrito (CARDOZA et al., 2011). As amostras de sobrenadante foram concentradas cem vezes. Sessenta microlitros de cada amostra foram adicionadas em orifícios com diâmetro de 5.5 mm e 3.3 mm de profundidade que foram feitos nas placas de bioensaio. Como controle negativo, acetonitrila foi adicionado em um dos orifícios. As placas foram mantidas a 4° C por 5 h para permitir que a solução difunda pelo meio e então incubada por 1 semana a 21° C para visualizar a zona de inibição de crescimento. O experimento foi feito em triplicata.

4.7 Testes em Condições de Estresse

4.7.1 Resposta a Temperatura

As linhagens de *T. harzianum* foram cultivadas (10^8 esporos) a 22° C em Meio Mínimo MM (PENTTILÄ et al., 1987), suplementado com 20 g/L de glicose e incubados por 48 h a 21, 28 e 37° C. O diâmetro do crescimento micelial foi medido.

4.7.2 Resposta a Salinidade

As linhagens de *T. harzianum* foram cultivadas a 28° C em MM suplementado com 2% de glicose e, 0.1, 0.4 e 1 M de NaCl. As culturas foram incubadas por 48 h e o diâmetro de crescimento micelial foi medido.

6 Resultados

6.1 Epl-1 de *T. harzianum* reprime a expressão relativa de genes de virulência de *B. cinerea* 05.10 após o contato das hifas

No intuito de determinar se a proteína Epl-1 afeta a expressão de genes representativos que codificam a fatores de virulência em *B. cinerea*, RNAs isolados de micélio coletado de

ensaios de confronto em placa entre *B. cinerea* 05.10 e as linhagens selvagem e mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum*, antes a após o contato das hifas ou sem *T. harzianum* como controle e analisados por RT-qPCR. Foram analisados genes que codificam às enzimas envolvidas na biossíntese de botrydial (BOT) (*BcBOT5*, *BcBOT3*, *BcBOT2*, *BcBOT1* e *BcBOT4*); o gene que codifica à um fator de transcrição global que participa na regulação dos genes *BcBOT* (*YOH1*); *Bcsod1* o qual codifica à uma superóxido dismutase; *BcatrB* que codifica à um transportador do tipo ABC (*ATP Binding Cassette*); *BcBMP1* que codifica à uma MAPK e *Bcpg1* o qual codifica à uma endopoligalacturonase 1.

Antes do contato das hifas, os resultados indicaram que apenas dois genes de virulência de *B. cinerea* (*BcatrB* e *Bcpg1*) foram induzidos pela linhagem selvagem de *T. harzianum* quando comparados com o controle (Figura 22A). A linhagem mutante reprimiu cinco genes (*BcBOT1*, *BcBOT2*, *BcBOT4*, *BcBOT5* e *Bcpg1*) e induziu o gene *Bcsod1* (Figura 22B). A razão entre os confrontos de *B. cinerea* e as linhagens mutante e selvagem (*fold change*) indicou que, antes do contato das hifas, na ausência da proteína Epl-1 os genes de virulência de *B. cinerea* *BcBOT1*, *BcBOT2*, *BcBOT5* e *Bcpg1* foram ligeiramente reprimidos (Figura 22C).

Figura 22: Análises de RT-qPCR da expressão relativa de genes de virulência de *B. cinerea* em ensaios de confronto contra linhagens de *T. harzianum* sem contato das hifas. **(A)** Razão dos níveis de expressão em condição de confronto de *B. cinerea* com a linhagem Selvagem de *T. harzianum*. **(B)** Razão dos níveis de expressão em condição de confronto de *B. cinerea* com a linhagem mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum*. **(C)** Razão dos níveis de expressão do patógeno

Hospedeiros

confrontado com a linhagem selvagem de *T. harzianum* em comparação com os níveis de expressão do patógeno confrontado com a linhagem *T. harzianum* $\Delta epl-1$. As razões de expressão bem como os valores estatísticos de probabilidade foram calculados utilizando o programa REST 2009. Os dados numéricos estão ilustrados ao lado de cada gráfico de expressão sendo indicados com asterisco aqueles que foram estatisticamente significantes ($P \leq 0.03$). P(H1) – Probabilidade da hipótese alternativa de que a diferença entre a amostra e o grupo controle seja devida apenas ao acaso.

Os resultados após o contato das hifas indicaram que seis genes de *B. cinerea* (*BcBOT1*, *BcBOT2*, *BcBOT4*, *BcBOT5*, *BcatrB* e *BcBMP1*) foram reprimidos pela linhagem selvagem de *T. harzianum* e apenas um gene (*Bcpgl*) foi induzido, quando comparado com o controle (Figura 23A). *T. harzianum* $\Delta epl-1$ induziu seis genes de virulência em *B. cinerea* (*BcBOT3*, *BcBOT4*, *Bcsod1*, *BcBMP1*, *Bcpgl* e *YOHI*) e reprimiu um gene (*BcatrB*) quando comparado com o controle (Figura 23B). A razão entre os níveis de expressão dos genes de virulência de *B. cinerea* na presença de *T. harzianum* $\Delta epl-1$ em relação à linhagem selvagem, após o contato das hifas, mostrou que todos os dez genes analisados foram induzidos (Figura 23C).

Figura 23: Análises de RT-qPCR da expressão relativa de genes de virulência de *B. cinerea* em ensaios de confronto contra linhagens de *T. harzianum* após o contato das hifas. **(A)** Razão dos níveis de expressão em condição de confronto de *B. cinerea* com a linhagem Selvagem de *T. harzianum*. **(B)** Razão dos níveis de expressão em condição de confronto de *B. cinerea* com a linhagem mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum*. **(C)** Razão dos níveis de

Hospedeiros

expressão do patógeno confrontado com a linhagem selvagem de *T. harzianum* em comparação com os níveis de expressão do patógeno confrontado com a linhagem *T. harzianum* $\Delta epl-1$. As razões de expressão bem como os valores estatísticos de probabilidade foram calculados utilizando o programa REST 2009. Os dados numéricos estão ilustrados ao lado de cada gráfico de expressão sendo indicados com asterisco aqueles que foram estatisticamente significantes ($P < 0.03$). P(H1) – Probabilidade da hipótese alternativa de que a diferença entre a amostra e o grupo controle seja devida apenas ao acaso.

6.2 Proteína Epl-1 de *T. harzianum* está envolvida na indução do efeito *primer* em plantas de tomate

Foram investigados os níveis de expressão de vários genes relacionados à defesa em folhas de plantas de tomate de quatro semanas que tiveram suas sementes tratadas com linhagens selvagem e mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum*. Nós analisamos marcadores relacionados a ambas as vias metabólicas, ácido salicílico (SA) (*PR1b1* e *PR-PR-2*) e jasmonato (JA) (*PINI*, *PINII* e *TomLoxA*) e um gene adicional, marcador de desenvolvimento de plantas (*SucS*) (D), sob as condições descritas na seção Materiais e Métodos. Como mostrado na Figura 24A, a linhagem selvagem de *T. harzianum* induziu ligeiramente os genes *PR-PR-2* (SA) e o gene de desenvolvimento de plantas *SucS*, e reprimiu *TomLoxA* (JA) (Condição 1), *T. harzianum* $\Delta epl-1$ sozinho, reprimiu a maioria dos genes analisados, *PR-PR-2* (SA), *PINI* e *TomLoxA* (JA), incluindo *SucS* (D) e induziu ligeiramente apenas *PINII* (JA), (condição 2) (Figura 24B), a razão (*folding change*) entre *T. harzianum* $\Delta epl-1$ e selvagem mostrou que a linhagem mutante reprimiu os níveis de expressão de *PR-PR-2* (SA) e *SucS* (D), (condição 3) (Figura 24C). *B. cinerea* sozinho, induziu drasticamente a expressão dos genes relacionados à defesa de plantas de ambas as vias metabólicas *PR1b1* (SA) e *PINII* (JA) e reprimiu os genes *PINI* e *TomLoxA* (JA) (condição 5) (Figura 24E). Quando comparado o efeito de *T. harzianum* $\Delta epl-1$ em relação à linhagem selvagem na presença do patógeno, a via SA se apresentou estável (*PR-PR-2*) ou levemente reprimido (*PR1b1*) e a via JA foi induzida apenas com o gene *PINI*, o gene *PINII* foi reprimido e *TomLoxA* não foi afetado (Condição 4) (Figura 24D). O gene *SucS* (D) mesmo quando induzido não se refletiu fenotipicamente nas plantas analisadas (dados não mostrados).

Figura 24: Níveis de expressão relativa de genes relacionados à defesa pertencentes às vias metabólicas de SA e JA em plantas de tomate de quatro semanas. **A** – Níveis de expressão de genes de defesa em plantas de tomate com sementes revestidas com a linhagem selvagem de *T. harzianum*. **B** - Níveis de expressão de genes de defesa em plantas de tomate com sementes revestidas com a linhagem mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum*. **C** – Razão dos níveis de expressão (*folding change*) de genes de defesa em plantas de tomate entre as linhagens selvagem e mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum*. **D** - Razão dos níveis de expressão (*folding change*) de genes de defesa em plantas de tomate entre as linhagens selvagem e mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum* na presença do patógeno *B. cinerea* (Bc). **E** – Níveis de expressão de genes de defesa em plantas de tomate após inoculação do patógeno *B. cinerea* (Bc). Os dados da razão da expressão foram obtidos e representados usando o programa REST©2009. p(H1) –

Probabilidade de que a diferença entre os grupos de amostra e controle deve-se apenas ao acaso. *: $p(H1) \leq 0.03$.

6.3 Efeito das Linhagens de *T. harzianum* na Expressão de Genes Relacionados à Defesa em Culturas Hidropônicas de Plantas de Tomate

Pelo fato de que as linhagens selvagem e mutante de *T. harzianum* afetaram apenas ligeiramente a expressão de genes de plantas de tomate após quatro semanas de interação, nós analisamos esses mesmos grupos de genes em culturas hidropônicas de plantas de tomate para avaliar se o fator tempo seria determinante na indução da expressão dessas vias. Assim, as partes aéreas das plantas foram extraídas e os RNAs foram isolados 12 h após a inoculação de ambas as linhagens de *T. harzianum*. Plantas sem linhagens de *T. harzianum* foram usadas como condição controle. Como mostrado na Figura 25A e B, o fator tempo de inoculação é uma variável importante nos níveis de expressão de ambas as vias de defesa em plantas de tomate. A linhagem selvagem de *T. harzianum* sozinha afetou todos os genes analisados, induzindo *PR1b1*, *PR-P2* (SA), *PINI*, *PINII* (JA) e reprimindo *TomLoxA* (JA) (Figura 25A). A linhagem mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum* sozinha, afetou a expressão desses genes de maneira ligeiramente diferente, sendo o gene *PR-P2* (SA) reprimido e o gene *PINII* não foi estatisticamente diferente comparado ao controle (Figura 25B). A razão (*folding change*) entre a expressão das plantas inoculadas com a linhagem mutante comparada com a selvagem mostrou que o mutante ligeiramente induziu os genes *PR1b1* (SA), *PINI* e *PINII* (JA) e reprimiu os genes *PR-P2* (SA) e *TomLoxA* (JA) (Figura 25C).

Figura 25: Níveis de expressão relativa de genes relacionados à defesa pertencentes às vias metabólicas de SA e JA em culturas hidropônicas de tomate inoculadas com linhagens selvagem e mutante $\Delta Epl-1$ de *T. harzianum*. **A** – Níveis de expressão de genes de defesa em plantas de tomate inoculadas com a linhagem selvagem de *T. harzianum*. **B** - Níveis de expressão de genes de defesa em plantas de tomate inoculadas com a linhagem mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum*. **C** – Razão dos níveis de expressão (*folding change*) de genes de defesa em plantas de tomate entre as linhagens selvagem e mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum*. Os dados da razão da expressão foram obtidos e representados usando o programa REST©2009. p(H1) – Probabilidade de que a diferença entre os grupos de amostra e controle deve-se apenas ao acaso. *: p(H1) $\leq$ 0.03.

6.4 Proteína Epl-1 de *T. harzianum* está envolvida nos estágios iniciais de colonização de raízes de plantas de tomate

Raízes de culturas hidropônicas de plantas de tomate foram inoculadas com linhagens selvagem e mutante de *T. harzianum*, como indicado na seção Materiais e Métodos. As raízes de ambos os tratamentos foram extraídas após 24 h após a inoculação das linhagens de *Trichoderma* e seus respectivos RNAs foram isolados. A análise realizada por qPCR da razão

da expressão do gene *GAPDH* de tomate em relação à expressão do gene α -actina de *Trichoderma*, 24 h após a inoculação das linhagens resultou em razões de colonização de 1 e 0.41 para as linhagens selvagem (controle) e $\Delta epl-1$ respectivamente, indicando que a proteína Epl-1 afetou o processo inicial de colonização das raízes pelas linhagens de *Trichoderma*.

Análises adicionais de qPCR do gene *TomLoxA* mostrou que o nível de expressão deste gene está mais reprimido em plantas inoculadas com a linhagem mutante $\Delta epl-1$ (Figura 26A, B, C) corroborando com os dados de colonização de raiz.

Figura 26: Níveis de expressão relativa do gene *TomLoxA* em raízes de culturas hidropônicas de tomate 24 h após inoculação com linhagens selvagem e mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum*. **A** – Níveis de expressão do gene *TomLoxA* em raízes de plantas de tomate inoculadas com a linhagem selvagem de *T. harzianum*. **B** - Níveis de expressão do gene *TomLoxA* em raízes de plantas de tomate inoculadas com a linhagem mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum*. **C** – Razão dos níveis de expressão (*folding change*) do gene *TomLoxA* em raízes de plantas de tomate entre as linhagens selvagem e mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum*. Os dados da razão da expressão foram obtidos e representados usando o programa REST©2009. p(H1) – Probabilidade de que a diferença entre os grupos de amostra e controle deve-se apenas ao acaso. *: p(H1) $\leq$ 0.03.

6.5 Epl-1 de *T. harzianum* afeta a produção de produtos da via metabólica dos terpenos

A produção de esqualeno e ergosterol, que são produtos da via metabólica dos terpenos em fungos filamentosos, foi quantificada em culturas de *T. harzianum*, selvagem e mutante $\Delta epl-1$, crescidos por 96 horas com ou sem 10 e 25µg/mL de TRB. A produção de ergosterol foi reduzida cerca de 20% em culturas da linhagem de *T. harzianum* $\Delta epl-1$ sem TRB comparado com a linhagem selvagem. Em culturas com 10µg/mL TRB a redução foi de cerca de 7%, com 25µg/mL de TRB a redução foi de cerca de 5% (Tabelas 3 e 4). O acúmulo de esqualeno foi aumentado aproximadamente 47% e 51.7% em culturas com 10 e 25µg/mL de TRB, respectivamente (Tabelas 5 e 6).

Tabela 3: Quantificação de Ergosterol (TRB - 10µg/mL) pelas linhagens selvagem (*Th*) e mutante ($\Delta epl-1$) de *T. harzianum* em meio de cultivo líquido crescido por 96 h, na presença ou ausência de Terbinafina (TRB - 10µg/mL). As análises foram feitas em duplicatas (A e B). mgE/gps: miligrama de Ergosterol/ grama de peso seco.

Quantificação de Ergosterol (TRB – 10 µg/mL)				
Amostra	Ergosterol (%)	Média (%)	mgE/gps	Média (mg)
<i>Th</i> – A	0,599	0,582	7,079	6,671
<i>Th</i> – B	0,564		6,263	
$\Delta epl-1$ – A	0,536	0,546	6,272	6,553
$\Delta epl-1$ – B	0,555		6,833	
<i>Th</i> - A + TRB – A	0,477	0,497	6,077	5,660
<i>Th</i> - B +TRB – B	0,516		5,242	
$\Delta epl-1$ + TRB – A	0,449	0,453	5,899	6,062
$\Delta epl-1$ + TRB – B	0,456		6,225	

Tabela 4: Quantificação de Ergosterol (TRB - 25µg/mL) pelas linhagens selvagem (*Th*) e mutante ($\Delta epl-1$) de *T. harzianum* em meio de cultivo líquido crescido por 96 h, na presença

Hospedeiros

ou ausência de Terbinafina (TRB - 25µg/mL). As análises foram feitas em duplicatas (A e B). mgE/gps: miligrama de Ergosterol/ grama de peso seco.

Quantificação de Ergosterol (TRB – 25 µg/mL)				
Amostra	Ergosterol (%)	Média (%)	mgE/gps	Média (mg)
<i>Th</i> – A	0,536	0,517	7,021	6,571
<i>Th</i> – B	0,497		6,122	
$\Delta epl-1$ – A	0,575	0,562	8,861	7,753
$\Delta epl-1$ – B	0,549		6,645	
<i>Th</i> - A + TRB – A	0,452	0,463	5,196	5,572
<i>Th</i> - B +TRB – B	0,473		5,948	
$\Delta epl-1$ + TRB – A	0,492	0,484	7,597	7,351
$\Delta epl-1$ + TRB – B	0,475		7,105	

Tabela 5: Quantificação de Esqualeno pelas linhagens selvagem (*Th*) e mutante ($\Delta epl-1$) de *T. harzianum* em meio de cultivo líquido crescido por 96 h, na presença ou ausência de Terbinafina (TRB - 10µg/mL). As análises foram feitas em duplicatas (A e B). mgE/gps: miligrama de Esqualeno/ grama de peso seco.

Quantificação de Esqualeno (TRB – 10 µg/mL)		
Amostra	mgE/gps	Média (%)
<i>Th</i> – A	0,070	0,071
<i>Th</i> – B	0,072	
$\Delta epl-1$ – A	0,186	0,188
$\Delta epl-1$ – B	0,189	
<i>Th</i> - A + TRB – A	0,086	0,064
<i>Th</i> - B +TRB – B	0,042	
$\Delta epl-1$ + TRB – A	0,395	0,399
$\Delta epl-1$ + TRB – B	0,402	

Tabela 6: Quantificação de Esqualeno pelas linhagens selvagem (Th) e mutante ($\Delta epl-1$) de *T. harzianum* em meio de cultivo líquido crescido por 96 h, na presença ou ausência de Terbinafina (TRB - 25µg/mL). As análises foram feitas em duplicatas (A e B). mgE/gps: miligrama de Esqualeno/ grama de peso seco.

Quantificação de Esqualeno (TRB – 25 µg/mL)		
Amostra	mgE/gps	Média (%)
<i>Th</i> – A	0,060	0,060
<i>Th</i> – B	0,059	
$\Delta epl-1$ – A	0,197	0,196
$\Delta epl-1$ – B	0,195	
<i>Th</i> - A + TRB – A	0,090	0,090
<i>Th</i> - B +TRB – B	0,090	
$\Delta epl-1$ + TRB – A	0,384	0,379
$\Delta epl-1$ + TRB – B	0,374	

6. 6 Ensaio de Antibiógrama

O sobrenadante de culturas de linhagens de *T. harzianum* crescidas por 96 h em meio PDB foram extraídas com etil acetato, dissolvidos e concentrados 100x em acetonitrila como descrito em Materiais e Métodos e testado em relação ao crescimento de *B. cinerea* em placas contendo meio MEA. Após uma semana de incubação, o diâmetro da zona de inibição foi comparado e mostrou que a deleção de do gene *epl-1* em *T. harzianum* afetou a germinação de esporos e o crescimento de *B. cinerea* (Figura 27), sendo que a acetonitrila não afetou o seu crescimento (controle).

Figura 27: Ensaio de antibiograma. Sobrenadante de cultura de linhagens selvagem e mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum*, crescidos em meio líquido (PDB) por 96 h e 100x concentrados em acetonitrila foram aplicados em placas contendo meio MEA e testados quanto ao potencial de inibição de germinação dos esporos e crescimento micelial de *B. cinerea*.

7 Discussão

Trichoderma spp. estão entre os fungos de solo mais isolados, estando presentes nos ecossistemas de raízes de plantas, sendo simbioses, oportunistas, avirulentos e também atuam como parasitas e antagonistas de vários fungos fitopatogênicos, protegendo assim plantas de doenças (HARMAN et al., 2004). Competição por carbono, nitrogênio e outros fatores, juntamente com a competição por espaço ou sítios de infecção, pode também ser usado para controlar patógenos de plantas. *T. harzianum* é capaz de controlar fitopatógenos como *B. cinerea* colonizando o tecido floral e excluindo o patógeno do seu sítio de infecção (GULLINO, 1992). Neste estudo, a proteína Epl-1, um membro da família das CPs, conhecidos como fatores de virulência e que induzem resistência sistêmica e local em plantas, mostrou ser uma importante molécula no processo de interação com diferentes organismos hospedeiros.

Multiplos metabólitos derivados do grupo de genes de sesquiterpenos foram descritos em fungos filamentosos, incluindo o grupo botrydial (BOT) em *B. cinerea* (PINEDO et al., 2008). MALMIERCA et al., (2014) reportou a repressão desse grupo de genes pelo tricoteceno Harzianum A (HA) (o qual não apresenta fitotoxicidade em plantas), produzido por *Trichoderma arundinaceum*. Neste presente estudo, nós analisamos a influencia da proteína Epl-1 de *T. harzianum* no processo de interação com *B. cinerea*, avaliando o efeito

Hospedeiros

dessa proteína na expressão de dez genes de virulência em ensaios de confronto direto em placas, tanto antes quanto depois do contato das hifas. Os resultados indicaram que, antes do contato das hifas, a linhagem selvagem de *T. harzianum* não afetou a maioria dos genes analisados (Figura 22A), indicando que essa proteína não é muito difusível em meio sólido, por outro lado, a linhagem mutante reprimiu levemente cinco dos dez genes analisados (Figura 22B). Após o contato das hifas, a linhagem selvagem afetou o grupo de genes BOT, reprimindo seis dos dez genes de virulência de *B. cinerea* (*BcBOT1*, *BcBOT2*, *BcBOT4*, *BcBOT5*, *BcatrB* e *BcBMP1*), destacando a forte repressão de *BcatrB* o qual codifica um transportador do tipo ABC que contribui com o crescimento e a patogenicidade em *B. cinerea* (DEL SORBO et al., 2008; Figura 23A), enquanto o mutante induziu a maioria dos genes desse grupo (Figura 23B). Essa evidência se torna mais clara quando comparada a razão dos níveis de expressão desses genes (*folding change*) entre as duas linhagens, selvagem e mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum*, onde a linhagem mutante fortemente induziu todos os genes analisados (Figura 23C), sugerindo assim que Epl-1 reprime os genes de virulência em *B. cinerea* podendo, portanto, ser uma importante molécula durante o processo de micoparasitismo na diminuição da agressividade de fungos fitopatogênicos, bem como na diminuição da severidade dos sintomas de doenças causadas por esses patógenos.

Plantas estão em contínua batalha evolutiva contra uma grande variedade de micróbios e outros organismos. Patógenos geralmente acessam o interior de plantas pela penetração direta da superfície de folhas e raízes ou pela entrada através de ferimentos ou de aberturas naturais tais como os estômatos das folhas. A colonização por linhagens de *Trichoderma* dispara um amplo arranjo de respostas em plantas, os quais podem resultar na potencialização da capacidade defensiva da planta (ALFANO et al., 2007; BAILEY et al., 2006; MARRA et al., 2006; MORÁN-DIEZ et al., 2012). Geralmente, os efeitos de *Trichoderma* no sistema de defesa de plantas não são restritos às raízes, mas também se manifestam nos tecidos aéreos (MARTÍNEZ-MEDINA et al., 2010, 2011; MATHYS et al., 2012; SALAS-MARINA et al., 2011), promovendo na planta mais resistência a um amplo espectro de patógenos. Essa resistência sistêmica é provavelmente o resultado da modulação da rede de defesa da planta que pode traduzir os primeiros eventos de sinalização induzidos por *Trichoderma* em uma ativação mais eficiente de resposta de defesa. É sabido que os fitormônios ácido jasmônico (JA), ácido salicílico (SA) e ácido abscísico (ABA) agem como sinais primários dominantes na regulação de respostas de defesa locais e sistêmicas em plantas (PIETERSE et al., 2009), dessa maneira eles desempenham um papel central no fenômeno de indução de resistência.

Geralmente, patógenos induzem o processo de resistência sistêmica adquirida (SAR), o qual é dependente da via de sinalização regulada por SA (DURRANT; DONG, 2004), enquanto a resistência sistêmica induzida (ISR) é um sinal decorrente da interação com microrganismos benéficos e geralmente depende da sinalização do JA (PIETERSE et al., 1996; POZO et al., 2008; VAN DER ENT; VAN WEES; PIETERSE, 2009; VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998; VAN WEES; VAN DER ENT; PIETERSE, 2008). Nesse estudo, foram analisadas as expressões de genes marcadores para ambas as vias, do ácido salicílico (SA; *PR1b1* e *PR-P2*, que codificam para genes relacionados à patogênese 1 e 4 respectivamente), e do jasmonato (JA; *PINI*, *PINII* e *TomLoxA*, que codificam para os inibidores de proteinase I e II e para uma lipoxigenase, respectivamente) em plantas de tomate de quatro semanas de desenvolvimento na presença das linhagens selvagem e mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum* e também quando essas plantas foram desafiadas com o patógeno *B. cinerea*. A penetração das raízes por *Trichoderma* é conhecido por aumentar a expressão de genes relacionados à defesa e a produção de compostos com ação antimicrobiana, porém apenas transientemente (SHORESH; YEDIDIA; CHET, 2005; YEDIDIA; BENHAMOU; CHET, 1999; YEDIDIA; SHORESH, 2003), entretanto, foi reportado que a colonização da rizosfera por *Trichoderma* poderia manter a transcrição de alguns genes relacionados à defesa em níveis baixos, porém significantes durante relativamente longos períodos de tempo (ALFANO et al., 2007; TUCCI et al., 2011). Esses relatos estão de acordo com nossos resultados, onde após quatro semanas de interação de plantas de tomate com a linhagem selvagem de *T. harzianum*, a via de SA (*PR-P2*) estava ligeiramente induzida, comparada com a condição controle (Figura 24A). Esta ligeira indução da via de SA por linhagens de *Trichoderma* antes da inoculação de *B. cinerea*, já foi previamente relatada (CARDOZA et al., 2011; HAREL et al., 2014; TUCCI et al., 2011) e esse efeito pode ter sido influenciado pela presença da proteína Epl-1, considerando que três dos cinco genes (*PR-P2*, *PINI* e *TomLoxA*) de ambas as vias relacionadas à defesa foram fortemente reprimidas quando as plantas estavam interagindo com a linhagem mutante $\Delta epl-1$ (Figura 24B, C). Plantas desafiadas apenas com o patógeno *B. cinerea*, afetou drasticamente ambas as vias relacionadas à defesa, destacando os genes *PR-P2* (SA) e *PINII* (JA), reprimindo os genes *PINI* e *TomLoxA* (JA) (Figura 24E). Entretanto, quando as plantas foram desafiadas com o patógeno *B. cinerea*, na presença de *Trichoderma*, a ausência de Epl-1 reprimiu a expressão relativa de *PR1b1* (SA) e *PINII* (JA) (Figura 24D). Além disso, raízes de plantas colonizadas por linhagens de *Trichoderma* foram reportadas como “sensibilizadas”, respondendo mais rápida e intensivamente ao ataque de patógenos, seguindo um mecanismo

Hospedeiros

conhecido como efeito *priming* (AHN; LEE; SUH, 2007; CONRATH et al., 2006), sendo que esse efeito nas vias de defesa já foi previamente reportado em condições de infecção por *B. cinerea* (AHN; LEE; SUH, 2007; HAREL et al., 2014; MALMIERCA et al., 2012; PALMIERI et al., 2012; TUCCI et al., 2011). Assim, nossos resultados sugerem que Epl-1 está diretamente envolvida com o efeito *priming* induzido por *T. harzianum* em plantas de tomate.

Em relação aos níveis de expressão do gene relacionado ao desenvolvimento de plantas (*SucS*), nossos resultados indicaram que esse gene foi fortemente reprimido em plantas de tomate após quatro semanas de desenvolvimento inoculadas com a linhagem mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum* (Figura 24B, C). O comportamento desse gene de desenvolvimento não refletiu em um fenótipo detectável, as medidas de comprimento e diâmetro do caule não apresentaram diferenças significativas entre ambas as plantas de tomate inoculadas com as linhagens de *Trichoderma* e o tratamento controle (dados não mostrados). Outro resultado negativo foram as análises de desenvolvimento em condições de estresse (temperatura e salinidade) onde não foram observadas diferenças significativas no desenvolvimento das linhagens selvagem e mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum* (dados não mostrados).

Nós também estávamos interessados no efeito de Epl-1 na expressão de genes de defesa em plantas de tomate nos primeiros estágios de interação com linhagens de *T. harzianum*. Para essa finalidade, nós utilizamos cultura de tomate hidropônico e analisamos os mesmos grupos de genes de defesa de tomate descritos previamente, 24 h após a inoculação das linhagens de *Trichoderma*. Interessantemente, a indução dos genes de ambas as vias de defesa, após a inoculação da linhagem selvagem (Figura 25A) e a repressão dos genes *PR-P2* (SA) e *TomLoxA* (JA) após a inoculação da linhagem mutante (Figura 25B, C), sugerem mais uma vez a função de Epl-1 como elicitor de ambas as vias de defesa também nos estágios iniciais da interação planta-*Trichoderma*.

Outro dado que chama a atenção em plantas inoculadas com linhagens de *Trichoderma*, foi a relativa repressão da expressão do gene *TomLoxA* em raízes de cultura hidropônica de plantas de tomate inoculadas com a linhagem mutante $\Delta epl-1$ (Figura 26A, B, C). A indução desse gene foi relacionada com o controle de propagação de fungos benéficos em raízes (CARDOZA; MALMIERCA; GUTIÉRREZ, 2014; HAREL et al., 2014; LEÓN-MORCILLO et al., 2012). Portanto, nossos dados de expressão estão de acordo com o índice de colonização de raiz observado, onde a capacidade da linhagem mutante em colonizar as

raízes de plantas de tomate foi reduzida em 59% nas primeiras 24 h comparado com a linhagem selvagem, indicando uma função da proteína Epl-1 nos estágios iniciais no processo de interação planta-*Trichoderma* para colonização de raízes.

Terpenos são os metabólitos secundários com a maior amplitude de ocorrência na natureza. Fungos filamentosos, incluindo *Trichoderma*, produzem grandes séries desses compostos com muitas aplicações (CARDOZA et al., 2005). Um dos pontos chave na via biosintética dos triterpenóides, tais como ergokoninas A e B, viridianas e ergosterol, é a epoxidação do esqualeno, catalizado pela esqualeno epoxidase, codificada pelo gene *erg1*. Previamente, foi descrito que a esqualeno epoxidase é o alvo para a ação de compostos antifúngicos semelhantes à alilamina (RYDER, 1991), tal como a terbinafina (TRB) a qual apresenta alta especificidade à esqualeno epoxidase (NUSSBAUMER; PETRANYI; STÜTZ, 1991) (Figura 28). No presente trabalho, foram medidas as produções de esqualeno e ergosterol em culturas de ambas as linhagens, selvagem e mutante $\Delta epl-1$, crescidos em meio mínimo (MM) por 96 h, sem e com 10 e 25µg/mL de TRB, como descrito em Materiais e Métodos. Sobre a produção de esqualeno em culturas sem TRB, os resultados não foram conclusivos devido às diferenças nas médias das duplicatas, porém seguiu-se a tendência de acúmulo de esqualeno na linhagem mutante. Nas culturas com TRB também observa-se forte acúmulo de esqualeno, 47 e 52% com 10 e 25µg/mL de TRB respectivamente (Tabelas 5 e 6). Em relação a produção de ergosterol, os resultados indicaram uma redução da produção de na linhagem mutante, comparado com a linhagem selvagem o que faz sentido tendo em vista um maior acúmulo de esqualeno. Nas culturas sem TRB a redução foi de aproximadamente 15% porém, surpreendentemente, as culturas com TRB a redução foi de 7.5 e 5% para as concentrações de 10 e 25µg/mL respectivamente (Tabelas 3 e 4). Efetivamente, era esperada uma maior redução da produção de ergosterol em culturas com TRB, em função da interrupção da principal via de produção, bloqueando o gene *erg1*, portanto faz se necessária a repetição da quantificação da produção de ergosterol e esqualeno em linhagens de *T. harzianum* para confirmar os resultados obtidos. No caso de confirmação dos resultados, novos testes serão necessários para entender como a proteína Epl-1 interfere na via dos terpenos e produção de metabólitos secundários, abrindo uma nova e interessante área de pesquisa para nosso grupo.

Figura 28: Representação esquemática da via biosintética de terpenos indicando especificamente onde age o composto terbinafina. HMG-CoA, 3'-hidroxi-3'-metilglutail-CoA; MVA, mevalonato; IPP, isopentenil difosfato, DMAPP, dimetillalil difosfato; GPP, geranil difosfato; FPP, farnesil difosfato; EE, esqualeno epoxidase; TBF, terbinafina. (CARDOZA et al., 2007 – Modificado).

Trichoderma spp. produz uma gama de antibióticos voláteis e não voláteis ativos contra uma grande variedade de fungos (GHISALBERTI; SIVASITHAMPARAM, 1991). Para analisar se a proteína Epl-1 afeta a produção de compostos antibióticos, foram testados concentrados do sobrenadante de culturas de 96 h de ambas as linhagens de *Trichoderma*, incubados em placas contendo meio MEA inoculados com esporos de *B. cinerea* por uma semana. Interessantemente, os resultados mostraram diferenças significativas no crescimento e na germinação dos esporos (Figura 27), indicando que a proteína Epl-1 afeta também, além da via dos terpenos, a produção de metabólitos secundários com propriedades antibióticas. Estes testes também requerem testes adicionais para maiores detalhes sobre essa importante e interessante via.

Assim, os resultados reportados nesse estudo podem indicar novas funções ecológicas e fisiológicas para a proteína Epl-1 de *T. harzianum*, na competitividade fúngica e na interação *Trichoderma*-planta-patógeno-*Trichoderma* onde, além da ação de molécula

Hospedeiros

elicitadora de resistência em plantas, Epl-1 também interfere na colonização de raízes de plantas, diminuição da virulência de patógenos e produção de compostos de vias biossintéticas secundárias de ação antimicrobiana sendo, portanto, uma importante molécula na interação de *Trichoderma* e diferentes hospedeiros.

8 Conclusões e Perspectivas

Apesar do real papel da proteína Epl-1 na fisiologia de *T. harzianum* não estar totalmente claro, as informações disponíveis sobre essa proteína e os dados gerados nesse trabalho mostraram que Epl-1 tem uma função fundamental na bem sucedida adaptação de *Trichoderma* em seu ambiente e especialmente na interação com outros organismos. Os dados observados nesse trabalho indicam várias funções, primárias e secundárias de Epl-1 no processo de reconhecimento (da própria parede celular e de parede celular de diferentes hospedeiros), na modulação de genes envolvidos no processo de micoparasitismo, colonização de plantas hospedeiras, na diminuição da virulência de fitopatógenos, produção de antibióticos e outros compostos do metabolismo secundário em *T. harzianum*. Até o momento, essa proteína tem sido descrita apenas como um elicitor de resposta de resistência em plantas, não sendo conhecida ainda sua função primária na fisiologia do *Trichoderma*, bem como ainda não sendo associada ao processo de micoparasitismo, antagonismo e biocontrole. Assim, análises complementares ainda se fazem necessárias para um melhor entendimento de Epl-1 na interação de *Trichoderma* com linhagens de mesma espécie e com seus hospedeiros, no intuito de desenvolver melhores estratégias no combate de patógenos e lavouras mais resistentes ao ataque de uma grande variedade de organismos fitopatogênicos com consequente aumento da produção de alimentos e menor poluição ambiental por pesticidas e outros compostos químicos.

9 – Bibliografia Fundamental

AHMED, A. S.; SÁNCHEZ, C. P.; CANDELA, M. E. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, n. 9, p. 817–824, 2000.

AHN, I.-P.; LEE, S.-W.; SUH, S.-C. Rhizobacteria-induced priming in *Arabidopsis* is dependent on ethylene, jasmonic acid, and NPR1. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 20, n. 7, p. 759–768, 2007.

ALDRICH-WOLFE, L.; TRAVERS, S.; NELSON, B. D. Genetic Variation of *Sclerotinia sclerotiorum* from Multiple Crops in the North Central United States. **Plos One**, v. 10, n. 9, p. 1 - 18.

ALFANO, G. et al. Systemic Modulation of Gene Expression in Tomato by *Trichoderma hamatum* 382. **Phytopathology**, v. 97, n. 4, p. 429–437, 2007.

ALMEIDA, F. B. D. R. et al. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology letters**, v. 29, n. 8, p. 1189–93, 2007.

BAILEY, B. A. et al. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. **Planta**, v. 224, p. 1449–1464, 2006.

BELL D. K., WELLS H. D., M. C. R. In Vitro Antagonism of *Trichoderma* species Against Six Fungal Plant Pathogens. **The American Phytopathological Society**, v. 72, p. 379–382, 1982.

BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249–60, 2004.

BODDI, S. et al. Cerato-platanin protein is located in the cell walls of ascospores, conidia and hyphae of *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. **FEMS microbiology letters**, v. 233, n. 2, p. 341–6, 15 2004.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de

- Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2006.
- BOSTOCK, R.; KARBAN, R.; THALER, J. Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 103–111, 2001.
- CAFE FILHO, A. C.; LOBO JÚNIOR, M. Manejo de fatores físicos e culturais para controle de patógenos do solo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p. 267–301, 2000.
- CAMARGO, A. M. M. P. DE. Desenvolvimento do sistema agroindustrial de tomate. In: **Informações Econômicas**. [s.l: s.n.]. p. 53–65.
- CARDOZA, R. E. et al. Secondary metabolites produced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. In: **Microorganism for Industrial Enzymes and Biocontrol**. [s.l: s.n.]. p. 1–22.
- CARDOZA, R. E. et al. Partial silencing of a hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase-encoding gene in *Trichoderma harzianum* CECT 2413 results in a lower level of resistance to lovastatin and lower antifungal activity. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, p. 269–283, 2007.
- CARDOZA, R. E. et al. Identification of Loci and Functional Characterization of Trichothecene Biosynthesis Genes in Filamentous Fungi of the Genus *Trichoderma*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 14, p. 4867–4877, 2011.
- CARDOZA, R. E.; MALMIERCA, M. G.; GUTIÉRREZ, S. Overexpression of *erg1* gene in *Trichoderma harzianum* CECT 2413: effect on the induction of tomato defence-related genes. **Journal of applied microbiology**, v. 117, n. 3, p. 812–23, 2014.
- CARLSON, J. M. et al. SCOPE: a web server for practical de novo motif discovery. **Nucleic acids research**, v. 35, n. Web Server issue, p. W259–64, 2007.
- CARSOLIO, C. et al. Characterization of *ech-42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 23, p. 10903–7, 1994.
- CHAVERRI, P. et al. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum* / *Hypocrea lixii* complex. v. 27, p. 302–313, 2003.
- CHAVES, G. M. Estudos sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Experimentae**, v. 4,

p. 69–133, 1964.

CHET, I.; INBAR, J. Biological control of fungal pathogens. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 48, p. 37–43, 1994.

COLABARDINI, A. C. et al. Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* *fbxA* encoding an F-box protein involved in xylanase induction. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 2, p. 130–140, 2012.

COLMENARES, A. J. et al. The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 5, p. 997–1005, 2002.

COLOT, H. V et al. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 27, p. 10352–10357, 2006.

CONRATH, U. et al. Priming: getting ready for battle. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 19, n. 10, p. 1062–1071, 2006.

CORRADI, N.; BONFANTE, P. The Arbuscular mycorrhizal symbiosis: Origin and evolution of a beneficial plant infection. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, p. 8–10, 2012.

CORTES, C. et al. The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by a diffusible factor. **Molecular and General Genetics**, v. 260, p. 218–225, 1998.

DALMAIS, B. et al. The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 6, p. 564–579, 2011.

DE MEYER, G. et al. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, n. 3, p. 279–286, 1998.

DE OLIVEIRA, A. L. et al. The structure of the elicitor Cerato-platanin (CP), the first member of the CP fungal protein family, reveals a double $\psi\beta$ -barrel fold and carbohydrate binding. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 20, p. 17560–8, 2011.

DEIGHTON, N. et al. Botrydial is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry**, v. 57, n. 5, p. 689–692, 2001.

DEL SORBO, G. et al. Cloning and functional characterization of *BcatrA*, a gene encoding an

ABC transporter of the plant pathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). **Mycological Research**, v. 112, p. 737–746, 2008.

DJONOVIC, S. et al. A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. **Plant physiology**, v. 145, n. 3, p. 875–889, 2007.

DJONOVIĆ, S. et al. Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 19, n. 8, p. 838–853, 2006.

SILVA, R. et al. Involvement of G-alpha protein GNA3 in production of cell wall-degrading enzymes by *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) during mycoparasitism against *Pythium ultimum*. **Biotechnology letters**, v. 31, n. 4, p. 531–6, 2009.

DRUZHININA, I. S. et al. Molecular phylogeny and species delimitation in the section *Longibrachiatum* of *Trichoderma*. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 49, n. 5, p. 358–68, 2012.

DRUZHININA, I. S.; KOPCHINSKIY, A. **ISTH (International Subcomission on Trichoderma and Hypocrea Taxonomy)**. Available from <http://www.isth.info>

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual review of phytopathology**, v. 42, p. 185–209, 2004.

EBBOLE, D. J. Hydrophobins and fungal infection of plants and animals. **Trends in microbiology**, v. 5, n. 10, p. 405–8, 1997.

ELAD, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. **Crop Protection**, v. 19, p. 709–714, 2000.

ELAD, Y. WILLIAMSON, B. TUDZYNSKI, P. DELEN, N. *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems – an introduction. In: **Botrytis: Biology, Pathology and Control**. [s.l.: s.n.].

FLORES, A.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase encoding gene prb1. **Current Genetics**, v. 31, p. 30–37, 1997.

FRASER, P. M. The impact of soil and crop management practices on soil macrofauna. In: **Soil Biota-Management in Sustainable Farming Systems**. [s.l.: s.n.]. p. 125–132.

- FREITAS, R. S. et al. Cloning and characterization of a protein elicitor Sm1 gene from *Trichoderma harzianum*. **Biotechnology letters**, v. 36, n. 4, p. 783–8, 2014.
- FRIGHETTO, R. T. S. Influência do manejo de agrotóxicos no meio ambiente. **Fitopatologia brasileira**, v. 25, p. 271–274, 2000.
- FRISCHMANN, A. et al. Self-assembly at air/water interfaces and carbohydrate binding properties of the small secreted protein EPL1 from the fungus *Trichoderma atroviride*. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 6, p. 4278–87, 2013.
- GADERER, R. et al. Sm2, a paralog of the *Trichoderma* cerato-platanin elicitor Sm1, is also highly important for plant protection conferred by the fungal-root interaction of *Trichoderma* with maize. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2015.
- GARDINER, D. M.; KAZAN, K.; MANNERS, J. M. Cross-kingdom gene transfer facilitates the evolution of virulence in fungal pathogens. **Plant Science**, v. 210, p. 151–158, 2013.
- GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. **Nucleic acids research**, v. 31, p. 3784–3788, 2003.
- GHIMIRE, G. P.; HEI, C. L.; JAE, K. S. Improved squalene production via modulation of the methylerythritol 4-phosphate pathway and heterologous expression of genes from *Streptomyces peuceitius* ATCC 27952 in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 22, p. 7291–7293, 2009.
- GHISALBERTI, E. L.; SIVASITHAMPARAM, K. Antifungal Antibiotics Produced by *Trichoderma* spp. **Soil Biol. Biochem**, v. 23, n. 11, p. 1011–1030, 1991.
- GOLDMAN, G. H. et al. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: Identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 1, p. 34–48, 2003.
- GRUBER, F. et al. The development of a heterologous transformation system for the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* based on a *pyrG*-negative mutant strain. **Current Genetics**, v. 18, n. 1, p. 71–76, 1990.
- GRUBER, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 158, n. Pt 1, p. 26–34, 2012.
- GULLINO, M. L. Control of *Botrytis* rot of grapes and vegetables with *Trichoderma* spp. In: **Biological Control of Plant Diseases, Progress and Challenges for the Future**. [s.l: s.n.]. p.

125–132.

GWYNNE, D. I. et al. Comparison of the cis-acting control regions of two coordinately controlled genes involved in ethanol utilization in *Aspergillus nidulans*. **Gene**, v. 51, n. 2-3, p. 205–216, 1987.

HALL, R.; NASSER, L. C. B. Practice and precept in cultural management of bean diseases. **Can. Jour. of Plant Pathology**, v. 18, p. 176–185, 1996.

HAMMERSCHMIDT, R.; M'ETRAUX, J. P.; VAN LOON, L. C. Inducing resistance: A summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases, Corfu, May 2000. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. May 2000, p. 1–6, 2001.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. Resistance gene-dependent plant defense responses. **The Plant cell**, v. 8, p. 1773–1791, 1996.

HANSON, L. E.; HOWELL, C. R. Elicitors of Plant Defense Responses from Biocontrol Strains of *Trichoderma virens*. **Phytopathology**, v. 94, n. 2, p. 171–176, 2004.

HAREL, Y. M. et al. Systemic resistance to gray mold induced in tomato by benzothiadiazole and *Trichoderma harzianum* T39. **Phytopathology**, v. 104, n. 19, p. 150–7, 2014.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. **The American Phytopathological Society**, n. D, p. 377–393, 2000.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43–56, 2004.

HARMAN, G. E. Multifunctional fungal plant symbionts: New tools to enhance plant growth and productivity. **New Phytologist**, v. 189, n. 3, p. 647–649, 2011.

HEGEDUS, D. D.; RIMMER, S. R. *Sclerotinia sclerotiorum*: When to be or not to be a pathogen? **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 2, p. 177–184, 2005.

HERMOSA, R. et al. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v. 158, p. 17–25, 2012.

HOWELL, C. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant disease**, v. 87, n. 1, 2003.

- HOWELL, C. R. et al. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. **Phytopathology**, v. 90, p. 248–252, 2000.
- IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. [s.l: s.n.]. 2015.
- INBAR, J. & CHET, I. Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers. **Journal of Bacteriology**, v. 174 (3), p. 1055–1059, 1992.
- JONES, D.; WATSON, D. Parasitism and Lysis by Soil Fungi of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, a Phytopathogenic Fungus. **Nature**, v. 224, p. 287–288, 1969.
- KARS, I.; VAN KAN, J. A. L. Extracellular enzymes and metabolites involved in pathogenesis of *Botrytis*. In: **Botrytis: Biology, Pathology and Control**. [s.l: s.n.]. p. 99–118.
- KIRK, P. M. et al. **Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi**. [s.l: s.n.].
- KISHIMOTO, K. et al. Perception of the chitin oligosaccharides contributes to disease resistance to blast fungus *Magnaporthe oryzae* in rice. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 64, n. 2, p. 343–54, 2010.
- KOBAYASHI, N.; MCENTEE, K. Identification of cis and trans Components of a Novel Heat Shock Stress Regulatory Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cellular biology**, v. 13, n. 1, p. 248–256, 1993.
- KUBICEK, C. P. et al. *Trichoderma*: From Genes to Biocontrol. **Journal of Plant Pathology**, v. 83, p. 11–23, 2001.
- KUBICEK, C. P. et al. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. **Genome biology**, v. 12, n. 4, p. R40, 2011.
- KUC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 7–12, 2001.
- KUDLA, B. et al. The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. **The EMBO journal**, v. 9, p. 1355–1364, 1990.
- KUHLS, K. et al. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 15, p. 7755–7760, 1996.

KULLNIG, C. et al. Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma ech42* gene expression before mycoparasitic contact. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n. 5, p. 2232–2234, 2001.

KULMBURG, P., MATHIEU, M., DOWZER, C., KELLY, J., AND FELENBOK, B. Specific binding-sites in the *alcR* and *alcA* promoters of the ethanol regulon for the CREA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Microbiol.**, v. 7, p. 847–857, 1993.

LEÓN-MORCILLO, R. J. et al. Late activation of the 9-oxylipin pathway during arbuscular mycorrhiza formation in tomato and its regulation by jasmonate signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 3545–3558, 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.

LOBO JÚNIOR, M. plant pathogens in Brazil. In: **Biological Invasions Economic and Environmental Costs of Alien Plant, Animal, and Microbe Species**. [s.l.: s.n.]. p. 69–88.

LOPES, F. A. C. et al. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal biology**, v. 116, n. 7, p. 815–24, 2012.

LORITO, M. et al. Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 21, p. 6382–6385, 1996.

LORITO, M. et al. Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. **Annual review of phytopathology**, v. 48, p. 395–417, 2010.

MACH, R.; SCHINDLER, M.; KUBICEK, C. Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. **Current genetics**, v. 9414, p. 567–570, 1994.

MALMIERCA, M. G. et al. Involvement of *Trichoderma* trichothecenes in the biocontrol activity and induction of plant defense-related genes. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 14, p. 4856–68, 2012.

MALMIERCA, M. G. et al. Relevance of trichothecenes in fungal physiology: disruption of *tri5* in *Trichoderma arundinaceum*. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 53, p. 22–33,

2013.

MALMIERCA, M. G. et al. Production of trichodiene by *Trichoderma harzianum* alters the perception of this biocontrol strain by plants and antagonized fungi. **Environmental Microbiology**, 2014.

MARCHLER, G. et al. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. **The EMBO Journal**, v. 12, n. 5, p. 1997–2003, 1993.

MARRA, R. et al. Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. **Current Genetics**, v. 50, p. 307–321, 2006.

MARTIN, F. et al. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. **Nature**, v. 452, p. 88–92, 2008.

MARTÍNEZ-MEDINA, A. et al. *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices* modify the hormone disruption induced by *Fusarium oxysporum* infection in melon plants. **Phytopathology**, v. 100, p. 682–688, 2010.

MARTÍNEZ-MEDINA, A. et al. The interaction with arbuscular mycorrhizal fungi or *Trichoderma harzianum* alters the shoot hormonal profile in melon plants. **Phytochemistry**, v. 72, p. 223–229, 2011.

MASSAROLI, M. et al. A shared biosynthetic pathway for botcinins and botrylactones revealed through gene deletions. **Chembiochem : a European journal of chemical biology**, v. 14, n. 1, p. 132–6, 2013.

MATHYS, J. et al. Genome-Wide Characterization of ISR Induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma hamatum* T382 Against *Botrytis cinerea* Infection. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, p. 1–25, 2012.

MAUCH, F.; STAEHELIN, A. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. **Plant Cell**, v. 1, p. 447–457, 1989.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**, 2000.

METCALF, D. A.; WILSON, C. R. The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. **Plant Pathology**, v. 50, p. 249–257,

2001.

MINEHART, P. L.; MAGASANIK, B. Sequence and expression of GLN3, a positive nitrogen regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. **Molecular and cellular biology**, v. 11, p. 6216–6228, 1991.

Ministerio da Agricultura e Planejamento. Plano Agrícola e Pecuário (PAP) 2014/15. 2014.

MONTEIRO, V. N. et al. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. **Current microbiology**, v. 61, n. 4, p. 298–305, out. 2010.

MONTEIRO, V. N.; ULHOA, C. J. Biochemical characterization of a beta-1,3-glucanase from *Trichoderma koningii* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*. **Current microbiology**, v. 52, n. 2, p. 92–6, fev. 2006.

MORÁN-DIEZ, E. et al. Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* after 24h incubation with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 6, p. 614–620, 2012.

NASEBY, D. C.; PASCUAL, J. A; LYNCH, J. M. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* polulations, soil microbial communities and soil enzyme activities. **Journal of applied microbiology**, v. 88, n. Nannipieri 1994, p. 161–169, 2000.

NELSON, B. Biology of Sclerotinia. **Plant Pathology**, p. <http://www.ndsunokak.edu/plantpath/sclero.htm>. 1 –, 1998.

NIMCHUK, Z. et al. Recognition and response in the plant immune system. **Annual review of genetics**, v. 37, p. 579–609, 2003.

NUSSBAUMER, P.; PETRANYI, G.; STÜTZ, A. Synthesis and structure-activity relationships of benzo[b]thienylallylamine antimycotics. **Journal of medicinal chemistry**, v. 34, p. 65–73, 1991.

OARD, S.; RUSH, M. C.; OARD, J. H. Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 1, p. 169–180, 2004.

OMANN, M. R. et al. The seven-transmembrane receptor Gpr1 governs processes relevant for the antagonistic interaction of *Trichoderma atroviride* with its host. **Microbiology**

(Reading, England), v. 158, n. Pt 1, p. 107–18, jan. 2012.

OOSTENDORP, M. et al. Induced disease resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 1, p. 19–28, 2001.

OSIEWACZ, H. D. **Molecular and Biology Fungal Development**. [s.l: s.n.].

PALMIERI, M. C. et al. Proteomic analysis of grapevine resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 reveals specific defence pathways activated against downy mildew. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 6237–6251, 2012.

PAZZAGLI, L. et al. Purification, Characterization, and Amino Acid Sequence of Cerato-platanin, a New Phytotoxic Protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 35, p. 24959–24964, 27. 1999.

PAZZAGLI, L. et al. *Biochimica et Biophysica Acta* Characterization of ordered aggregates of cerato-platanin and their involvement in fungus – host interactions. **BBA - General Subjects**, v. 1790, n. 10, p. 1334–1344, 2009.

PAZZAGLI, L. et al. Cerato-platanins: Elicitors and effectors. **Plant Science**, v. 228, p. 79–87, nov. 2014.

PENTTILÄ, M. et al. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Gene**, v. 61, p. 155–164, 1987.

PEREIRA, J. L. et al. Analysis of *Phaseolus vulgaris* response to its association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the presence or absence of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

PEREIRA MENEZES et al. The pathogenesis-related protein PR-4b from *Theobroma cacao* presents RNase activity, Ca(2+) and Mg(2+) dependent-DNase activity and antifungal action on *Moniliophthora perniciosa*. **BMC plant biology**, v. 14, p. 161, 2014.

PFAFFL, M. W. Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 36, 2002.

PIETERSE, C. M. et al. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. **The Plant cell**, v. 8, n. August, p. 1225–1237, 1996.

PIETERSE, C. M. J. et al. Networking by small-molecule hormones in plant immunity.

Nature chemical biology, v. 5, n. 5, p. 308–316, 2009.

PINEDO, C. et al. Sesquiterpene synthase from the botrydial biosynthetic gene cluster of the phytopathogen *Botrytis cinerea*. **ACS Chemical Biology**, v. 3, p. 791–801, 2008.

PIRES, C. S. S.; FONTES, E. M. G.; SUJII, E. R. **Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas: O algodão como estudo de caso**, 2003.

POLETTI, I. et al. 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 Taquari, RS. **Ciência Florestal, Santa Maria**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2006.

POZO, M. J. et al. Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, v. 180, p. 511–523, 2008.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 9, p. 400–407, 2003.

PUNTA, M. et al. The Pfam protein families database. **Nucleic acids research**, v. 38, n. November 2011, p. D211–D222, 2010.

PURDY, L. H. : History, Diseases and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution, and Impact. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 875, 1979.

RAVAGNANI, A et al. Subtle hydrophobic interactions between the seventh residue of the zinc finger loop and the first base of an HGATAR sequence determine promoter-specific recognition by the *Aspergillus nidulans* GATA factor AreA. **The EMBO journal**, v. 16, n. 13, p. 3974–86, 1997.

REINO, J. L. et al. Virulence-Toxin Production Relationship in Isolates of the Plant Pathogenic Fungus *Botrytis cinerea*. **Journal of Phytopathology**, v. 152, n. 10, p. 563–566, 2004.

REITHNER, B. et al. The G protein α subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 9, p. 749–760, 2005.

ROSADO, I. V et al. QID74 Cell wall protein of *Trichoderma harzianum* is involved in cell protection and adherence to hydrophobic surfaces. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 44, n. 10, p. 950–64, 2007.

- RUBIO, M. B. et al. Comparative study of *Trichoderma* gene expression in interactions with tomato plants using highdensity oligonucleotide microarrays. **Microbiology**, v. 158, p. 119–128, 2012.
- RYDER, N. S. Squalene epoxidase as a target for the allylamines. **Biochemical Society transactions**, v. 19, n. 3, p. 774–777, 1991.
- SAEED, A. I. et al. TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. **BioTechniques**, v. 34, p. 374–378, 2003.
- SALAS-MARINA, M. A. et al. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, p. 15–26, 2011.
- SAMBROOK, J.; FRISCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. [s.l: s.n.].
- SAMUELS, G. J. et al. **Trichoderma Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA**.
- SANTOS, R. F. Análise crítica da interpretação neoclássica do processo de modernização da agricultura brasileira. In: **Presença de vieses de mudança técnica da agricultura brasileira**. [s.l: s.n.], p. 39–78.
- SCALA, A. et al. Cerato-platanin, an early-produced protein by *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*, elicits phytoalexin synthesis in host and non-host plants. **Journal of Plant Pathology**, v. 86, p. 27–33, 2004.
- SCHOUTEN, A. et al. Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. **Mol. Plant Pathol.**, v. 3, p. 227–238, 2002.
- SEIDL, V. et al. Epl1 , the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose , is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. v. 273, p. 4346–4359, 2006.
- SEIDL, V. et al. Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. **BMC genomics**, v. 10, p. 567, 2009.
- SEIDL, V.; DRUZHININA, I. S.; KUBICEK, C. P. A screening system for carbon sources enhancing β -N-acetylglucosaminidase formation in *Hypocrea atroviridis* (*Trichoderma atroviride*). **Microbiology**, v. 152, n. 7, p. 2003–2012, 2006.

SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURI, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual review of phytopathology**, v. 48, p. 21–43, 2010.

SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of Jasmonic Acid/Ethylene Signaling Pathway in the Systemic Resistance Induced in Cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. **Phytopathology**, v. 95, p. 76–84, 2005.

SILVA, R. N. et al. Regulation of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase produced by *Trichoderma harzianum*: evidence that cAMP controls its expression. **Research in microbiology**, v. 155, n. 8, p. 667–71, out. 2004.

SOARES, W. L.; PORTO, M. F. **Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura** Programa de Pósgraduação em Saúde Pública e Meio Ambiente Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, 2010. Disponível em: <http://bvssp.ict.fiocruz.br/pdf/25520_tese_wagner_25_03.pdf>

SOPHIANOPOULOU, V. et al. Operator derepressed mutations in the proline utilisation gene cluster of *Aspergillus nidulans*. **Molecular and General Genetics**, v. 236, p. 209–213, 1993.

STEADMAN, J. R. of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, v. 69, n. 08, p. 904 – 907, 1979.

STEIGER, M. G.; MACH, R. L.; MACH-AIGNER, A. R. An accurate normalization strategy for RT-qPCR in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Journal of Biotechnology**, v. 145, n. 1, p. 30–37, 2010.

STEINDORFF, A. S. et al. *Trichoderma harzianum* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in mycoparasitism against *Fusarium solani*. **Biological Control**, v. 61, n. 2, p. 134–140, 2012.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual review of phytopathology**, v. 35, p. 235–270, 1997.

TANI, H. et al. Botcinins E and F and botcinolide from *Botrytis cinerea* and structural revision of botcinolides. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 4, p. 722–725, 2006.

TEN HAVE, A. et al. An aspartic proteinase gene family in the filamentous fungus *Botrytis cinerea* contains members with novel features. **Microbiology**, v. 150, n. 2004, p. 2475–2489,

2004.

TENBERGE, K. B. Morphology and cellular organization in *Botrytis* interactions with plants. In: ***Botrytis: Biology, Pathology and Control***. [s.l: s.n.]. p. 67–84.

THRANE, C.; TRONSMO, A.; JENSEN, D. F. Endo-1,3- β -glucanase and cellulase from *Trichoderma harzianum* purification and partial characterization, induction of and biological activity against plant pathogenic *Pythium* spp. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, n. 4, p. 331–334, 1997.

TIJERINO, A. et al. Overexpression of the trichodiene synthase gene *tri5* increases trichodermin production and antimicrobial activity in *Trichoderma brevicompactum*. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 48, n. 3, p. 285–96, 2011.

TILBURN, J. et al. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline- expressed genes by ambient pH. **The EMBO Journal**, v. 14, n. 4, p. 779–790, 1995.

TRAPPE, J. M. A.B. Frank and mycorrhizae: The challenge to evolutionary and ecologic theory. **Mycorrhiza**, v. 15, p. 277–281, 2005.

TUCCI, M. et al. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, p. 341–354, 2011.

VAN DER ENT, S.; VAN WEES, S. C. M.; PIETERSE, C. M. J. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. **Phytochemistry**, v. 70, n. 13-14, p. 1581–1588, 2009.

VAN KAN, J. A L. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 5, p. 247–253, 2006.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A; PIETERSE, C. M. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual review of phytopathology**, v. 36, p. 453–483, 1998.

VAN WEES, S. C.; VAN DER ENT, S.; PIETERSE, C. M. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 443–448, 2008.

VARGAS, W. A et al. Dimerization controls the activity of fungal elicitors that trigger systemic resistance in plants. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 28, p. 19804–15, 11 jul. 2008.

VERBERNE, M. C. et al. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes

enhances pathogen resistance. **Nature biotechnology**, v. 18, p. 779–783, 2000.

VINALE, F. et al. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 72, p. 80–86, 2008.

WEIDLING, R. Studies on lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. **Phytopathology.**, v. 24, 1934.

WESSELS, J. Developmental regulation of fungal cell wall formation. **Annual review of phytopathology**, v. 32, n. 145, p. 413 – 437, 1994.

WILLETTS, H. J.; WONG, J. A. L.; KIRST, J. D. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. **The Botanical Review**, v. 46, n. 2, p. 101 – 165, 1980.

WOO, S. L. et al. The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma* spp., Phytopathogenic Fungi, and Plants. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 181–185, 2006.

YANG, H. et al. Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. **Mycological Research**, v. 113, n. 9, p. 924–932, 2009.

YANG, Y.; SHAH, J.; KLESSIG, D. F. **Signal perception and transduction in plant defense responses** **Genes and Development**, 1997.

YEDIDIA, I. et al. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 863–873, 2000.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; CHET, I. Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1061–1070, 1999.

YEDIDIA, I.; SHORESH, M. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 12, p. 7343–7353, 2003.

YU, H. et al. The function of snodprot in the cerato-platanin family from *Dactylellina cionopaga* in nematophagous fungi. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 76, n. 10, p. 1835–42, jan. 2012.

ZHANG, H. et al. Bicarbonate-dependent Peroxidase Activity of Human Cu,Zn-Superoxide

Dismutase Induces Covalent Aggregation of Protein: Intermediacy of Tryptophan-Derived Oxidation Products. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 26, p. 24078–24089, 2003.

ANEXOS

1 - Artigos Publicados no Período

1.1 Artigos Originais:

1.1.1 Gomes, E. V.; Costa, M.; Azevedo, R. R.; de Paula R. G.; Silva, F.; Noronha E.; Ulhoa C. J.; Monteiro V.; Cardoza, R. E.; Gutierrez S. M. Cerato-platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* mediates mycoparasitism against *Sclerotinia sclerotiorum*, protects cell wall, and improves plant resistance. Scientific Reports Nature. 2015.

1.1.2 Malmierca, M. G.; Izquierdo, I. B.; McCormick, S. P.; Cardoza, R. E.; Alexander, N. J.; Moraga, J.; GOMES, E. V.; Proctor, R. H.; Collado, I. G.; Monte, E.; Gutierrez, S. Botrydial and botcinins produced by *Botrytis cinerea* regulate expression of *Trichoderma arundinaceum* genes involved in trichothecene biosynthesis. Molecular Plant Pathology. 2015.

1.2 Artigos de Revisão:

1.2.1 Susanne Zeilinger; Vijai Kumar Gupta; Tanya Elizabeth Susan Dahms; Roberto Nascimento Silva; Harikesh Bahadur Singh; Ram Sanmukh Upadhyay; Eriston Vieira Gomes; Clement Kin-Ming Tsui; Chandra Nayak. Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. FEMS Microbiology Reviews. 2015.

2 Artigos Submetidos

2.1 Sarma, B. K.; Gomes, E. V.; Selin C.; Singh H. B.; Dilantha F.; Silva R. N.; Gupta V. K. Gupta. Enhancing plant disease resistance without R genes: emerging trends. Biological Reviews. 2015.

3 Participações em Cursos, Anais e Congressos

3.1 20º SIICUSP – Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP.

Tipo de Participação: Avaliador de Trabalhos Acadêmicos.

Período da Participação: Novembro de 2012.

3.2 Curso: Novas Ferramentas para Manipulação Genética de Fungos de Interesse

Biотecnológico. Programa de Pós Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Imunologia.

Tipo de Participação: Ouvinte.

Local: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP.

Período: 27 de Maio a 14 de Junho de 2013.

Carga Horária: 112 Horas.

3.3 XII Curso de Inverno de Bioquímica e Biologia Molecular – Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Tipo de Participação: Organização do Evento e Apresentação de Palestra.

Título da Apresentação: Estudos Bioquímicos e Moleculares com o Gênero *Trichoderma*: Controle Biológico e Produção de Celulases.

Data da Apresentação: 16 de Julho de 2013.

Período do Evento: De 15 a 26 de Julho de 2013.

3.4 Curso: Lecture Course “Brasil-Coréia do Sul: Fungos Filamentosos como Sistemas Modelo e de Uso em Biotecnologia”. Programa de Pós Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Imunologia.

Tipo de Participação: Ouvinte.

Local: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP – USP.

Período: 27 de Setembro de 2013.

3.5 5th Congress of European Microbiologists (FEMS 2013) – Leipzig, Alemanha.

Período: De 21 a 25 de Julho de 2013.

Tipo de Apresentação: Pôster.

Título da Apresentação: Expression Analysis of Genes Associated With *Trichoderma harzianum* Mycoparasitism Process Against *Sclerotinia sclerotiorum*.

3.6 Estágio Supervisionado Em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino – PAE.

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP – USP. Departamento de Biologia Celular e Molecular.

Período: 01 de Fevereiro a 30 de Junho de 2014.

3.7 Global Biotechnology Congress 2014. Boston, MA, USA.

Período: De 16 a 19 de Junho de 2014.

Tipo de Apresentação: Pôster

Título da Apresentação: Analysis of epl-1 Gene Function in Expression of Genes Associated with *Trichoderma harzianum* Mycoparasitism Process Against *Sclerotinia sclerotiorum*.

3.8 Bolsa de Estágio em Pesquisa no Exterior da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo – BEPE FAPESP.

Instituição: Escola Superior e Técnica de Engenharia Agrária da Universidade de León – Campus Ponferrada – Espanha.

Período: De 28 de Julho de 2014 a 28 de Janeiro de 2015.

3.9 XII Curso de Inverno de Bioquímica e Biologia Molecular – Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Tipo de Participação: Organização do Evento e Apresentação de Palestra.

Título da Apresentação: Estudos Bioquímicos e Moleculares com o Gênero *Trichoderma*: Controle Biológico e Produção de Celulases.

Data da Apresentação: 15 de Julho de 2015.

Período do Evento: De 13 a 24 de Julho de 2015.