UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

ALINNE COSTA SILVA

Análise global da regulação transcricional do gene de cerato-platanina *epl1* em *Trichoderma reesei*

RIBEIRÃO PRETO – SP

2021

ALINNE COSTA SILVA

Análise global da regulação transcricional do gene de cerato-platanina *epl1* em *Trichoderma reesei*

Tese apresentada à 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 – SP

2021

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Alinne Costa

Análise global da regulação transcricional do gene de cerato-platanina *epl1* em *Trichoderma reesei*

102f.:il.; 30cm.

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Roberto do Nascimento Silva

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alinne Costa Silva

Análise global da regulação transcricional do gene de cerato-platanina *epl1* em *Trichoderma reesei*

Tese apresentada à 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

Aprovado em: ____/ ____/ ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico esta tese aos meus pais

Geraldo e Creuza, e ao meu irmão André,

pelo incentivo, apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Dr. Roberto do Nascimento Silva, pela oportunidade concedida e pela confiança depositada na realização desse trabalho. Agradeço pelo conhecimento compartilhado, e por ter me proporcionado um amadurecimento profissional ao longo desses anos.

Aos meus pais, Geraldo e Creuza, por não medirem esforços para que eu alcance meus objetivos e seja capaz de realizar meus sonhos.

Ao meu irmão André, por todos os momentos especiais, conversas, brincadeiras e por sempre conseguir tirar um sorriso do meu rosto.

À minha tia Carminha, por sempre estar presente trazendo alegria para nossa família.

Aos amigos e companheiros de bancada Amanda, Cláudia, Hermano, Iasmin, Karol, Letícia, Luiz, Marcus e Vanessa por estarem sempre dispostos a ajudar e por proporcionarem um excelente ambiente de trabalho. Também gostaria de agradecer ao Renato, Douglas, Welligton, Liliane, Mariana Costa e Mariana Zerbini, que já não estão no laboratório, mas que seguem fazendo parte da família LBM.

Às funcionárias Zu, Silvia, Vera, Cacilda e Silvinha, pelo suporte, colaboração e ajuda prestada ao longo desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Gustavo Goldman e à Dra. Patrícia Alves, pela colaboração no experimento de Bioanalyzer.

Á Letícia Oshiquiri pela grande ajuda nas análises dos dados de RANseq.

A todos os docentes, técnicos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia por estarem sempre disponíveis.

À secretaria do Departamento de Bioquímica e Imunologia, em especial, à Ivone, pela disponibilidade, eficiência e prontidão, sempre disposta a ajudar.

A todos os amigos do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da FMRP-USP, especialmente ao Diego, Matheus e Jhonatan, pela harmoniosa convivência durante esses anos, cheia de risos, “prosa ruim” e cafés.

Ás amigas Mariana e Vanessa, pela amizade construída ao longo do doutorado, apoio em momentos difíceis e “rolezinhos” para desestressar.

Aos amigos Leandro, Bianca e Franciele, por facilitarem minha adaptação em Ribeirão Preto, pelos momentos de alegria que passamos juntos e pelo carinho.

Aos amigos de longa data Alan, Amanda, Carol, Fernanda, Luana e Bruno pela amizade verdadeira e pelas boas risadas que distância nenhuma é capaz de ofuscar.

A CAPES, FAPESP e CNPq pelos auxílios financeiros concedidos ao laboratório.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – Código de Financiamento 001.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Resumo

Silva, A.C. **Análise global da regulação transcricional do gene de cerato-platanina *epl1* em *Trichoderma reesei***. 2021. 102 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Saulo, Ribeirão Preto, 2021.

Trichoderma reesei é um dos fungos mais bem estudados e um dos principais produtores de celulases, enzimas que atuam na degradação de biomassa lignocelulósica. Apesar do amplo conhecimento sobre o sistema celulolítico desse fungo, pouco se sabe sobre a forma como ele reconhece o meio extracelular. Nesse contexto, a família de proteínas cerato-plataninas (CPs) tem ganhado destaque por sua capacidade de se ligar e afrouxar resíduos celulósicos. CPs são encontradas exclusivamente em fungos e apresentam similaridade estrutural com expansinas vegetais. Este trabalho tem como objetivo contribuir para o entendimento do papel de EPL1 de *T. reesei.* Para isso, foi feita a construção do mutante nocaute (Δ*epl1)* e os experimentos foram realizados em comparação com o parental QM6a. A deleção de *epl1* não alterou as atividades celulolíticas do fungo quando cultivado em celulose em estado submerso (FS), no entanto, quando cultivado em estado semi-sólido (FES) com bagaço de cana de açúcar, houve diminuição da atividade β-glicosidase. Para a análise do transcriptoma global de Δ*epl1*, foi realizado o sequenciamento de nova geração das linhagens mutante e parental cultivadas em celulose 1% por 72 horas. Dos 9.143 genes anotados no genoma de *T. reesei*, 760 foram considerados diferencialmente expressos, sendo 260 exclusivos para QM6a, 214 genes exclusivos em Δ*epl1* e 286 compartilhado entre eles. A maioria dos genes que estavam *up* regulados no mutante pertenciam a categorias do Gene Ontology descritas como transporte de ácido orgânico, atividade oxidorredutase, transporte, ligação de polissacarídeo e ligação de carboidratos. As Enzimas ativas de Carboidratos (CAZymes) envolvidas no remodelamento da parede do fungo mostrou-se *up reguladas* na linhagem Δ*epl1*. Os resultados mostram o papel de EPL1 no reconhecimento e fisiologia do fungo durante a produção de celulases. Espera-se com esses resultados contribuir para uma melhor compreensão do papel desempenhando por EPL1 em *T. reesei*.

Palavras-chave: *Trichoderma reesei*. Cerato-platanina. *epl1*. RNA-seq

Abstract

Silva, A.C. **Global analysis of transcriptional regulation of the cerato-platanin gene *epl1* in *Trichoderma reesei.*** 2021. 102 p. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Pauto, Ribeirão Preto, 2021.

Trichoderma reesei is one of the most studied fungi and one of the main producers of cellulases, enzymes that hydrolyse lignocellulosic biomass. Despite the extensive knowledge about its cellulolytic set of enzymes, little is known about how *T. reesei* recognizes the extracellular environment. In this context, the family of cerato-platanin proteins (CPs) found exclusively in fungi and showing structural similarity to plant expansins - has been gaining prominence for possessing binding and loosening on the cellulose structure. In this work, we used transcriptomic analysis to describe the role of EPL1, a cerato-platanin from *T. reesei,* on cellulose growth. For this, we constructed the *T. reesei* Δ*epl1* mutant, which didn't show difference in the enzymatic activity when grown on cellulose, however, when grown in FES media supplemented with sugarcane bagasse, it showed a decrease in β-glycosidase activity when compared with the parental QM6a strain. We performed the global transcriptome analysis – through next generation sequencing - of the Δ*epl1* mutant and the parental QM6a strains after grown in 1% cellulose for 72 hours. From the 9,143 genes annotated in the *T. reesei* genome, 760 were found to be differentially expressed between Δ*epl1* and QM6a; being 260 genes unique to QM6a, 214 unique to Δ*epl1*, and 286 commonly shared between them. Most of the genes that were up regulated in the mutant belonged to Gene Ontology categories described as organic acid transport, oxidoreductase activity, transport, polysaccharide binding, and carbohydrate binding. Active Carbohydrate Enzymes (CAZymes) involved in fungal wall remodeling were shown to be upregulated in the *epl1* strain. The results show the role of EPL1 in the recognition and physiology of the fungus during cellulase production. These results are expected to contribute to a better understanding of the role played by EPL1 in T. reesei.

Keywords: *Trichoderma reesei*. Cerato-platanin. *epl1*. RNA-seq

Lista de figuras

Fig. 1: Representação esquemática da estrutura lignocelulósica..... 21

Fig. 2: Modelo esquemático da degradação enzimática da celulose..... 24

Fig. 3: Representação esquemática do vetor pRS426 utilizado para a construção do cassete de deleção..... 33

Fig. 4: Representação esquemática do mecanismo de recombinação homóloga em leveduras do cassete de deleção de *epl1*..... 33

Fig. 5: Fragmentos de DNA utilizados para a construção do cassete de deleção para o gene *epl1*..... 43

Fig. 6: Desenho esquemático do vetor pRS426 contendo o cassete de deleção para o gene *epl1*..... 44

Fig. 7: Análise da construção do cassete de deleção para o gene *epl1*..... 45

Fig. 8: PCR de confirmação da obtenção do mutante *T. reesei* Δ*epl1*..... 46

Fig. 9: PCR do direcionamento do cassete de deleção no genoma de *T.reesei*. 47

Fig. 10: PCR em tempo real do gene *epl1*..... 48

Fig. 11: Teste de hidrofobicidade entre parental QM6a e mutante Δ*epl1*..... 49

Fig. 12: Expressão gênica de celulases no controle QM6a e mutante Δ*epl1* crescido em celulose por 24, 48 e 72 horas..... 50

Fig. 13: Atividades enzimáticas e análise do secretoma das linhagens QM6a e Δ*epl1*..... 51

Fig. 14: Dosagem enzimática do sobrenadante do cultivo em bagaço de cana de açúcar em meio semi-sólido das linhagens QM6a (azul) e Δ*epl1*(vermelho)..... 52

Fig. 15 Expressão do gene *epl1* (ID 123955) na linhagem parental QM6a e no mutante Δ*epl1* durante o crescimento em celulose..... 53

Fig. 16: Análise de componentes principais (PCA) plot de cada uma das condições analisadas..... 55

Fig. 17: MA plot dos genes de *T. reesei* linhagem QM6a e Δ*epl1* expressos em glicerol e celulose..... 56

Fig. 18: Perfil de expressão gênica da linhagem QM6a e Δ*epl1* durante o crescimento em celulose por 72 horas..... 57
Fig 19: Processos biológicos envolvidos no cultivo de *T. reesei* em celulose. 58
Fig. 20: Funções moleculares envolvidas no cultivo de *T. reesei* em celulose. 59
Fig. 21: Compartimentos celulares envolvidos no cultivo de *T. reesei* em celulose..... 60
Fig. 22: Reconstrução de vias metabólicas simultâneas em QM6a e Δ*epl1*..... 61
Fig. 23: Reconstrução de vias metabólicas exclusivas de cada linhagem..... 62
Fig. 24: Vias metabólicas compartilhadas entre QM6a e Δ*epl1*..... 100
Fig. 25: Vias metabólicas exclusivas em QM6a..... 101
Fig. 26: Vias metabólicas exclusivas em Δ*epl1*..... 102

Lista de tabelas

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos fragmentos necessários para a produção do cassete de deleção do gene *epl1*..... 35

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados em experimentos de Real Time PCR..... 40

Tabela 3: Número de *reads* obtidas pelo RNA-Seq e porcentagem de mapeamento das bibliotecas no genoma de *T. reesei*..... 54

Tabela 4: Descrição dos 10 genes mais *up* e *down* regulados em Δ*epl1* na condição celulose. O *fold change* está em log_2 (p-valor ajustado < 0,05)..... 63

Tabela 5: Proteínas do CAZy *up* reguladas no mutante Δ*epl1* em relação ao QM6a em celulose. *O fold change* está em log2 (p-valor <0,05)..... 64

Tabela 6: Fatores de transcrição *up* reguladas no mutante Δ*epl1* em relação ao QM6a em celulose. *O fold change* está em log2 (p-valor < 0,05)..... 65

Tabela 7: Proteínas do envolvidas nos processos de sinalização celular *up* reguladas no mutante Δ*epl1* em relação ao QM6a em celulose. *O fold change* está em log2(p-valor<0,05)..... 65

Tabela 8: Proteínas envolvidas no transporte *up* reguladas no mutante Δ*epl1* em relação ao QM6a em celulose. O *fold change* está em log2 (p-valor <0,05)..... 67

Tabela 9: Categorias do GO com seus respectivos genes *up* e *down* regulados exclusivamente em QM6a e Δ*epl1* na condição celulose (p-valor <0,05)..... 93

Tabela 10: Categorias do GO com seus respectivos genes *up* e *down* regulados simultaneamente em QM6a e Δ*epl1* na condição celulose (p-valor <0,05)..... 98

Lista de abreviaturas

cAMP – AMP cíclico

ATP – Adenosina Trifosfato

BGL – β-Glicosidase

CAZy – do inglês, *Carbohydrate-Active Enzymes*

CBH – Celobiohidrolase

CPs– Proteínas cerato - plataninas

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

cDNA – DNA complementar

EG – Endoglicanase

EPL1 – do inglês, *eliciting plant response-like 1*

GH – Glicosil Hidrolase

GO – do inglês, *Gene Ontology*

GPCRs – receptores acoplados à proteína G

IP3 – Inositol-1,4,5-trifosfato

JGI – do inglês, *Joint Genome Institute*

LPMOs – do inglês, *Polysaccharide lytic monooxygenases*

MEX – do inglês, *Malt Extract*

MFS – do inglês, *Major Facilitator Superfamily*

ORF – do inglês, *Open reading frame*

PCA – do inglês, *Principal Component Analysis*

PCR – do inglês, *Polymerase Chain Reaction*

Sumário

1-Introdução..... 178

2-Levantamento teórico..... 20

2.1- Material Lignocelulósico..... 211

2.2- Trichoderma reesei..... 222

2.3- Sistema celulolítico de *T. reesei*..... 233

2.4 - Proteínas da família das Cerato - plataninas (CPs)..... 255

3-Objetivos..... 288

4 - Material e métodos..... 30

4. 1- Meios de cultivo utilizados..... 311

4. 1. 1- Meio MEX..... 311

4. 1. 2- Meio Mandels-Andreotti (1L)..... 311

4.2- Organismos..... 322

4.2.1- Trichoderma reesei..... 322

4.2.2- Saccharomyces cerevisiae..... 322

4.3- Deleção do gene *epl1* de *T. reesei*..... 322

4.3.1– Extração de DNA genômico de *T. reesei.*..... 344

4.3.2– Amplificação do gene *pyr4* e dos fragmentos 5’ e 3’ UTR do gene *epl1*. . 344

4.3.3 – Preparação de leveduras competentes..... 35

4.3.4 – Transformação de leveduras..... 355

4.3.5 – Extração de DNA de *S. cerevisiae*..... 366

4.3.6- Transformação do fungo *T. reesei*..... 36

4.4- Crescimento em celulose..... 37

4.5- Fermentação em meio semi-sólido (FES) em bagaço de cana de açúcar..... 388

4.6- SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio).. 388

4.7- Atividade enzimática..... 38

4.7.1- Atividade β-glicosidase 38
4.7.2- Atividade de celobiohidrolase 39
4.8- Extração de RNA Total 39
4.9- PCR quantitativo em tempo real (Real Time PCR) 39
4.10- Sequenciamento (RNA-seq) 40
4.10.1- Análise dos dados de RNA-seq 41
4.11 - Análise estatística 41
5-Resultados 42
5.1 – Deleção do gene *epl1* em *T. reesei* 43
5.1.1- Amplificação do gene *pyr4* e dos fragmentos 5' e 3' UTR do gene *epl1*... 434
5.1.2- Produção do cassete de deleção para o gene *epl1* em *S. cerevisiae* 445
5.1.3- Construção da linhagem mutante de *T. reesei* Δ*epl1* 455
5.2- Análise da expressão gênita e atividade enzimática de celulases 49
5.3- Análises de RNA-seq 533
5.3.1- Análise da deleção do gene *epl1* na linhagem Δ*epl1*. 533
5.3.2- Análises dos reads e dos genes diferencialmente expressos 583
5.3.3- Enriquecimento dos transcritos up e down regulados baseado em *Gene Ontology* 58
5.3.4- Reconstrução vias metabólicas 621
5.3.5- Principais genes up e down regulados no mutante Δ*epl1* na condição celulose. 63
5.3.6– CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes) 643
5.3.7- Fatores de transcrição 654
5.3.8- Sinalização celular 67
5.3.9- Transportadores ..... **Erro! Indicador não definido.**7
6- Discussão 699
7-Conclusão 766

8-Referências bibliográficas 788

9 - Anexos..... 922

9.1 - Anexo 1..... 933

9.2- Anexo 2..... 1000

1-Introdução

A alta demanda por energia é atendida, em sua grande maioria, por fontes não renováveis, sendo cerca de 80% gerada por combustíveis fósseis. O aumento da emissão dos gases causadores do efeito estufa, juntamente com a valorização do preço do petróleo, levou a uma busca por novos recursos sustentáveis. Em 2018, cerca de 14% de produção energética mundial foi gerada por fontes renováveis e, o biocombustível, tem ganhado um grande destaque nos últimos anos (Senatore et al., 2021).

O Programa Nacional de Biocombustíveis (Proálcool) foi implementado no Brasil na década de 70 e, atualmente, o etanol gerado a partir da cana de açúcar tem um alto rendimento (1,5 bilhões de litros/ano) e baixo custo de produção (Machado et al., 2016). No entanto, com a estimativa de crescimento de 48% da demanda energética até o ano de 2040, os esforços científicos e industriais visam o desenvolvimento de novas tecnologias utilizando a biomassa lignocelulósica para produção de energia (Peña-Castro et al., 2017; Sagastume Gutiérrez et al., 2020).

A biomassa lignocelulósica é qualquer matéria orgânica produzida a partir de uma fonte renovável, como resíduos agrícolas, que pode ser utilizada como fonte para produção de biocombustíveis, bioenergia e biomateriais. Devido a sua disponibilidade e abundância no meio ambiente ela é um recurso promissor para a produção de etanol de segunda geração, também conhecido como bioetanol (Maity, 2015; Phitsuwan et al., 2013; Rambo et al., 2015).

Para tornar a biomassa acessível para produção de etanol de segunda geração é necessário realizar uma etapa de hidrólise enzimática, deixando os açúcares disponíveis para os micro-organismos fermentadores (Schlittler et al., 2012). Para isso, pode ser utilizado um conjunto de enzimas denominadas celulases e hemicelulases, responsáveis pela degradação dos componentes da biomassa celulose e hemicelulose, respectivamente. No entanto, a etapa de hidrólise enzimática ainda é um fator limitante no processo devido seu alto custo, tornando a produção de bioetanol inviável (Philippini et al., 2020; Pino et al., 2018).

Com o objetivo de minimizar o alto custo da hidrólise, os micro-organismos celulolíticos se tornaram uma das fontes mais acessíveis dessas enzimas. Dentre eles, o fungo *Trichoderme reesei* é um dos mais utilizados, com aproximadamente 80 anos de estudos e aplicações industriais. Seu eficiente sistema celulolíticos é capaz de realizar a completa degradação da celulose a glicose, chegando a produzir até 100g/L de celulases (Gupta et al., 2016; Havukainen et al., 2020; Zheng et al., 2020; Zou et al., 2021).

O sequenciamento do genoma de *T. reesei* permitiu a compreensão dos seus mecanismos de regulação e ampliou a possibilidade de explorar seu potencial biotecnológico (Martinez et al., 2008). No entanto, apesar do amplo conhecimento sobre o seu sistema celulolítico, pouco se sabe sobre o desenvolvimento e reconhecimento desse fungo no ambiente extracelular (Druzhinina et al., 2016).

Nesse contexto, a família de proteínas cerato-plataninas (CPs) vem ganhando destaque nos últimos anos. Apesar de ainda não terem uma função bem elucidada, acredita-se que essas proteínas desempenham um papel no crescimento e desenvolvimento do fungo e na sua interação com plantas (Baccelli, 2015; Druzhinina et al., 2016).

T. reesei apresenta dois genes para cerato-plataninas, *epl1* e *epl2*, e, análises de dados de RNAseq do nosso grupo de pesquisa demonstraram que *epl1* está mais expresso em celulose. Dessa forma, nesse trabalho foi realizado um estudo mais aprofundado desse gene para uma melhor compreensão do seu papel em *T. reesei*.

2-Levantamento teórico

2.1- Material Lignocelulósico

A biomassa lignocelulósica é a fonte renovável mais abundante do planeta, sendo produzida amplamente em todos os países. Estima-se que o continente sul americano gerou 800 milhões de toneladas de biomassa no ano de 2017. O Brasil é o principal produtor de cana de açúcar e o bagaço gerado após a moagem é destinado a proteção do solo ou queimado para geração de energia (Magalhães et al., 2019).

Como principal constituinte da parece celular das plantas, a biomassa lignocelulósica é formada por celulose (40 a 60%), hemicelulose (20 a 40%,) lignina (10 a 25%) e, em menores quantidades, por pectina. A proporção desses polímeros varia de acordo com o tipo do material (homogênio ou heterogênio), espécie da planta, tipo de tecido e época de cultivo (Han et al., 2019; Toribio-cuaya et al., 2014). A figura 1 representa um esquema da estrutura da lignocelulose.

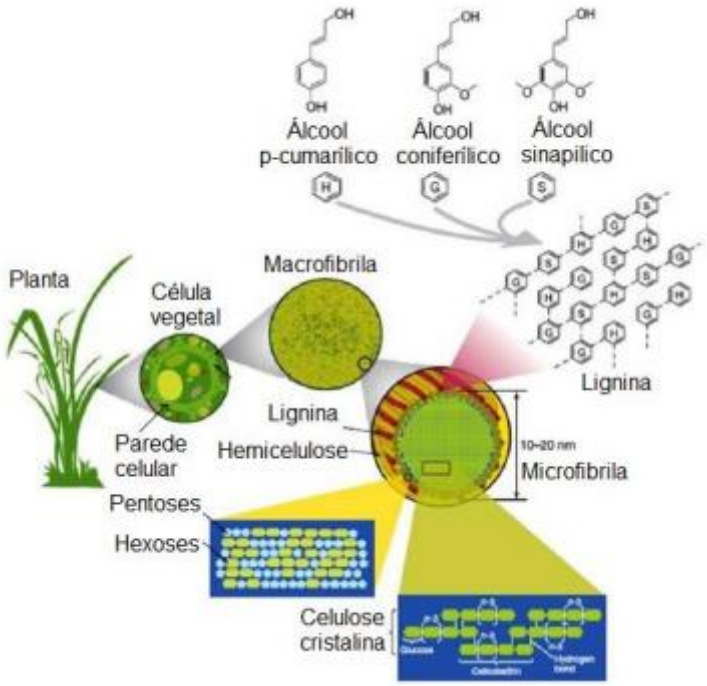

Figura 1: Representação esquemática da estrutura lignocelulósica**.** O principal constituinte é a celulose, um polissacarídeo formado por ligações β (1→4) de unidades repetidas de glicose. O segundo componente mais abundante é a hemicelulose, formada por açucares de 5 e 6 carbonos (por exemplo: arabinose, galactose, glicose, manose e xilose). Ultimo componente é a lignina, constituída de três componentes fenólicos principais, denominados álcool p-cumarílico (H), álcool coniferílico (G) e álcool sinapílico (S). Juntas, essas três estruturas formam as microfibrilas, que estão organizadas em macrofibrilas que garantem a estabilidade estrutural da parede celular vegetal (Adaptado de Rubin, 2008).

A lignocelulolse é um conjunto de biopolímeros, apresentando duas regiões distintas. A primeira é denominada de região cristalina, composta por agregados ordenados de 18 a 24 cadeias de celulose, que servem com suporte para matriz polimérica. Já a região amorfa ou paracristalina é constituída por cadeias de celulose e hemicelulose menos organizadas, e desse modo, mais susceptíveis a infiltração de água. A lignina se estabelece de forma refinada na parede celular, preferencialmente com a hemicelulose através de interações eletrostáticas. Ela é o principal componente não-glicosídico e atua como barreira hidrofóbica e defesa microbiana (Kang et al., 2019; Nixon et al., 2016).

A celulose é formada por até 12.000 resíduos de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1→4). Suas cadeias são mantidas juntas por ligações de hidrogênio intermoleculares, o que aumenta sua rigidez e a torna altamente insolúvel a solventes orgânicos (Anwar et al., 2014). O dissacarídeo celobiose é a menor unidade da celulose que pode ser convertido a glicose. Já a hemicelulose é composta por diferentes monossacarídeos como xilose, galactose, arabinose, manose e glicose. A classe diversa de açucares que compõem a hemicelulose a torna adaptável a diferentes parece celulares e interfere no fortalecimento e hidrofobicidade pelas suas interações com a celulose e lignina. As xilanas são as principais hemicelulose e seu esqueleto principal é composto por unidades de D-xilopiranoses unidas por ligações β (1→4) (Grantham et al., 2017; Nixon et al., 2016).

Um desafio para utilização da biomassa lignocelulósica é o acesso a celulose e hemicelulose, uma vez que as paredes celulares evoluíram para serem resistentes a degradação química, física e microbiana (Petridis et al., 2010; Williams et al., 2016). Desse modo, é necessário realizar o pré-tratamento dessa matéria prima para remoção da lignina e formação de poros que vão facilitar o acesso das enzimas celulolíticas, responsáveis por hidrolisar as porções hidrofóbicas do cristal de celulose (Hu et al., 2008; Liu et al., 2011).

2.2- *Trichoderma reesei*

O gênero *Trichoderma* abrange espécies de fungos filamentosos, mesófilos, que são encontrados em grande variedade no ecossistema, habitando solos agrícolas e florestais, geralmente em madeira em decomposição. Eles apresentam como características morfológicas conídios verdes, conidióforos repetidamente ramificado e rápido crescimento (Plessis et al., 2018; Zin & Badaluddin, 2020) . O gênero *Trichoderma*

apresenta atualmente cerca de 260 espécies, onde aproximadamente 35 possuem importância biotecnológica (Bissett et al., 2015). *T. harzianum*, *T. atroviride* e *T. asperellum* são espécies bem conhecidas por atuarem como agentes de biocontrole, e *T. reesei* é conhecido por sua capacidade de produzir enzimas de interesse industrial (Dhevagi Periasamy, Sudhakarn Mani, 2019; Oszust et al., 2020).

T. reesei é capaz de crescer em diversas fontes de carbono, que gera diferentes sinais químicos e permite a expressão e secreção de enzimas, sendo um dos micro-organismos mais eficientes na produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas (De Paula et al., 2018). Ele foi identificado e isolado na Segunda Guerra Mundial através da deterioração de tecidos de algodão do exército dos Estudos Unidos da América, nas ilhas Salomão (Seiboth *et al.*, 2011; Peterson & Nevalainen, 2012). Através de marcadores filogenéticos, verificou-se que o fungo assexuado *T. reesei* era indistinguível da espécie sexuada *Hypocrea jecorina*, indicando que eles pertencem a mesma espécie. Devido a predominância em publicações e patentes, o nome *T. reesei* permaneceu em uso pela comunidade científica (Seiboth *et al.*, 2011; Schmoll et al., 2016)

Desde seu isolamento, a linhagem parental QM6a de *T. reesei* passou por diversos processos de mutagênese e, atualmente, a cepa QM9414 e Rut30 são grandes produtoras de celulases. As enzimas produzidas por esse fungo são de grande importância econômica, tendo ampla aplicação em indústrias de papel e celulose, têxtil, alimentos para animais e bioetanol (Häkkinen et al., 2012; Schmoll & Schuster, 2010).

2.3- Sistema celulolítico de *T. reesei*

Apesar de possuir alta capacidade de produção enzimática, o sequenciamento do genoma de *T. reesei* demonstrou que ele apresenta um número menor de genes para celulases e hemicelulases quando comparado a outros fungos. Esse fato demonstra o refinamento e eficiência do seu sistema celulolítico na degradação da matéria lignocelulósica. Desse modo, vários estudos visam compreender os mecanismos envolvidos na regulação e secreção dessas enzimas (Martinez et al., 2008; Yan et al., 2021). As enzimas celulolíticas de *T. reesei* são classificadas como endoglicanases (clivam as ligações internas da fibra de celulose), exoglicanases ou celobiohidrolases (CBH) (clivam a região externa da cadeia da celulose) e β-glicosidases (hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose). As celulases estão agrupadas de acordo com suas estruturas na família de glicosídeo hidrolases (GH), depositadas no banco de dados

Carbohidrate-active enzymes (CAZymes). A reanotação do genoma de *T. reesei* identificou 201 genes para GH, e, as principais celulases secretadas são as celobiohidrolases Cel7a/CBHI e Cel6a/CBHII, endoglucanases Cel7b/EGI e Cel5a/EGII e a β-glucosidase Cel3a/BGLI. Esse conjunto de enzimas representa cerca de 90% das proteínas extracelulares. *T. reesei* também possui proteínas acessórias como *Swollenin* e LPMOs que auxiliam na degradação da lignocelulose (De Paula et al., 2018; Gupta et al., 2016; Häkkinen et al., 2012). A Figura 2 demonstra de forma esquemática como essas enzimas atuam na biomassa lignocelulósica.

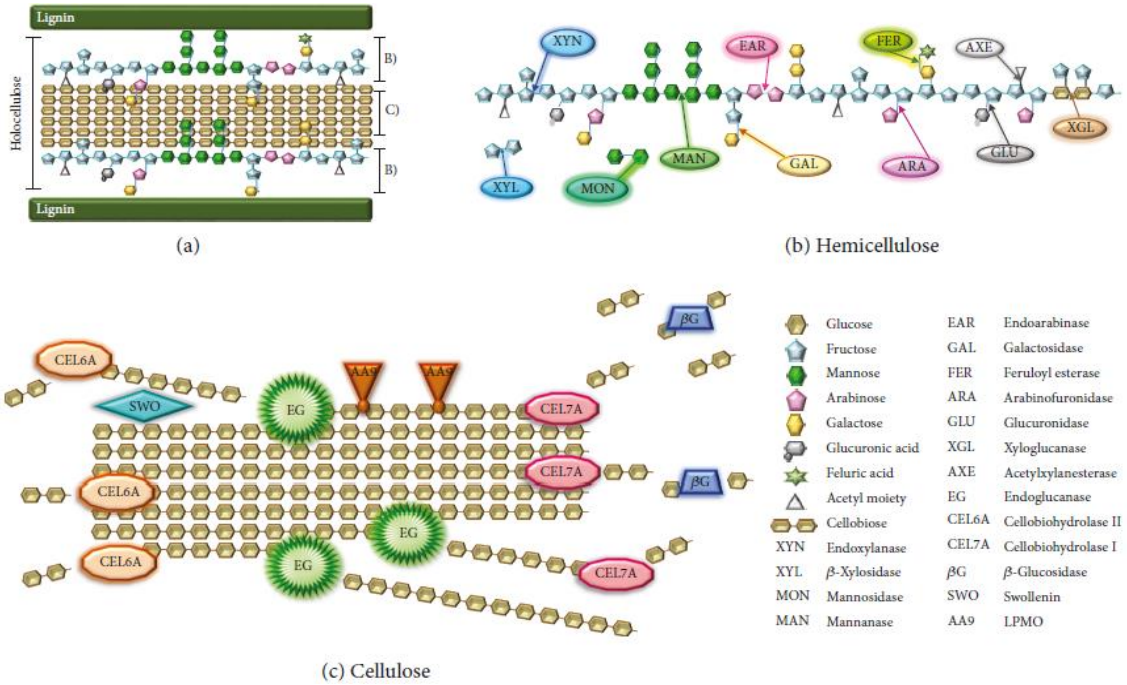

Figura 2: Modelo esquemático da degradação enzimática da celulose. As endoglicanases (EG) e celobiohidrolases (CEL6a e CEL7a) degradam a celulose em oligossacarídeos, principalmente celobiose, e, as β-glicosidases (βG) hidrolisam celobiose a glicose. A *swollenin* (SWO) expande a cadeia celulolítica e LPMO (AA9) funciona através do metabolismo oxidativo. Em conjunto essas proteínas permitem a desconstrução da biomassa vegetal (Adaptado de Paula et al., 2018).

As endoglicanases clivam de forma aleatória as ligações glicosídicas internas da celulose, liberando oligossacarídeos de diferentes tamanhos. Em *T. reesei* há quatro endoglicanases caracterizadas: Cel7b/EGI, Cel5a/EGII, Cel12a/EGII e Cel45a/EGV. Já as celobiohidorlases clivam as ligações β-1,4-glicosídicas das extremidades da cadeia de celulose, gerando celobiose. A CBHII/Cel6A atua a partir da extremidade não-redutora e a CBHI/Cel7A na extremidade redutora da celulose. Apesar de serem muito eficientes,

essas enzimas sofrem inibição competitiva pelo produto, limitando sua capacidade de degradação. Por último, as β-glicosidases realizam a hidrólise da celobiose em glicose e, quando em pequena quantidade, pode ocasionar o acúmulo do seu substrato, levando a inibição das CBHs. Em *T. reesei* já foram caracterizadas cinco β-glicosidases: Cel3a/BGLI, Cel1a/BGLII, Cel1b, Cel3d e Cel3i/BGL3i (Schmoll et al., 2016; Singh et al., 2017; Sipos et al., 2010).

A descoberta das proteínas acessórios abriu uma nova porta para a melhor compreensão no processo de degradação da biomassa. Uma das mais estudadas nos últimos anos são as LPMOs (*polysaccharide lytic monooxygenases*). Essas proteínas não possuem atividade enzimática e atuam na superfície das fibrilas de celulose aumentando a sacarificação, por tornar novos lugares susceptíveis a ação das celulases. Elas foram usadas para definir uma nova classe de CAZy, denominada “atividades auxiliares” (AA) e, em *T. reesei*, estão localizadas na família AA9 (Eibinger et al., 2014; Lombard et al., 2014). A *Swollenin* (SWO) possui sequência gênica semelhante a expansinas vegetais, e ambas atuam no rompimento das pontes de hidrogênio entre as microfibilas de celulose. Em *T. reesei*, SWO possui um modo de ação semelhante a endoglicanases e celobiohidrolases ao expandir a fibra de celulose, mas sem desempenhar a função de hidrólise (Andberg et al., 2015; Häkkinen et al., 2012; M. Saloheimo et al., 2002).

2.4 – Proteínas da família das Cerato - plataninas (CPs)

O estudo das cerato-plataninas (CPs) iniciou nos anos 90 na Itália, com o objetivo de entender os mecanismos de virulência secretados pelo fungo *Ceratocystis fimbriata*, um patógeno de plantas que causa grandes prejuízos econômicos ao infectar lavouras agrícolas (Pazzagli et al., 1999; Tsopelas et al., 2017).

A partir de então CPs foram encontradas exclusivamente em fungos, sendo mais abundantes no secretoma por possuírem um peptídeo sinal de 14 a 18 resíduos de aminoácidos que as direciona para via de secreção. São proteínas pequenas, de aproximadamente 12,4KDa (105 a 134 resíduos de aminoácidos), que apresentam como particularidade quatro cisteínas conservadas, formando duas pontes dissulfto, podendo ser encontradas na forma de monômeros ou dímeros (Ashwin et al., 2017; Pazzagli et al., 2014). Devido a essas características, as CPS foram por muitos anos relacionadas às hidrofobinas, que também são pequenas proteínas secretadas por fungos filamentosos responsáveis por formar um revestimento hidrofóbico. No entanto, após observar

similaridade das sequências apenas entre as CPs, ficou definido que cerato plataninas e as hidrofobinas pertencem a famílias de proteínas diferentes (H. Chen et al., 2013; Pazzagli et al., 2009).

Com análises estruturais das CPs foi possível observar que elas são constituídas por duas α-hélices e seis folhas β, formando uma estrutura em barril-βψ de dobra dupla. Proteínas que possuem essa estrutura terciária estão relacionadas com o reconhecimento e modificação de polissacarídeos, como expansinas vegetais e bacterianas e endoglicanases fúngicas. A similaridade estrutural das CPs com as expansinas vegetais pode ser relevante para compreender a função dessas proteínas fúngicas na interação com plantas (Barsottini et al., 2013; De Oliveira et al., 2011).

Na estrutura das CPS, o resíduo Asp-77 é conservado de forma semelhante ao Asp-82 nas expansinas. Essa similaridade estrutural pode levar a uma similaridade funcional em relação a interação dessas proteínas com a celulose. Para verificar esse fato, foi realizado uma mutagênese dirigida substituindo Asp-77 por Ala-77, e os resultados demostraram uma menor capacidade das CPs em enfraquecer fibrilas de celulose (Georgelis et al., 2011; Luti et al., 2016). Já em um estudo realizado com FgCPs de *F. graminearum*, demonstrou um aumento de atividade das celulases fúngicas em diferentes substratos celulolíticos, provavelmente devido a capacidade das CPs em afrouxar a parede celular e facilitar o acesso dessas enzimas (Baccelli et al., 2014; Quarantin et al., 2019).

A expressão dos genes que codificam CPs ocorre, em maior quantidade, durante o desenvolvimento do fungo, sendo altamente expressos durante o crescimento de hifas, massa micelial, esporulação e maturação de esporos. Em alguns estudos, as cerato plataninas foram observadas na parede celular, entre os septos adjacentes das hifas. Esses dados sugerem que algumas CPs podem atuar como as expansinas na remodelação e aumento da parede celular do fungo (Frías et al., 2014; Pan et al., 2018). Em alguns casos, CPs também apresentaram a função de proteger a parede celular do fungo contra degradação enzimática, como foi observado para FgCPP1 e 2 de *Fusarium graminearum* (Quarantin et al., 2016).

No entanto, a função mais bem estuda e conhecida das cerato plataninas é a sua capacidade de causar respostas de defesa locais e sistêmicas em plantas. Em fungos fitopatogênicos essas proteínas são abundantemente secretadas na célula hospedeira, onde atuam como fatores de virulência e efetores que suprimem a defesa basal da planta. Esse papel na virulência já foi descrito em fungos como *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia*

sclerotiorum e *Magnaporthe grisea* (Ferreira, 2012; Frías et al., 2011; Jeong et al., 2007; Lord, 2003; Tissue et al., n.d.; Yang et al., 2018). Em *Moniliophthora perniciosa* as cerato plataninas se ligam a oligômeros de N-acetilglicosamina, que são potentes eliciadores de defesa da planta contra a colonização fúngica (Barsottini et al., 2013).

Curiosamente, CPs também são amplamente encontradas em fungos micoparasitários e oportunistas ambientais, como *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma virens* e *Trichoderma Harzianum*, espécies bem conhecidas por atuarem como agentes de biocontrole. Nesses fungos, CPs são importantes por desencadearem a defesa imunológica das plantas, sendo denominadas "proteínas desencadeadora semelhantes a resposta de plantas" (EPLs - *eliciting plant response-like*) (Gomes et al., 2017; Salas-Marina et al., 2015). No gênero *Trichoderma* foram descritos três genes para cerato plataninas, sendo *epl1* o mais expresso em diferentes condições e *epl2* e *epl3* detectados em níveis mais baixos. Apesar desse gênero de fungos ser relativamente bem estudado, pouco se sabe sobre como os genes codificadores de CPs evoluíram e seu papel em todo o espectro de interações de *Trichoderma* (Gaderer et al., 2014, 2015).

Em *T. reesie* foram identificados dois genes para CPs, *epl1* e *epl2*. Análises de RNA-seq obtidas pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que *epl1* (ID 123955) estava mais expresso em celulose (cerca de 23vezes). Tendo em vista a importância biotecnológica desse fungo e o pouco conhecimento sobre os genes codificadores de cerato plataninas, nesse trabalho foi realizado uma análise mais aprofundada para o gene *epl1* de *T. reesei*

3-Objetivos

O objetivo geral desse trabalho é identificar e caracterizar o gene *epl1* de *T. reesei*, através de técnicas moleculares e bioquímicas. Dentre os objetivos específicos, pode-se citar:

- Realizar o *nocaute* do gene *epl1* no genoma do *T. reesei* e avaliar seu papel funcional *in vivo.*

- Determinar atividade celulolítica após o cultivo em celulose e bagaço de cana.

- Analisar o perfil de expressão gênica de celulases na linhagem parental e mutante após o cultivo em celulose.

- Realizar o sequenciamento em massa das bibliotecas de cDNA utilizando a tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração (RNA-seq);

- Análise global da regulação da expressão gênica do mutante Δ*epl1* quando crescido em presença do indutor (celulose) da formação de celulase.

4- Material e métodos

4. 1) Meios de cultivo utilizados

4. 1. 1) Meio MEX

Extrato de malte 3% (p/v)

Agar-Agar 2% (p/v)

4. 1. 2) Meio Mandels-Andreotti (1L)

- Solução mineral (500mL) – 50%:

2,8 g/L $(NH_4)_2SO_4$

4,0 g/L KH_2PO_4

0,6 g/L $MgSO_4.7H_2O$

0,8 g/L $CaCl_2.2H_2O$

- Tampão Citrato-fosfato 0,1M pH 5,0 (480 mL) – 48%:

0,2 M $Na_2HPO_4.2H_2O$

0,2 M ácido cítrico

- Solução elementos traços 50X (20 mL) – 2%:

250 mg/L $FeSO_4.7H_2O$

85 mg/L $MnSO_4.H_2O$

70 mg/L $ZnSO_4.7H_2O$

100 mg/L $CaCl_2.2H_2O$

- Ajustar o pH para 2,0 com H_2SO_4

- Juntar as três soluções acima e acrescentar peptona (1,0 g/L), uréia (0,3 g/L) e a fonte de carbono (1% de celulose ou 1% de glicerol).

4.2- Organismos

4.2.1- *Trichoderma reesei*

A linhagem QM6aΔ*tmus53*Δ*pyr4* (Derntl et al., 2015) foi cedida da coleção *Research Area Gene Technology and Applied Biochemistry, Institute for Chemical Engineering, Viena University of Technology*, Áustria, pela Dra. Astrid Aigner-Mach. O fungo foi cultivado a 30ºC em meio MEX por 7 a 10 dias, com repiques periódicos. Essa linhagem foi utilizada como controle em todos os experimentos realizados e os meios utilizados foram suplementados com 5mM de uridina, devido a deleção do gene *pyr4.*

4.2.2- *Saccharomyces cerevisiae*

A linhagem SC9721 (genótipo: *Mat*a *his*3Δ200 *ura*3–52 *leu*2Δ1 *lys*2Δ202 *trp*1Δ63) (Reis et al., 2013), foi utilizada para construção do cassete de deleção para *T. reesei* através de recombinação *in vivo* usando um marcador para substituição de genes.

4.3- Deleção do gene *epl1* de *T. reesei*

Para deleção do gene *epl1* foi feita a construção de um cassete de deleção substituindo o gene de interesse pelo gene *pyr4* no genoma de *T. reesei*. Para esse processo foram utilizadas cepas SC9721. Para transformação de *S. cerevisiae*, as regiões 5’ e 3’ UTR do gene *epl1* e do gene *pyr4* foram amplificadas a partir do DNA genômico de *T. reesei* e, juntamente com o vetor pRS426 linearizado (Figura 3), foram utilizadas para transformar cepas SC9721. A montagem de cassete de deleção ocorreu através do processo de recombinação homólogo em levedura (Figura 4).

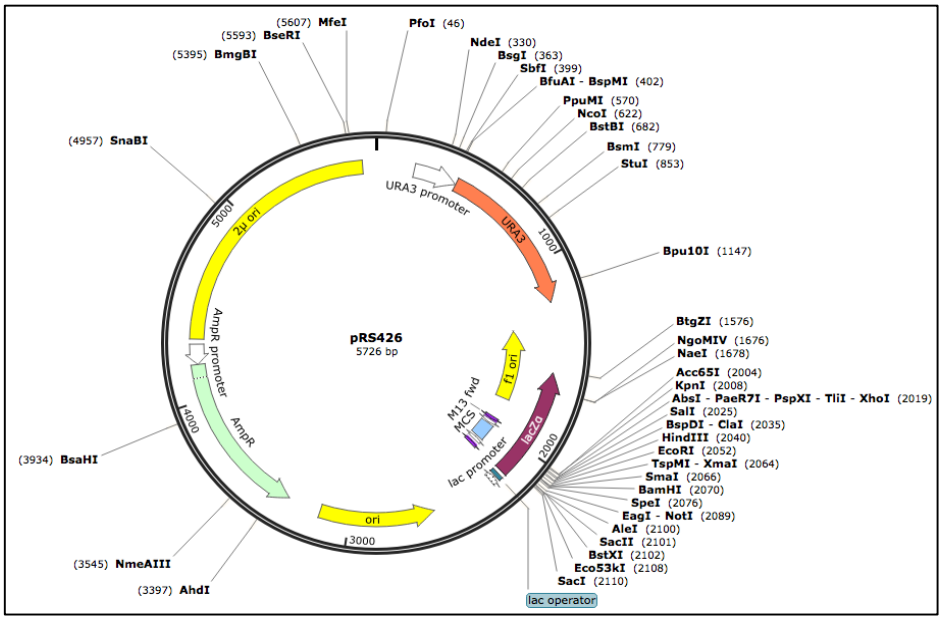

Figura 3: Representação esquemática do vetor pRS426 utilizado para a construção do cassete de deleção (*www.snapgene.com/resources*).

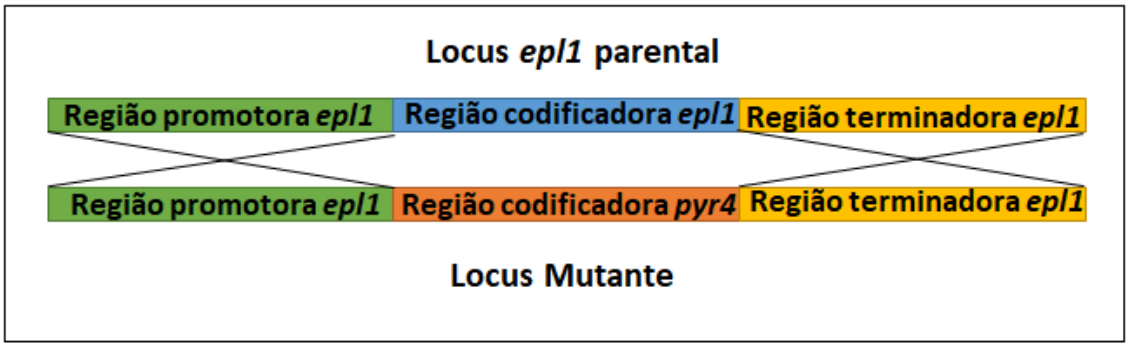

Figura 4: Representação esquemática do mecanismo de recombinação homóloga em leveduras do cassete de deleção de *epl1*.

Para obter os fragmentos usados na construção do cassete de deleção, as reações de amplificação por PCR foram realizadas em um volume final de 50 µL utilizando a enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase. Para amplificar as regiões 5' e 3' que flanqueiam a região aberta de leitura (ORF) do gene *epl1*, foi usado como molde 300 ng de DNA genômico da linhagem QM6a. Para amplificar o gene *pyr4*, usado como marcador genético de auxotrofia, foi usado como molde o DNA genômico da linhagem QM9414. Os três fragmentos amplificados apresentam extremidades coesivas entre si, o que possibilita a recombinação homóloga na levedura com o vetor pRS426 (Figura 3).

Desse modo, a transformação da levedura é realizada com os 3 fragmentos amplificados e purificados, juntamente com o vetor pRS426, linearizado com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI. Esse vetor apresenta marca de supressão da auxotrofia para uracila, o que possibilita a seleção das colônias transformadas e obtenção do cassete de deleção após a recombinação *in vivo.*

4.3.1– Extração de DNA genômico de *T. reesei.*

Para extração de DNA genômico, 10 μL da solução de esporo (NaCl 0,8% (p/v); tween 80 0,05% (v/v)) estoque da cepa QM6a foi inoculada em 50 mL de meio MEX líquido suplementado com 5 mM de uridina em Erlenmeyers de 125mL. O fungo cresceu por 48 horas a 30ºC com rotação de 200 rpm. O micélio foi filtrado em Miracloth, macerado em nitrogênio líquido, adicionado a tubos contendo 800 μL de Tampão de extração (NaCl 1,4 M; Tris-HCl 0,1M pH7,5; EDTA 5mM) com 16 μL de β-mercaptoetanol, agitado em vortéx e incubado a 65ºC por 20 minutos. Após a incubação, foi adicionado 400 μL de fenol e 400 μL de clorofórmio:álcool isoamíliclo (49:1). A mostra foi agitada em vortéx e centrifugada a 20.000 g por 10 minutos a 4ºC. Cuidadosamente, o sobrenadante foi transferido para um novo tudo contendo 800 μL de isopropanol e incubado por 30 minutos a -20ºC. Logo após esse período, foi feita uma nova centrifugação a 20.000 g por 30 minutos a 4ºC, onde o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com etanol 70%. Para descartar o etanol a amostra foi centrifugada a 20.000 g por 5 minutos a 4ºC e o pellet foi seco a temperatura ambiente por 30 minutos e ressuspendido em 100 μL da água DEPC. O DNA extraído foi tratado com 5 μL de RNAse (20 mg/mL) e analisado por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.3.2– Amplificação do gene *pyr4* e dos fragmentos 5’ e 3’ UTR do gene *epl1*.

As reações de amplificação do gene *pyr4* e do gene *epl1* de *T. reesei* foram realizadas de acordo com Bej e Mahbubani (1994) e Saiki e colaboradores (1985). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas PCR para obtenção dos fragmentos necessários para a construção do cassete de deleção estão representados na Tabela 1.

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos fragmentos necessários para a produção do cassete de deleção do gene *epl1*.

Fragmento amplificado	Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores
pRS426_5' UTR *epl1* senso	5' GTAACGCCAGGGTTTTCCCATCGCGTCTTGGGCGGAACTT 3'
pyr4_5' UTR *epl1* anti-senso	5'**GCGGGAGAGTCTGGATAGCTCGAAGG**CAGGAGAAAAGCACAAAGAAGAG 3'
*pyr4*_3' UTR *epl1* senso	5'**GTCGACGATATCAGCTTCCATAT**CCCGTCTTATTCCCAATGTTG 3'
pRS426_3' UTR *epl1* anti-senso	5'GGAAACAGCTCATCTTCTCGTCGACAACCGCGGATAACAATTTCACACA 3'
pyr4 senso	5'CCTTCGAGCTATCCAGACTCTCCCTTGCCTTGTCTTGTCTGGGTT 3'
pyr4 anti-senso	5'CAACATTGGGAATAAGACGGGCGGTTGATTGTTGCCGTCCGTTTC 3'

Os nucleotídeos sublinhados representam regiões de pareamento com as extremidades do vetor pRS426. Os nucleotídeos em negrito representam regiões de pareamento com as extremidades do fragmento *pyr4*.

4.3.3 – Preparação de leveduras competentes

Para o pré-inóculo, uma colônia isolada da cepa SC9721 foi transferida para um Erlenmyer contendo 10 mL de meio YPD (peptona 2,0% (p/v), extrato de leveduras 1,0% (p/v), glicose 2,0% (p/v)), e incubada sob agitação a 200 rpm por 16 horas a 30ºC. Após o crescimento, 5 mL da cultura foi inoculada em 200 mL de meio YPD e incubada nas mesmas condições por 4 horas. Após esse período, as leveduras foram centrifugadas a 5.000 g por 5 minutos, o pellet foi ressuspendido em 20 mL de água MilliQ estéril e centrifugado novamente. Em seguida, foi adicionado as células 1 mL de solução TE/LiAc (Tris-HCl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L pH 8,0 e acetato de lítio 100 mmol/L).

4.3.4 – Transformação de leveduras

Para cada reação de transformação contendo 100 μL da suspensão de células competentes, foram adicionadas as seguintes misturas: Mix 1) 150 ng os fragmentos dos DNA purificados, 200-500 ng do vetor pRS426 previamente digerido, e 100 μg de DNA de esperma de salmão desnaturado (10 mg/mL); Mix 2) 600 μL LiAc 100 mmol/L, PEG-3350 50% (p/v) e tampão TE (Tris-HCl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L pH 8,0). Em seguida, as células foram incubadas a 200 rpm por 30 minutos a 30ºC. Após esse período, foi adicionado 70 μL de DMSO, a mistura foi homogeneizada por inversão e incubada a

42ºC por 15 minutos e resfriada em gelo por 2 minutos. Logo após, 700 μL da água foi adicionado nas reações e essas foram centrifugadas a 13.000 rpm por 30 segundos. Aproximadamente 800 μL do sobrenadante foi descartado, e as células transformadas foram semeadas em placas contendo meio seletivo SC-URA$^-$.

4.3.5 – Extração de DNA de *S. cerevisiae*

Cada placa de transformação foi dividida em 4 partes e as colônias foram inoculadas em 10 mL de meio seletivo SC-URA$^-$ sob agitação de 200 rpm a 30ºC por 24 horas. Após esse período, as células foram recuperadas por centrifugação a 4.000 rpm por 5 minutos e ressuspensas em 1 mL de tampão de extração de DNA de leveduras. A essa suspensão foi adicionado um volume de 500 μL de pérolas de vidro e os tubos foram agitados mecanicamente por 10 minutos. Após este período, 1 mL do lisado celular foi transferido para um novo tubo de 2 mL contendo 800 μL de fenol:clorofórmio (1:1) e novamente o material foi agitado por 10 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos a 4ºC e a fase aquosa contendo o DNA genômico foi recuperada. Após a extração, foi adicionado 0,6 volumes de isopropanol e, após homogeneização, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 20.800 *g.* A fase aquosa foi transferida para um novo tubo. Posteriormente, o DNA foi precipitado pela adição de 0,6 volumes de isopropanol e centrifugado a 12.000 rpm por 1 minuto a 4ºC. O sedimento foi lavado com etanol 70% (v/v) gelado, seco à temperatura ambiente por 30 minutos e ressuspenso em 50 μL de água Milli-Q. O DNA extraído foi tratado com 5 μL RNAse (10 mg/mL) por 1 hora a 37ºC e submetido a PCR para a verificação da presença do cassete de deleção clonado. A integridade do material genético foi analisada em gel de agarose 1%.

4.3.6- Transformação do fungo *T. reesei*

A transformação do fungo *T. reesei* foi realizada de acordo com Gruber e colaboradores (1990), com algumas modificações (Gruber et al., 1990).

- Produção de protoplastos

A linhagem QM6a foi crescida em meio MEX entre 7 e 10 dias a 30ºC. A solução de esporos obtida foi semeada em placas contendo meio MEX-peptona 0,1% cobertas por discos de papel celofane e, em seguida, foram incubadas *overnight* a 30ºC. Após a

germinação do fungo, os celofanes contendo o micélio foram transferidos para placas de Petri contendo 15 mL de solução de lise (enzima de lise de *Trichoderma harzianum* (Sigma #L-1412) diluída em 15 mL de tampão P ($(NH_4)_2SO_4$ 0,6M; KH_2PO_4 0,15M; K_2HPO_4 8mM pH 5,6)). Posteriormente, as placas foram incubadas sob agitação constante de 60 rpm por 5 horas a 30ºC.

Para obtenção dos protoplastos, o micélio digerido foi coletado, filtrado em Miracloth e centrifugado a 4.000 g por 10 minutos a 4ºC. O sedimento foi lavado com 10 mL de tampão P e novamente centrifugado nas mesmas condições. O pellet foi ressuspendido em 1 mL de tampão STC ($CaCL_2.2H_2O$ 10mM; Sorbitol 1,2M; Tris-HCl 1M pH 7,4) e foi adicionado a mistura 250 μL da solução PEG (PEG-6000 25%; $CaCl_2.2H_2O$ 50 mM; Tris-HCl 1 M pH 7,5).

- Transformação linhagem QM6a

Para o início da transformação, 20 μg de DNA linear do cassete de deleção (produto de PCR) foram incubados com 130 μL da suspensão de protoplastos em gelo por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 mL da solução de PEG, a mistura foi deixada a temperatura ambiente por 5 minutos, e, após esse período, foi acrescentado 2 mL de tampão STC. Posteriormente, foi adicionado meio seletivo Meldels-Andreotti sem uridina e peptona até um volume de 40 mL e, após homogeneização, 10 mL dessa mistura foi vertida em placas e incubada a 30ºC até a visualização de esporos isolados.

Para seleção dos transformantes, foi realizado 3 rounds de cultivo, alternando o crescimento do fungo em meio Mendels-Andreotti sem uridina e em meio Mendels-Andreotti com triton. Após esse período, o DNA dos candidatos foi extraído para verificar a deleção do gene *epl1*.

4.4- Crescimento em celulose em fermentação submersa (FS)

Inicialmente o fungo parental QM6a e o mutante Δ*epl1* foram crescidos em meio MEX entre 7 e 10 dias, até completa esporulação. Em seguida, foi realizado o inóculo de 10^6 esporos/mL em Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meio Mendels-Andreotti suplementado com 1% (p/v) de celulose. Para esse cultivo foi feito o crescimento prévio das cepas em meio Mendels-Andreotti suplementado com 1% (v/v) de glicerol, uma fonte não indutora de holocelulases. Os frascos foram mantidos sob agitação constante de 200 rpm a 30ºC por 24, 48 e 72 horas. O experimento foi conduzido em triplicata para cada

amostra e, após a indução, os micélios e sobrenadantes foram coletados por filtração e estocados a -80°C e -20ºC, respectivamente.

4.5- Fermentação em meio semi-sólido (FES) em bagaço de cana de açúcar

O crescimento em meio semi-sólido foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Gutierrez Corrêa e colaboradores, com algumas modificações (Gutierrez-Correa et al., 1999). O cultivo foi realizado de duas formas: crescidos previamente em 1% de glicerol por 24 horas e sem crescimento prévio. O total de bagaço de cana utilizado foi de 3g e o meio de nutrientes utilizado foi Mendels-Andreotti. O teor de umidade inicial do substrato foi de 80% (m/v). Uma suspensão de 10^6 esporos/mL das cepas QM6a e Δ*epl1* foram inoculadas em Erlenmyer de 50 mL e mantido sem agitação a 30ºC por 24, 48 e 72 horas. Após esse período, foi feita a extração das celulases em 20 mL de água Milli-Q estéril com 0,1% de Tween 80. As amostras foram mantidas sob agitação de 150 rpm por 30 minutos a 30ºC, centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos e 4ºC e, posteriormente, filtradas para recuperação do sobrenadante. Os experimentos foram conduzidos em triplicata para cada amostra.

4.6- SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio)

A integridade das proteínas foi analisada por SDS-page e, para isso, adicionou-se tampão de amostras, sendo as mesmas desnaturadas a 98ºC por 5 minutos. O gel de foi produzido segundo Laemmli (1970). O gel de empilhamento foi preparado com concentração de 5% de acrilamida/bis-acrilamida em tampão Tris-HCl 1 mol/L pH 6,8 e o gel de separação, com concentração de 12%, em Tris-HCl 1,5 mol/L pH 8,8. Foi utilizado tampão de corrida Tris-glicina pH 8,3 e a eletroforese ocorreu a 120V, por aproximadamente 1 hora e meia. O gel foi corado com solução de azul de *coomassie* e descorado com lavagens em solução descolorante (Laemmli, 1970).

4.7- Atividade enzimática

4.7.1- Atividade β-glicosidase

A atividade de β-glicosidade foi avaliada na linhagem parental QM6a e mutante Δ*epl1*. Para isso, utilizou-se o substrato pNPG 5mM diluído em tampão acetato de sódio

50 mM pH 5,5. As amostras foram descongeladas em gelo e as reações foram realizadas em triplicata utilizando-se 10 μL do sobrenadante, 40 μL do substrato e 50 μL de tampão. Após homogeneização, a mistura foi incubada a 50ºC por 15 minutos e, em seguida, foi adicionado 100 μL de carbonato de sódio 1 M. A leitura foi feita em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 405nm.

4.7.2- Atividade de celobiohidrolase

A atividade de celobiohidrolase foi avaliada nas cepas QM6a e Δ*epl1*. Para isso, utilizou-se o substrato pNPC 5 mM diluído em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5. As amostras foram descongeladas em gelo e as reações foram realizadas em triplicata utilizando-se 10 μL do sobrenadante, 40 μL do substrato e 50 μL de tampão. Após homogeneização, a mistura foi incubada a 50ºC por 3 horas e meia e, em seguida, foi adicionado 100 μL de carbonato de sódio 1 M. A leitura foi feita em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 405nm.

4.8- Extração de RNA Total

Os micélios obtidos do cultivo em celulose (FS) das cepas QM6a e Δ*epl1* foram congelados em nitrogênio líquido e macerados para extração do RNA total. O RNA foi extraído através do reagente da Life Tecchnologies TRIzol® RNA, seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram quantificadas, sua integridade foi verificada através de gel de agarose 1% e do Agilent 2100 Bioanalyzer.

4.9- PCR quantitativo em tempo real (*Real Time* PCR)

Para analisar a expressão gênica por PCR em Tempo Real, 1 μg do RNA extraído foi tratado com DNAse I (ThermoFisher Scientific). Após a remoção do DNA, foi feita a síntese de cDNA utilizando o kit Maxima^{TM} First Strand cDNA Synthesis (ThermoFisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, o cDNA foi diluído em água (1:50) e usado para análise por PCR em tempo real no equipamento Bio-Rad CFX96^{TM}, usando SsoFastTM EvaGreen® Supermix (Bio-Rad) para o sinal de detecção, de acordo com as instruções do fabricante. Para controle endógeno o gene da actina foi

utilizado para normalizar a quantidade total de cDNA em cada reação. Os primers usados para amplificação dos genes analisados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados em experimentos PCR em tempo real.

Oligonucleotídeo	**Sequência**
cel6a (72567)	5’ ACAAGAATGCATCGTCTCCG 3’
	5’TGTTCCACCCGTTGTAGTTG 3’
cel7a (123989)	5’ CCGAGCTTGGTAGTTACTCTG 3’
	5’ GGTAGCCTTCTTGACTGAGT 3’
cel74a (49081)	5’ CGGTTGTATCGTACCTATTCCG 3’
	5’ TGATGTCTTTCCAAGTTCCCC 3’
cel3a (76672)	5’ CTGTACATCACCTACCCATC 3’
	5’ TAGCTGAGATCTCGTCGTC 3’
epl1 (123955)	5’ CGGTACAACTGCCACTCG 3’
	5’ GAGCACGATACACTAGCCAAG 3’

4.10- Sequenciamento (RNA-seq)

Para realizar o sequenciamento, foi feita a extração em triplicata dos RNAs crescidos em glicerol 1% por 24 horas e em celulose 1% por 72 horas. Para o cultivo em celulose, as linhagens foram pré-cultivadas em glicerol. Os RNAs obtidos de *T. reesei* QM6a e Δ*epl1* foram diluídos em água, quantificados e 20 μg foram tratados com o Kit RNAeasy da Quiagen de acordo com as recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado pela empresa Novogene Corporation Inc. em Sacramento/ Estados Unidos da América, utilizando-se a tecnologia Illumina HiSeq 4000.

4.10.1- Análise dos dados de RNA-seq

Para avaliar a qualidade dos dados obtidos através do sequenciamento foi utilizado o FastQC v0.11.5. A remoção dos adaptadores (5'-AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT-3' e 5'-GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC-3') foi realizada através do cutadapt v3.4 (Martin, 2011), assim como a remoção dos *reads* com N > 10%, Qscore ≤ 5 e tamanho mínimo < 150 bp. Os *reads* resultantes foram mapeados no genoma *Trichoderma reesei* v2.0, obtido do JGI *Genome Portal* (http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html), utilizando o STAR v.2.7.9ª (Dobin et al., 2013). O HTSeq-count v0.13.5 (Anders et al., 2015) foi utilizado para a contagem dos *reads* mapeados e os valores de expressão foram calculados através do pacote DESeq2 v.1.31.21 do R (Love et al., 2014). Os genes presentes nesta análise foram anotados utilizando o InterProScan v.5.51-85 (Jones et al., 2014). A expressão diferencial foi representada em log2 *fold change*, onde os genes foram considerados *up* regulados quando o log2 *fold change* foi ≥ 1 e *down* regulados quando o log2 *fold change* foi ≤ -1, utilizando um p-valor ajustado < 0,05 como limiar. O diagrama de Venn e heatmap foram construídos utilizando os pacotes eulerr e ggplot2 do R, respectivamente. A categorização gênica foi feita utilizando-se os termos do *Gene Ontology* (GO), realizada de acordo com Wright e colaboradores (Wright et al., 2015). A análise de Vias metabólicas foi realizada através da anotação e mapeamento na base de dados do KEGG utilizando o BlastKOALA (Kanehisa et al., 2019).

4.11 - Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa *GraphPad Prism 7*. As comparações entre diferentes grupos experimentais foram realizadas através de análises de variância do tipo Two-way ANOVA (com α=0,05), seguida pelo teste de Bonferroini. Foram considerados estatisticamente diferentes os grupos experimentais com valor de $p<0,05$.

5-Resultados

5.1 – Deleção do gene *epl1* em *T. reesei*

5.1.1- Amplificação do gene *pyr4* e dos fragmentos 5' e 3' UTR do gene *epl1*.

Para um melhor entendimento da função da proteína cerato platanina de *T. reesei*, foi feita a deleção da ORF do gene *epl1* (ID 123955), a qual foi substituída pela ORF do gene de marcação *pyr4*. Para a construção do cassete de deleção foi utilizada uma metodologia baseada em fusão por recombinação *in vivo* em leveduras.

Inicialmente, o DNA genômico de *T. reesei* foi extraído e utilizado como molde para amplificação da ORF do gene *pyr4* (cepa QM9114), e como molde para amplificação das regiões flanqueadoras do gene *epl1* (cepa QM6a). Além disso, o plasmídeo pRS426 foi digerido com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI, para posterior utilização na construção do cassete de deleção. Os fragmenteos amplificados estão representados na Figura 5.

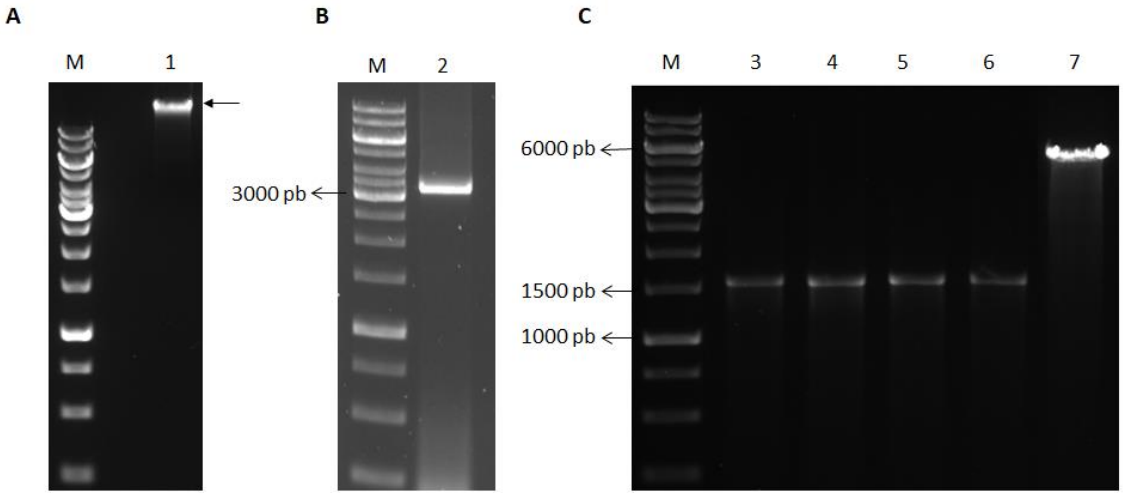

Figura 5: Fragmentos de DNA utilizados para a construção do cassete de deleção para o gene *epl1*. Fotografia do gel de eletroforese em agarose 1,0% (p/v), em tampão TAE. As setas indicam o tamanho das bandas correspondentes aos fragmentos de tamanhos esperados. M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder; A: DNA genômico de *T. reesei* cepa QM6a *pyr4*$^{-}$(1); B: Produto de PCR da amplificação do gene *pyr4* (2)*;* C: Produtos de PCR obtidos pelas amplificações das regiões flanqueadoras do gene *epl1* (3 e 4: 5'UTR, 5 e 6: 3'UTR) e vetor pRS426 linearizado (7).

5.1.2- Produção do cassete de deleção para o gene *epl1* em *S. cerevisiae*

Nos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação dos fragmentos 5'UTR (senso) e 3'UTR (anti-senso) há uma sequência homóloga ao plasmídeo pRS426, e, nos oligonucleotídeos iniciadores 5'UTR (anti-senso) e 3'UTR (senso) há regiões homólogas ao gene marcador de seleção *pyr4.* Essa homologia permite a fusão dos fragmentos para construção do cassete de deleção (Figura 6).

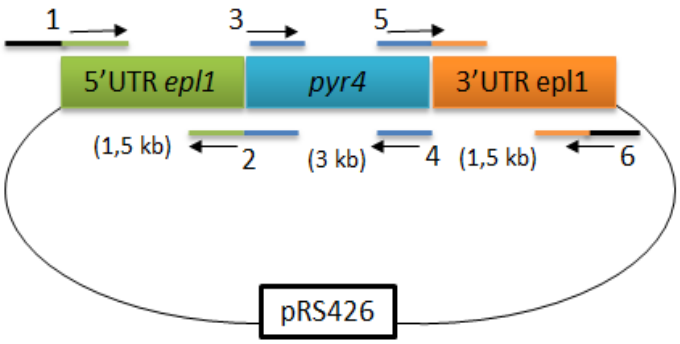

Figura 6: Desenho esquemático do vetor pRS426 contendo o cassete de deleção para o gene *epl1*. O cassete de deleção foi construído em leveduras *S. cerevisiae* (SC9721) através de recombinação homóloga *in vivo*. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as amplificações dos fragmentos estão representados. 1: 5' UTR senso; 2: 5' UTR anti-senso; 3: *pyr4* senso; 4: *pyr4* anti-senso; 5: 3' UTR senso; 6: 3' UTR anti-senso.

As leveduras *S. cerevisiae* da cepa SC9721 transformadas com o vetor pRS426 linearizado e com os fragmentos 5'UTR e 3'UTR do gene *epl1*, foram selecionadas em meio SC-URA$^-$. Em seguida, foi realizada a extração de DNA genômico das leveduras e confirmação da presença do cassete de deleção (6.000 pb) através de PCR convencional, utilizando primers 5' UTR senso e 3' UTR anti-senso, (Figura 7).

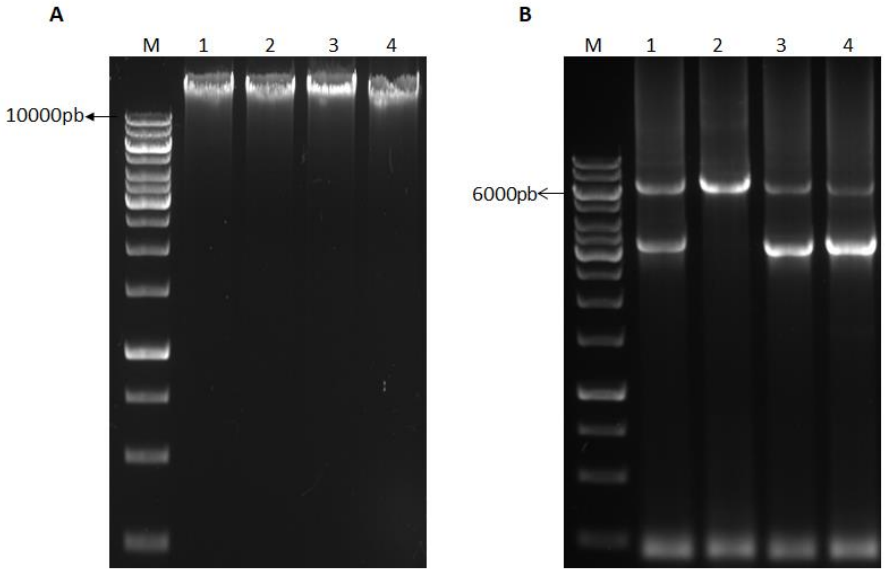

Figura 7: Análise da construção do cassete de deleção para o gene *epl1*. Fotografia do gel de eletroforese em agarose 1,0% (p/v), em tampão TAE. As setas indicam as bandas correspondentes aos fragmentos de tamanhos esperados. M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder. A: DNA genômico dos 4 pools de *S. cerevisiae* da cepa SC9721 transformada; B: Produtos de PCR obtidos pelas amplificações do cassete de deleção utilizando os *primers* 5' UTR senso e 3' UTR anti-senso. Em 2 observa-se a presença do cassete de deleção de tamanha esparado (6Kb).

5.1.3- Construção da linhagem mutante de *T. reesei* Δ*epl1*

Protoplastos da cepa QM6a *Δtmus53Δpyr4* de *T. reesei* foram transformados com o cassete de deleção. O gene alvo *epl1* foi substituído pelo gene marcador *pyr4* no genoma do fungo. O gene *pyr4* codifica para a enzima orotidina 5'-fosfato descarboxilase, essencial para a síntese de pirimidinas, o que permite a seleção das células que incorporaram o fragmento de DNA exógeno.

Para seleção dos mutantes, esporos únicos que cresceram em placas seletivas contendo meio mínimo (na ausência de uridina), foram cultivados em meio Mendels-Andreotti com 1% de glicose e os DNAs genômicos foram extraídos. A confirmação da ausência da ORF do gene *epl1* (753 pb) e inserção do gene *pyr4* (3.246 pb) foi realizada através de PCR convencional, utilizando *primers* específicos (Figura 8).

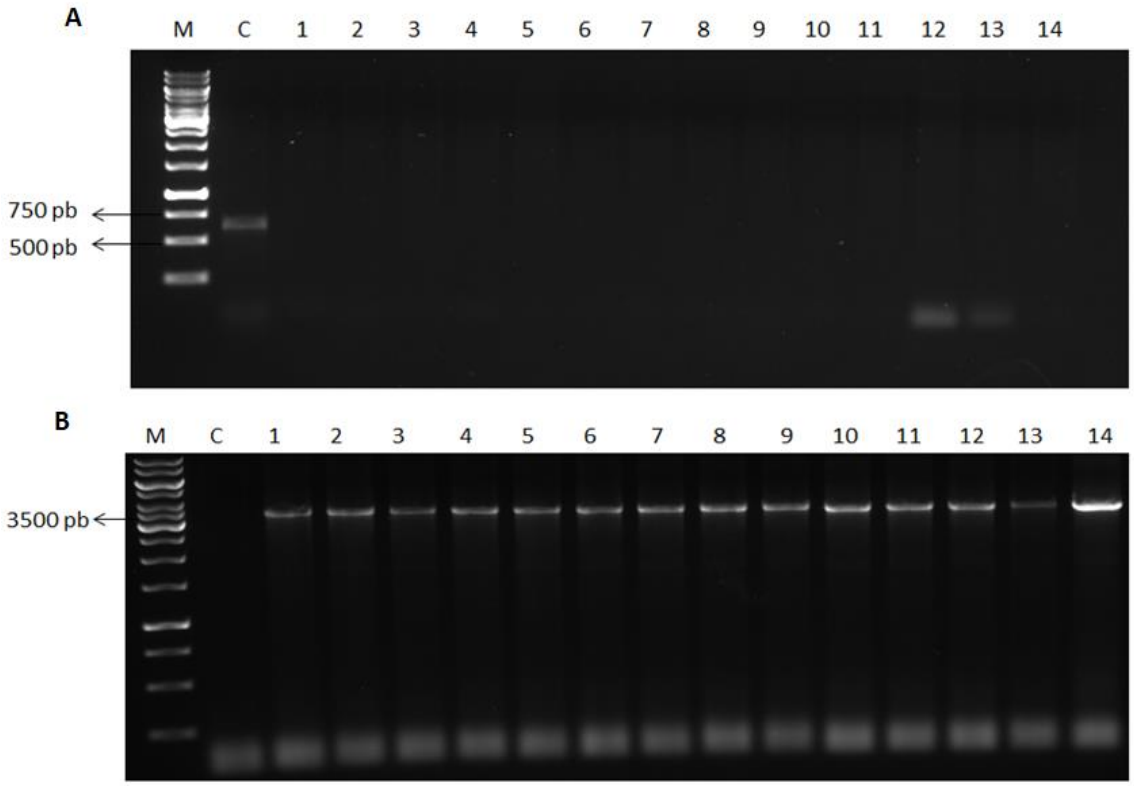

Figura 8: PCR de confirmação da obtenção do mutante *T. reesei* Δ*epl1*. Fotografia do gel de eletroforese em agarose 1,0% (p/v), em tampão TAE. M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder, C: DNA genômico da cepa controle QM6aΔ*tmus53Δpyr4*, 1 a 14: DNA genômico das cepas mutantes Δ*epl1*. A: amplificação da ORF do gene epl1 (735 pb); B: amplificação do gene *pyr4* (3.246 pb). As setas indicam as bandas correspondentes aos fragmentos de tamanhos esperados.

Para confirmar que o cassete de deleção se integrou no genoma do *T. reesei* no local correto, foi utilizado um *primer* que se anela 200 pb antes da região 5'UTR e 200 pb depois da região 3'UTR. A Figura 9 mostra um gel de agarose representando a confirmação da obtenção dos mutantes. Os resultados mostraram a presença do fragmento "5'UTR + *pyr4*" e "*pyr4* + 3'UTR amplificado a partir do DNA genômico dos mutantes Δ*epl1*.

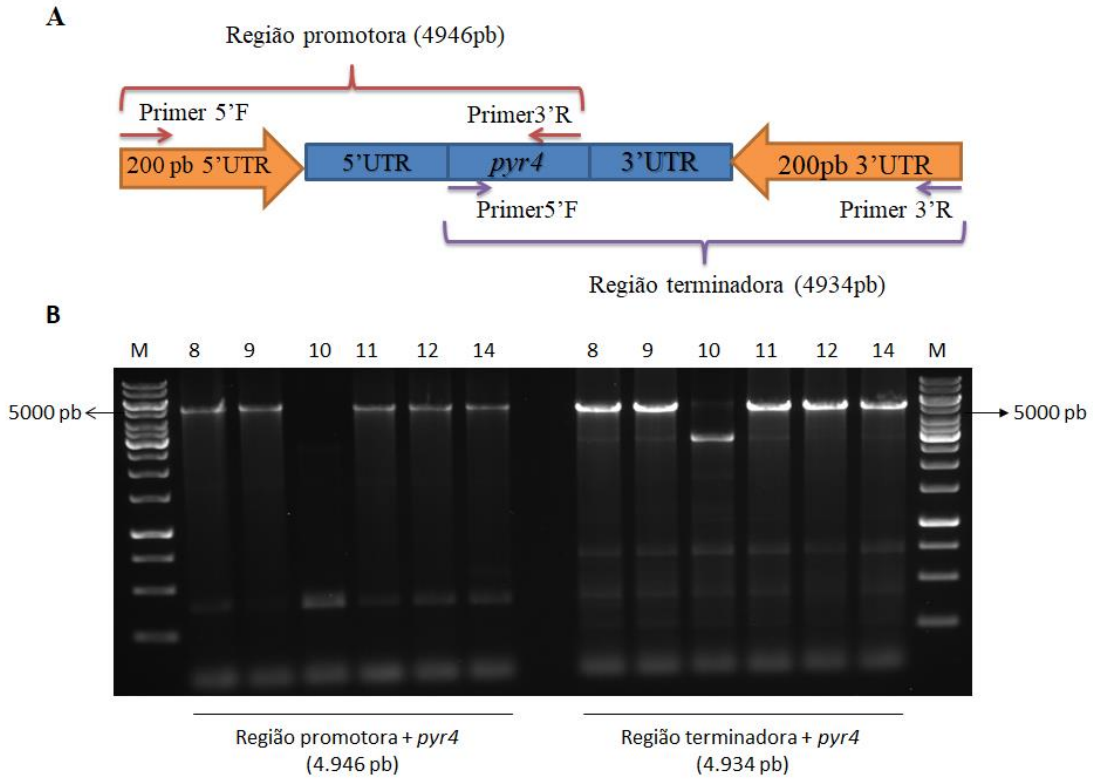

Figura 9: PCR do direcionamento do cassete de deleção no genoma de *T. reesei.* A: Desenho esquemático das regiões amplificadas. Amplificação do fragmento "5'UTR + *pyr4*" (4.946 pb) utilizando os *primers* "200 pb 5'UTR F" e "*pyr4* R". Amplificação do fragmento "*pyr4* + 3'UTR" (4.934 pb) utilizando os *primers* "*pyr4* F" e 200 pb 3'UTR R". Em azul a região do cassete de deleção. B: Fotografia do gel de eletroforese em agarose 1,0% (p/v), em tampão TAE. M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder, 8 a 14: DNA genômico das cepas mutantes Δ*epl1*. As cepas 8, 9, 11 ,12 e 14 apresentaram bandas correspondentes aos fragmentos de tamanhos esperados.

Após a confirmação por PCR, a cepa Δ*epl1*_11 foi escolhida para analisar a expressão do gene *epl1*. PCR em tempo real foi realizada com primers específicos para esse gene, utilizando sonda SybrGreen para detecção da amplificação. Na Figura 10 é possível observar a expressão absoluta do gene *epl1* na cepa QM6a e Δ*epl1*, crescido em triplicata em celulose por 24, 48 e 72 horas. No mutante Δ*epl1* não houve expressão, enquanto no controle QM6a foi detectada a expressão do gene *epl1*.

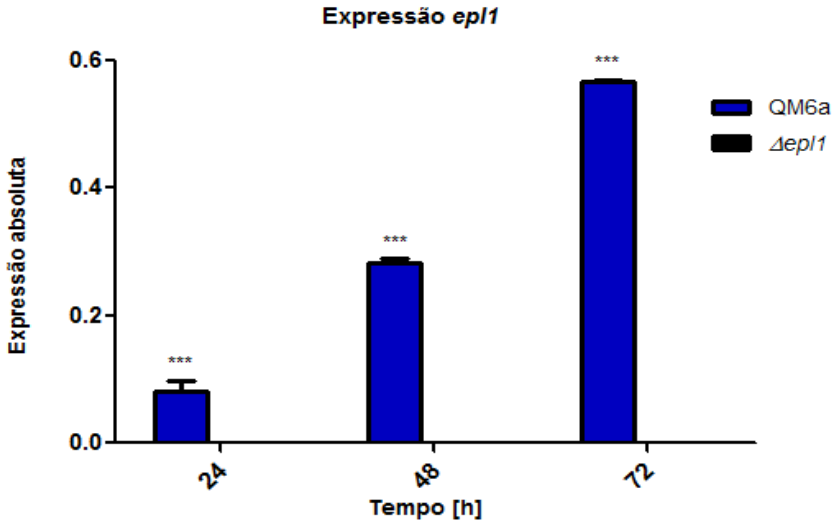

Figura 10: PCR em tempo real do gene *epl1*. Em azul a QM6a e em preto a cepa Δ*epl1* crescido em celulose por 24, 48 e 72 horas em triplicata. Para análise estatística foi realizado o teste Two-way ANOVA, utilizando o programa *GraphPad Prism* (intervalo de confiança de 95%). Os asteriscos indicam grupos que apresentaram diferença significativa.

Após a comprovar a obtenção do mutante, a cepa Δ*epl1*_11 foi utilizado para a realização dos próximos experimentos.

Afim de avaliar se a ausência de EPL1 afetaria a hidrofobicidade do fungo, foi adicionado 10 µL, 20µL, 30 µL e 40 µL de água em placas de QM6a e Δ*epl1* cultivadas em meio MEX por 7 dias (Figura 11). Após um período de 8 horas em temperatura ambiente não foi possível observar mudanças na absorção de água entre parental e mutante. Da mesma forma, não houve diferença entre tempo de crescimento e esporulação entre as duas cepas. No entanto, outros testes são necessários para analisar se a ausência de *epl1* causa alguma alteração fenotípica no mutante.

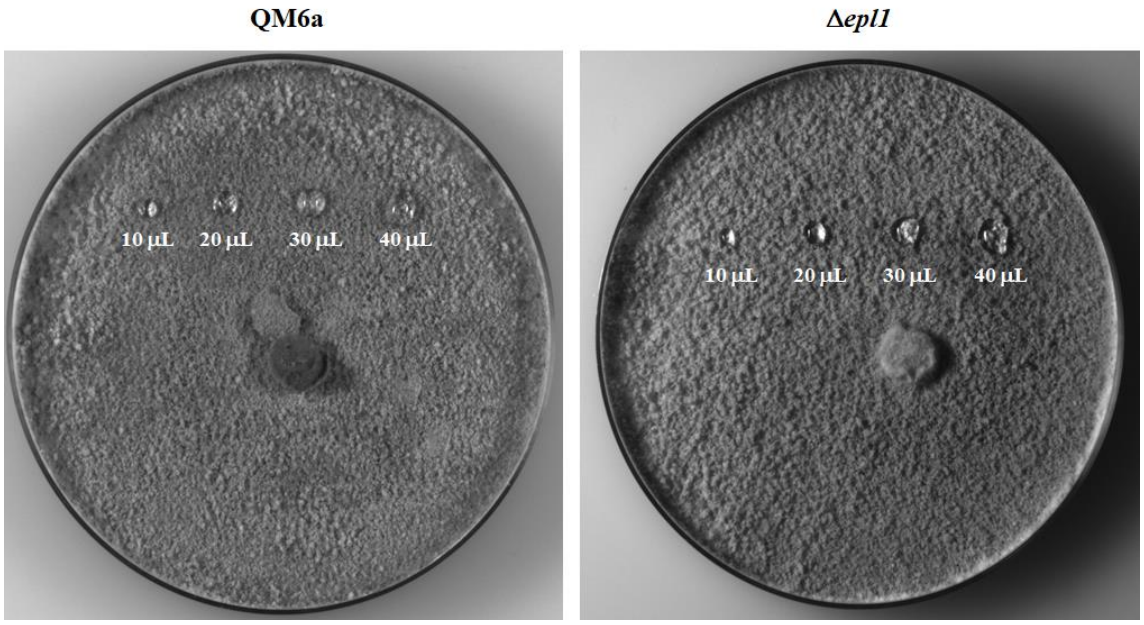

Figura 11: Teste de hidrofobicidade entre parental QM6a e mutante Δ*epl1*. As placas foram cultivadas em meio MEX até completa esporulação. Um volume de 10 µL, 20µL, 30 µL e 40 µLde água foi adicionado sobre os esporos e as placas foram mantidas a temperatura ambiente por 8 horas.

5.2- Análise da expressão gênica e atividade enzimática de celulases

A técnica de quantificação dos níveis de mRNA por PCR em tempo real foi utilizada para avaliar a expressão de alguns genes celulolíticos nas cepas QM6a e Δ*epl1*, cultivadas em triplicata por 24, 48 e 72 horas em celulose. Para essa análise foram escolhidos genes de cada grupo de celulases: *cel7a* e *cel6a* (celobiohidrolase), *cel3a* (β-glicosidase) e *cel74a* (endoglicanase). Com esse ensaio, foi verificado o aumento de *cel7a* (24 e 72 horas) e diminuição de *cel6a* (72 horas), *cel3a* (48 e 72 horas) e *cel74a* (48 horas) no mutante Δ*epl1* em relação ao controle QM6a (Figura 12).

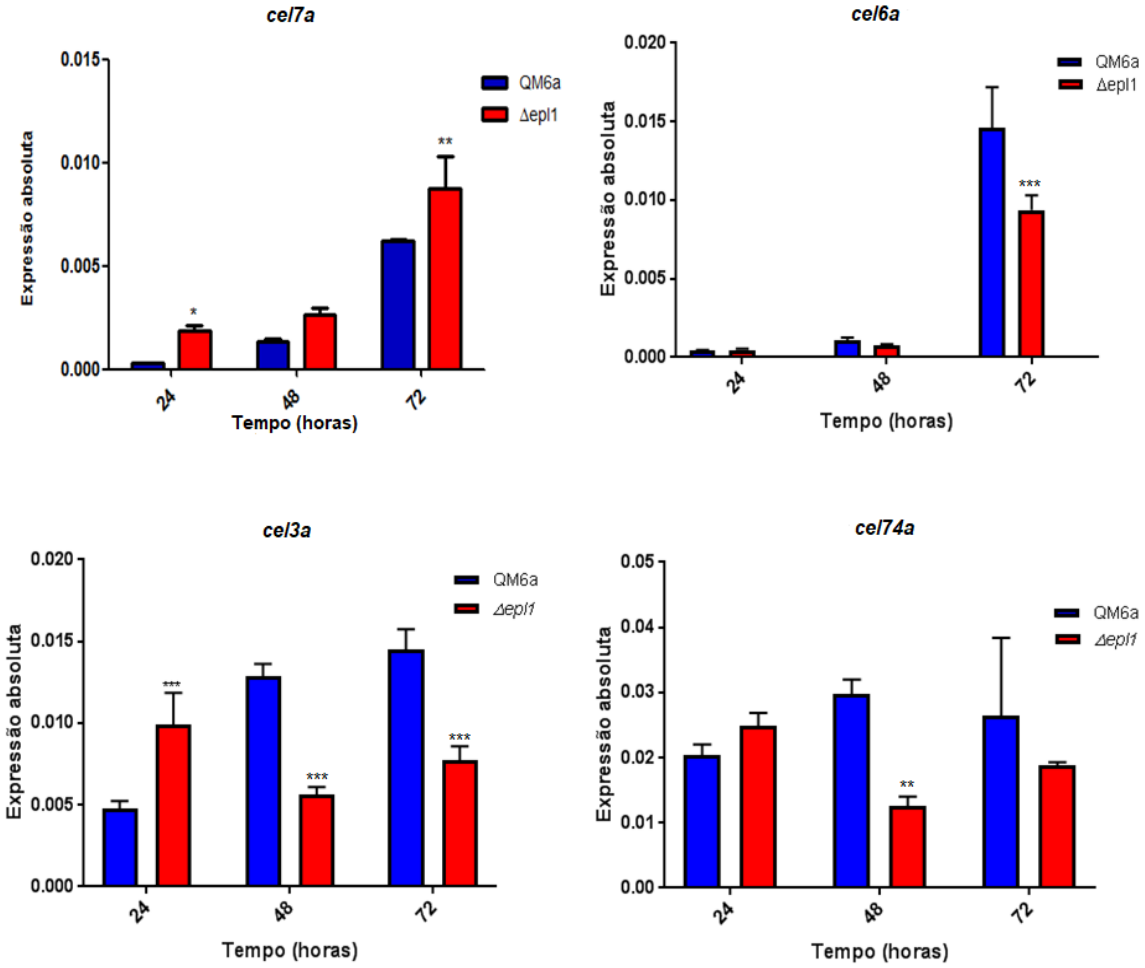

Figura 12: Expressão gênica de celulases no controle QM6a e mutante Δ*epl1* crescido em celulose por 24, 48 e 72 horas. A quantificação foi realizada pelo método de PCR em tempo real, utilizando sonda fluorescente SybrGreen. Os valores apresentados são as médias de três grupos de experimentos, com os correspondentes desvios. Para a análise estatística foi realizado o teste Two-way ANOVA, utilizando o programa *GraphPad Prism* (intervalo de confiança de 95%). Os asteriscos indicam grupos que apresentaram diferença significativa, quando comparado com o controle QM6a.

Para avaliar atividade enzimática, os sobrenadantes obtidos do cultivo em celulose das linhagens QM6a e Δ*epl1* crescidos por 24, 48 e 72 horas, foram utilizados para realizar as atividades de celibiohidrolase e β-glicosidade. Embora a expressão gênica estivesse aumentada em Δ*epl1* para *cel7a* e reduzida para *cel6a* e *cel3a* em 72 horas, as atividades enzimáticas não mostraram diferença significativa em relação ao controle (Figura 13A). Para avaliar o perfil de secreção proteica foi feito um gel SDS-PAGE com

o sobrenadante de cultivo em celulose no tempo de 72 horas. Na Figura 13B, é possível observar semelhança entre o secretoma da linhagem parental QM6a e mutante Δ*epl1*.

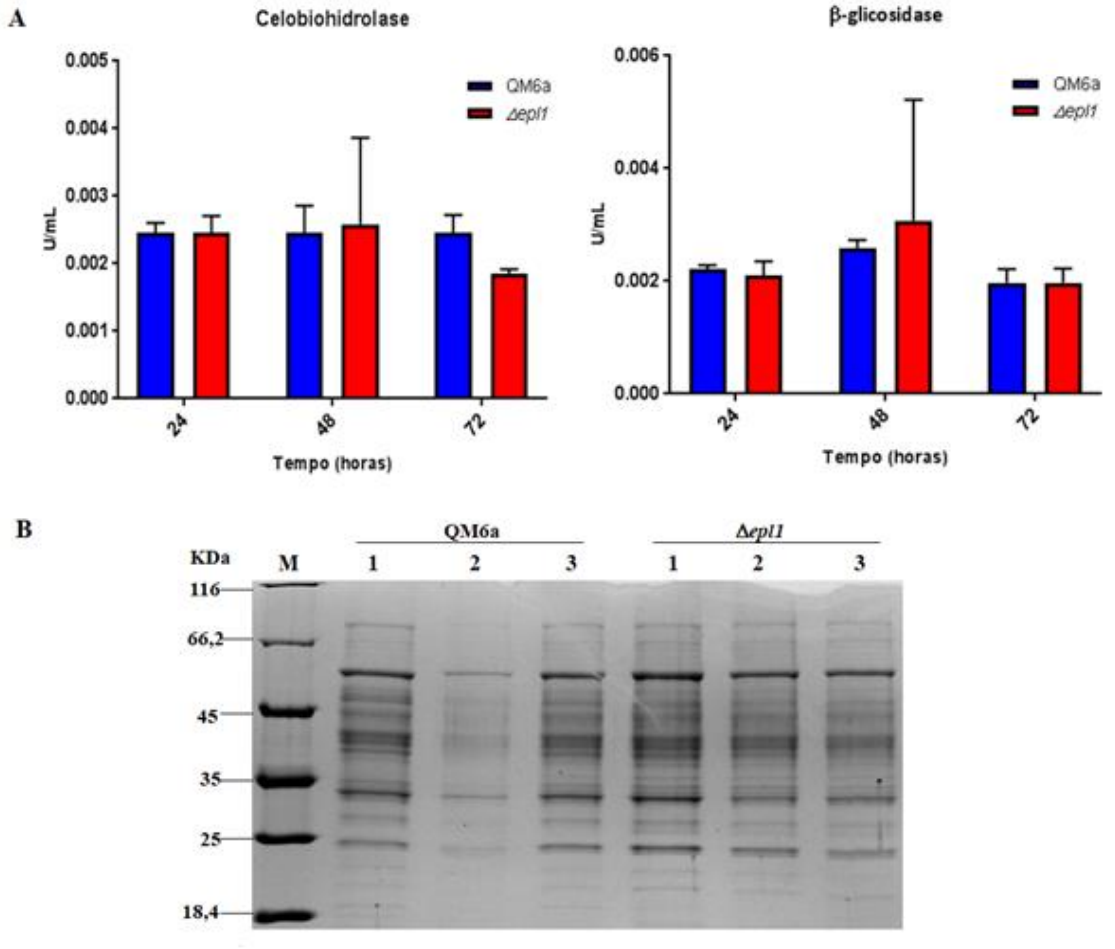

Figura 13: Atividades enzimáticas e análise do secretoma das linhagens QM6a e Δ*epl1*. A: Atividade de celobiohidrolase e β-glicosidase do sobrenadante do cultivo em celulose de QM6a (azul) e Δ*epl1* (vermelho) por 24, 48 e 72 horas, em triplicata. Para a análise estatística foi realizado o teste Two-way ANOVA, utilizando o programa *GraphPad Prism* (intervalo de confiança de 95%). B: Análise em SDS-PAGE para visualização das proteínas secretadas pela linhagem QM6a e Δ*epl1* cultivadas em celulose por 72 horas. Os géis foram corados com azul de *coomassie*. M: marcador de peso molecular padrão (em kDa).

Com o objetivo de analisar a produção de celulases e o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos, a linhagem QM6a e Δ*epl1* foram cultivadas em bagaço de cana de açúcar em um processo de FES por 24, 48 e 72 horas. A Figura 14 mostra a atividade de celobiohidrolase e β-glicosidade em duas formas de cultivo: crescimento prévio das linhagens em glicerol (Figura 14A) e o inóculo direto da solução de esporos (10^6 esporos/mL) no meio semi sólido (Figura 14B). Em ambas condições não houve diferença

na atividade de celobiohidroloase, mas é possível observar a diminuição da atividade de β-glicosidade em 72 horas de cultivo no mutante Δ*epl1* em relação ao parental QM6a nas duas condições analisadas.

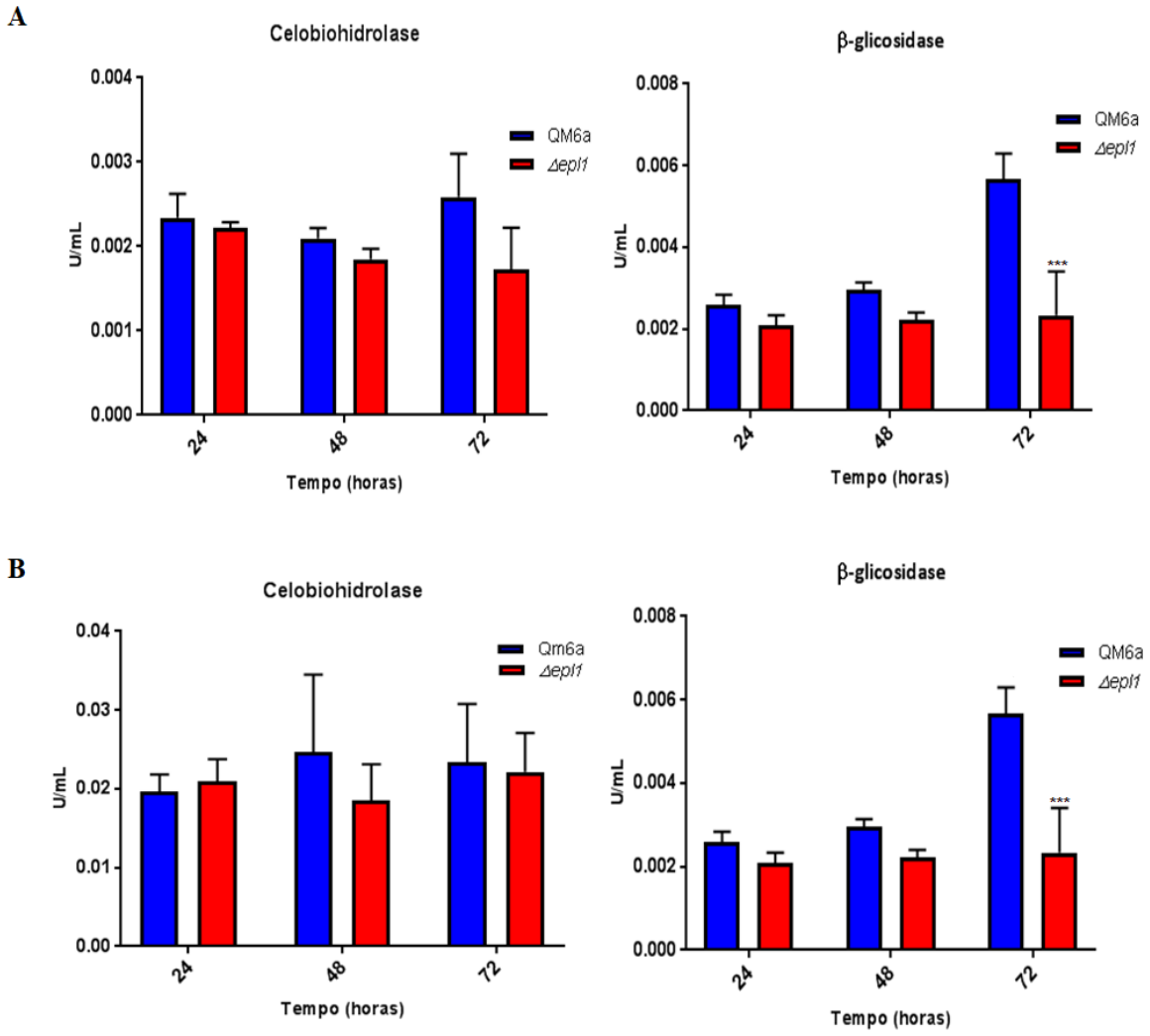

Figura 14: Dosagem enzimática do sobrenadante do cultivo em bagaço de cana de açúcar em meio semi-sólido das linhagens QM6a (azul) e Δ*epl1*(vermelho). A: Crescimento prévio das linhagens em Glicerol por 24 horas (10^6 esporos/mL) e transferência micélio para o meio semi-sólido. B: Inóculo 10^6 esporos/mL das linhagens diretamente no meio semi-sólido. O cultivo foi realizado por 24,48 e 72 horas, sem agitação e em triplicata. Para a análise estatística foi realizado o teste Two-way ANOVA, utilizando o programa *GraphPad Prism* (intervalo de confiança de 95%). Os asteriscos indicam grupos que apresentaram diferença significativa, quando comparado com o controle QM6a.

5.3- Análises de RNA-seq

5.3.1- Análise da deleção do gene *epl1* na linhagem Δ*epl1*

Os *reads* conrrespondentes as três replicatas do mutante Δ*epl1* na condição celulose foram submetidas ao programa IGV (*Integrated genome viewer*) e a expressão do gene *epl1* foi analisada. Na Figura 15 pode-se observar que as amostras de Δ*epl1* não apresentaram expressão para o gene alvo quando comparadas a linhagem parental QM6a, demonstrando que o gene *epl1* realmente está deletado na cepa mutante.

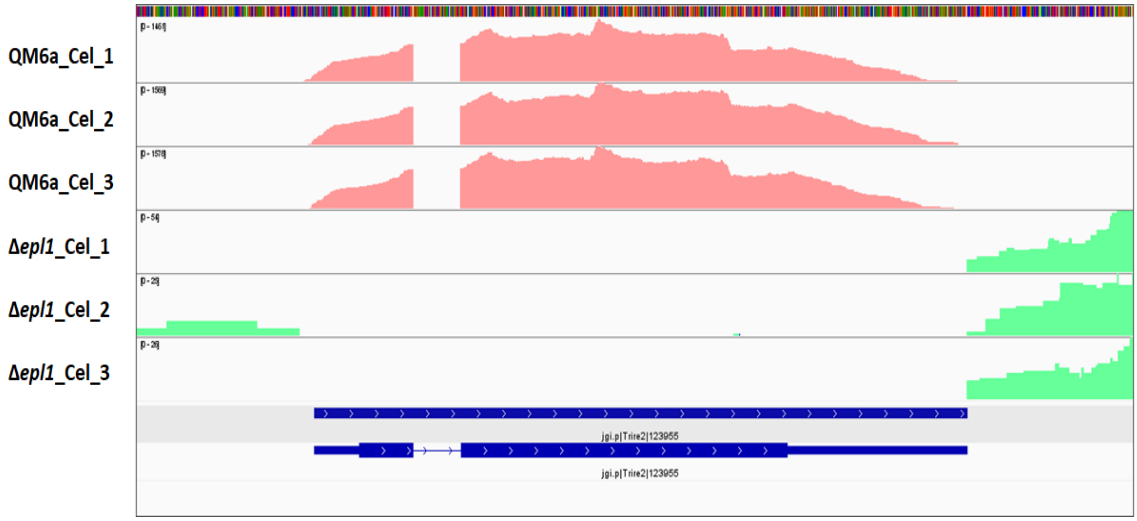

Figura 15: Expressão do gene *epl1* na linhagem parental QM6a e no mutante Δ*epl1* durante o crescimento em celulose. Em azul se encontra a região do gene *epl1*. As regiões em rosa correspondem a expressão do gene *epl1* na linhagem parental QM6a. Em verda se encontra as regiões adjacentes ao gene deletado. A ausência de expressão de *epl1* nas amostras do mutante confirma a deleção desse gene na linhagem Δ*epl1*. A análise dos dados foi realizada através do programa *Integrative Genomics Viewer*.

5.3.2- Análises dos *reads* e dos genes diferencialmente expressos.

Para avaliar o perfil de expressão dos genes de *T. reesei* da linhagem QM6a e Δ*epl1* cultivadas em triplicata em glicerol 1% (24 horas) e celulose 1% (72 horas), foi feita a análise do transcriptoma através de sequenciamento (RNA-Seq).

A preparação das bibliotecas de cDNA gerou um grande número de *reads*. Após a verificação, retirada dos adaptadores e das regiões de baixa qualidade, os *reads* foram mapeados no genoma *Trichoderma reesei* v2.0 (http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html), e foi alcançada uma porcentagem de mapeamento >98%. As amostras sequenciadas e os *reads* obtidos estão representados na Tabela 3.

Tabela 3: Número de *reads* obtidas pelo RNA-seq e porcentagem de mapeamento das bibliotecas no genoma de *T. reesei*.

Amostra	***Reads* brutas**	***Reads* mapeados**	**% *Reads* mapeadas**
QM6a Glicerol 1	14.925.755	14.633.646	98.04
QM6a Glicerol 2	14.333.019	14.109.929	98.44
QM6a Glicerol 3	15.515.433	15.291.320	98.56
Δ*epl1* Glicerol 1	16.542.757	16.309.899	98.59
Δ*epl1* Glicerol 2	14.657.347	14.463.704	98.68
Δ*epl1* Glicerol 3	15.545.576	15.310.844	98.49
QM6a Celulose 1	16.106.435	15.870.387	98.53
QM6a Celulose 2	12.982.812	12.778.157	98.42
QM6a Celulose 3	13.774.576	13.587.729	98.64
Δ*epl1* Celulose 1	12.829.839	12.643.452	98.55
Δ*epl1* Celulose 2	12.761.500	12.572.948	98.52
Δ*epl1* Celulose 3	14.061.109	13.861.279	98.58

Para avaliar a variação entre as condições glicerol e celulose e suas réplicas, foi realizada a análise dos componentes principais (PCA - *Principal Component Analysis*). Na figura 16, é possível observar a formação de quatro diferentes grupos: QM6a glicerol (rosa), QM6a celulose (verde), Δ*epl1* glicerol (azul) e Δ*epl1* celulose (lilás). Essa distinção entre as categorias garante a qualidade e confiabilidade nas análises seguintes.

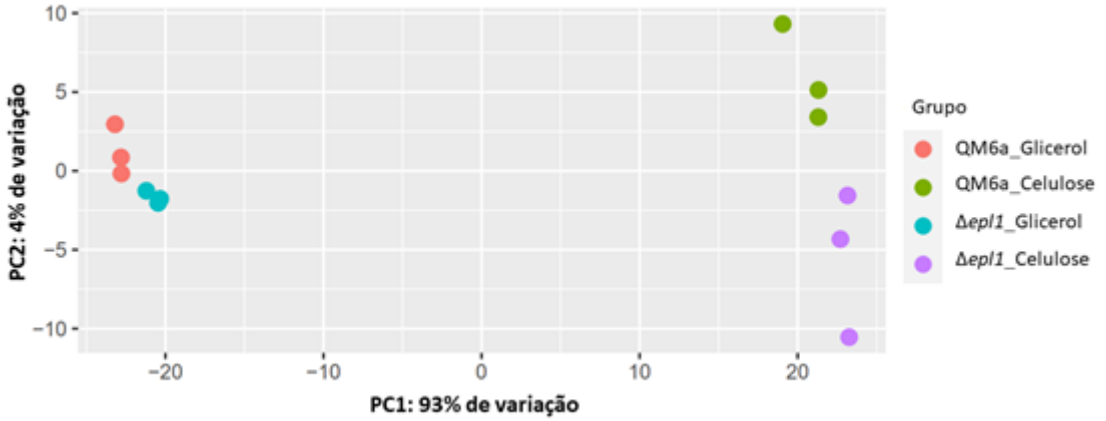

Figura 16. Análise de componentes principais (PCA) plot de cada uma das condições analisadas. Em rosa: QM6a glicerol; verde: QM6a celulose; azul: Δ*epl1* Glicerol; lilás: Δ*epl1* celulose.

A partir dos dados tratados, os perfis de expressão gênica foram calculados utilizando o pacote DESeq 2. A análise da expressão diferencial encontrou 2.338 genes diferencialmente expressos em QM6a Celulose em relação à QM6a Glicerol, 2.074 gens em Δ*epl1* Celulose em relação à Δ*epl1* Glicerol, 179 em Δ*epl1* Celulose em relação à QM6a Celulose e 110 Δ*epl1* Glicerol em relação à QM6a Glicerol, considerando um p-valor <0,05 como limiar (Figura 17).

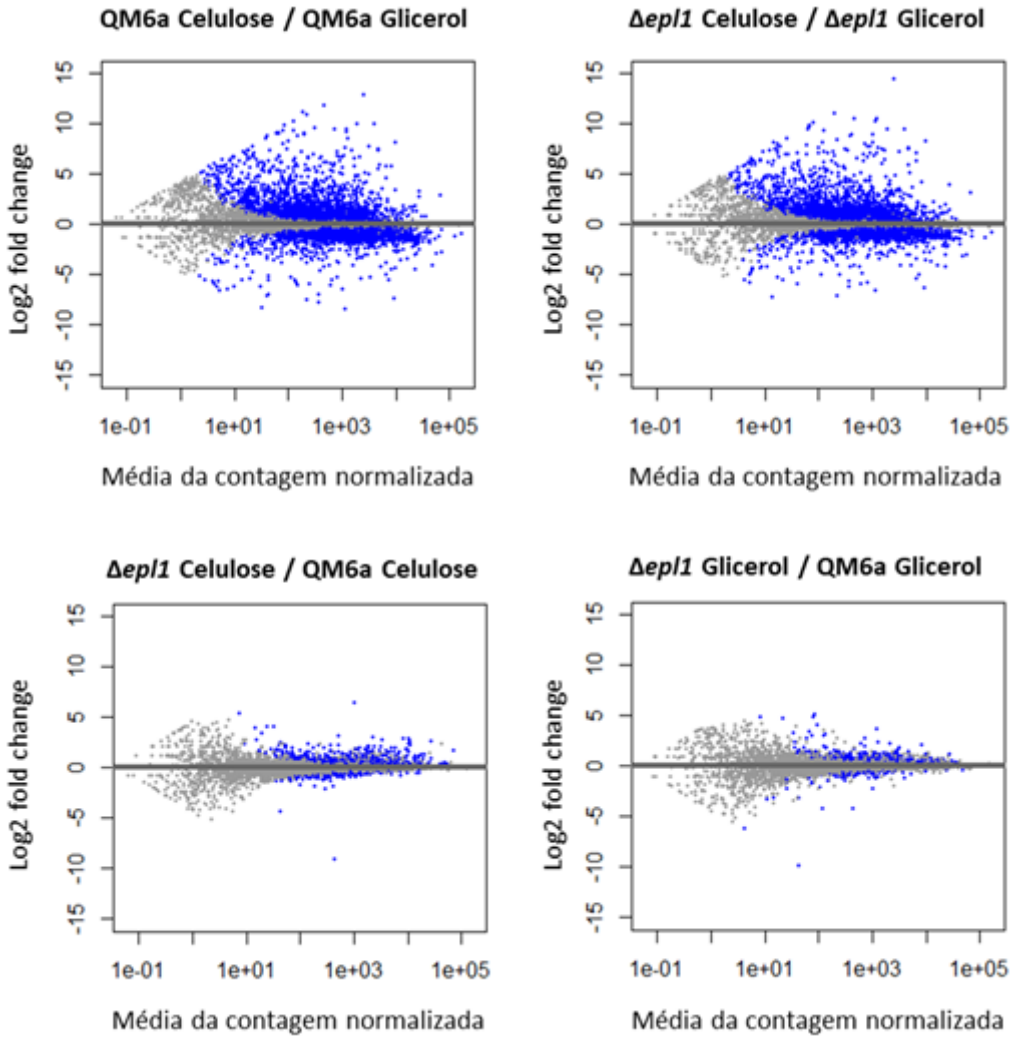

Figura 17: MA plot dos genes de *T. reesei* linhagem QM6a e Δ*epl1* expressos em glicerol e celulose. Os genes que exibiram expressão diferencial foram identificados pelo pacote DESeq e estão representados em azul.

Para eliminar do genoma total os genes que exibiram maior variância, um filtro estatístico foi utilizado e os genes foram considerados *up* ou *down* regulados quando apresentaram log2 do *fold change* ≥1 e ≤-1, respectivamente (p-valor <0,05). Essa análise corresponde a um aumento ou diminuição de pelo menos duas vezes do nível de expressão e foi realizada comparando o mutante Δ*epl1* e selvagem QM6a em celulose (Figura 18). A análise foi feita em relação aos 9.143 genes anotados no genoma de *T. reesei* e demonstrou que 760 genes foram diferencialmente expressos, sendo 260 exclusivos para QM6a, 214 exclusivos para Δ*epl1* e 286 compartilhado entre eles (Figura 18A). Para os genes diferencialmente expressos exclusivos em cada linhagem, 166 (QM6a) e 177

(Δ*epl1*) estão regulados positivamente, e, 94 e 37 estão regulados negativamente em QM6a e Δ*epl1*, respectivamente. Já para os genes diferencialmente expressos compartilhados em QM6a e Δ*epl1*, 252 estão *up* regulados e 33 estão *down* regulados (Figura 18B).

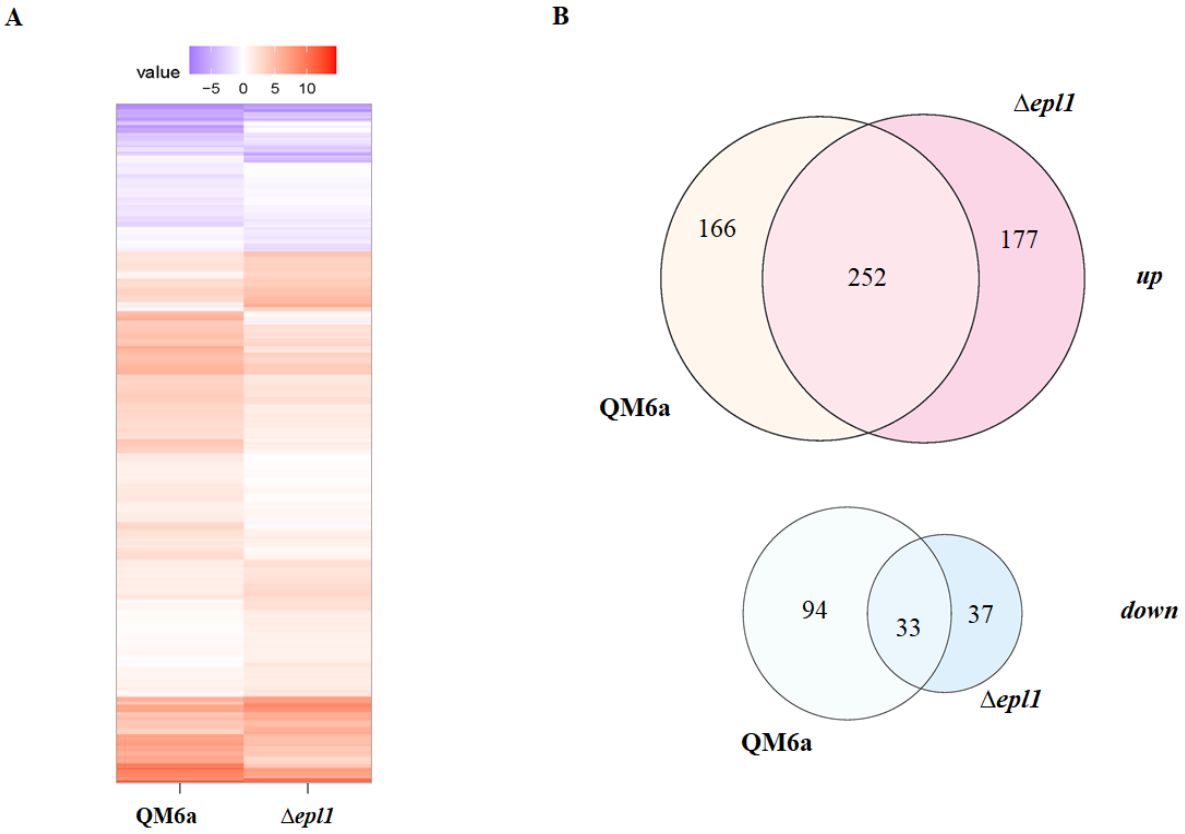

Figura 18: Perfil de expressão gênica da linhagem QM6a e Δ*epl1* durante o crescimento em celulose por 72 horas. A: *Heatmap* dos 760 genes diferencialmente expressos. A escala de expressão está representada na forma de log2 do *fold change*. B: Diagrama de Venn para os genes up e down regulados no selvagem QM6a e mutante Δ*epl1* (p-valor<0,05).

O gene ID 105718 , descrito na base de dados KOG como um fator de transcrição do tipo *T-box*, foi o único que demonstrou estar *up* regulado no mutante Δ*epl1* e *down* regulado no parental QM6a.

5.3.3- Enriquecimento dos transcritos *up* e *down* regulados baseado em *Gene Ontology*.

Os genes *up* e *down* regulados nas linhagens QM6a e Δ*epl1* foram categorizados utilizando os termos de *Gene Ontology* (GO). Para verificar os processos biológicos (Figura 19), funções moleculares (Figura 20) e componentes celulares (Figura 21) envolvidos no cultivo em celulose foi feita a análise de agrupamento hierárquico em árvore. A relação completa de todas as categorias e seus respectivos genes está retratada na Tabela 9 e 10 (Anexo 1).

Os processos biológicos regulados positivamente que se mostraram mais enriquecidos para QM6a foram "processo metabólico de componentes glicosil" e "regulação do processo biossintético de RNA". Já para Δ*epl1*, os processos biológicos regulados positivamente foram "transporte de ácido orgânico", "resposta ao estresse oxidativo" e "processo reprodutivo". Apenas "clivagem de RNA mensageiro" se mostrou regulado negativamente em Δ*epl1* (Figura 19A). Para ambas linhagens, os processos biológicos regulados positivamente que se apresentaram mais enriquecidos incluem "processo metabólico contendo glucosamina", "processo metabólico de amino açúcar", "resposta ao estresse oxidativo" e "processo catabólico lipídico" (Figura 19B).

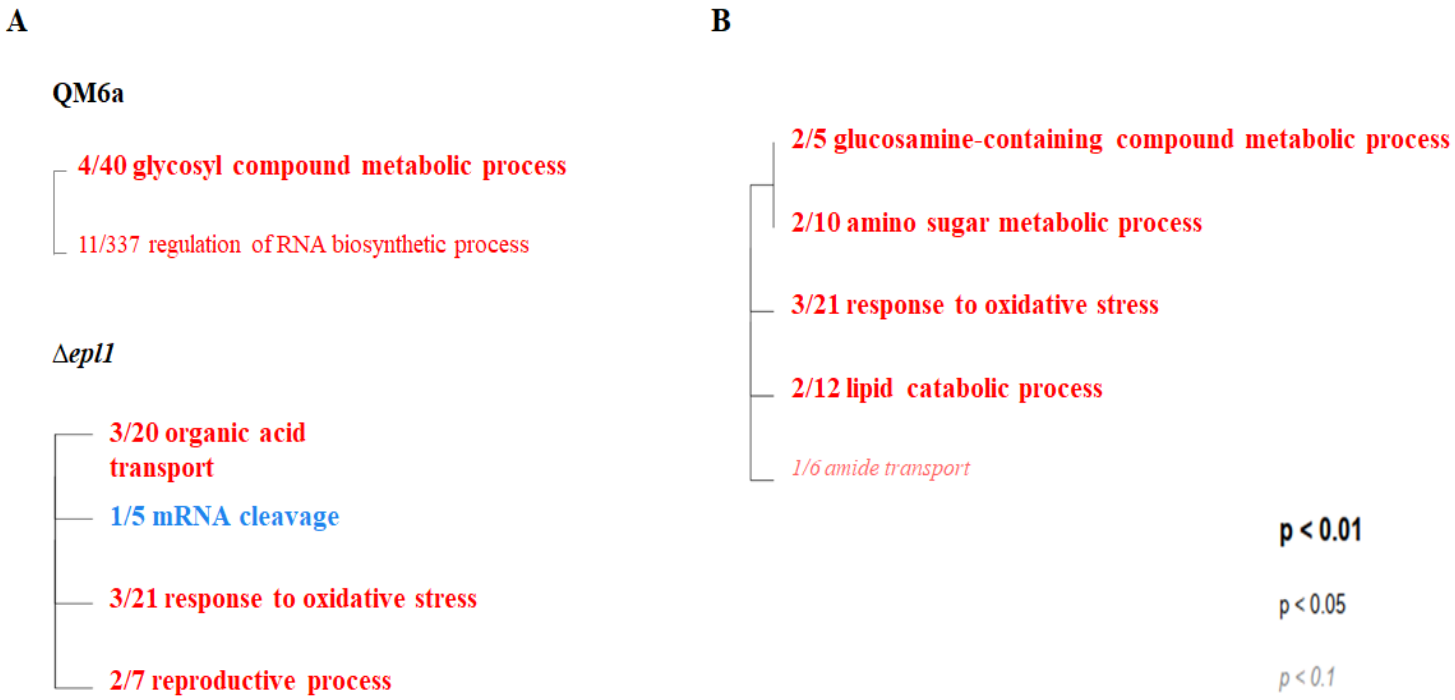

Figura 19: Processos biológicos envolvidos no cultivo de *T. reesei* em celulose. A: Processos exclusivos em QM6a e Δ*epl1*. B: Processos biológicos compartilhados entre QM6a e Δ*epl1*. Em vermelho estão representados os processos regulados positivamente e em azul os processos regulados negativamente. As

frações anteriores as categorias indicam o número de genes regulados em relação ao número total de genes de *T. reesei*. A árvore representa a relação entre os termos. O tamanho da fonte indica a significância estatística (p-valor).

Para QM6a, a função molecular dos genes regulados positivamente mais enriquecida foi "atividade reguladora da transcrição". Já para os genes regulados negativamente, as funções foram: atividade de fosfotransferase e atividade de desidrogenase. Para Δ*epl1* as funções moleculares dos genes *up* regulados foram: atividade oxidorredutase, atividade da catalase, atividade antioxidante, transporte, ligação de polissacarídeo e ligação de carboidratos (Figura 20A). A função glucosidase se apresentou em ambas linhagens, além da função catalase e oxidorredutase (Figura 20B).

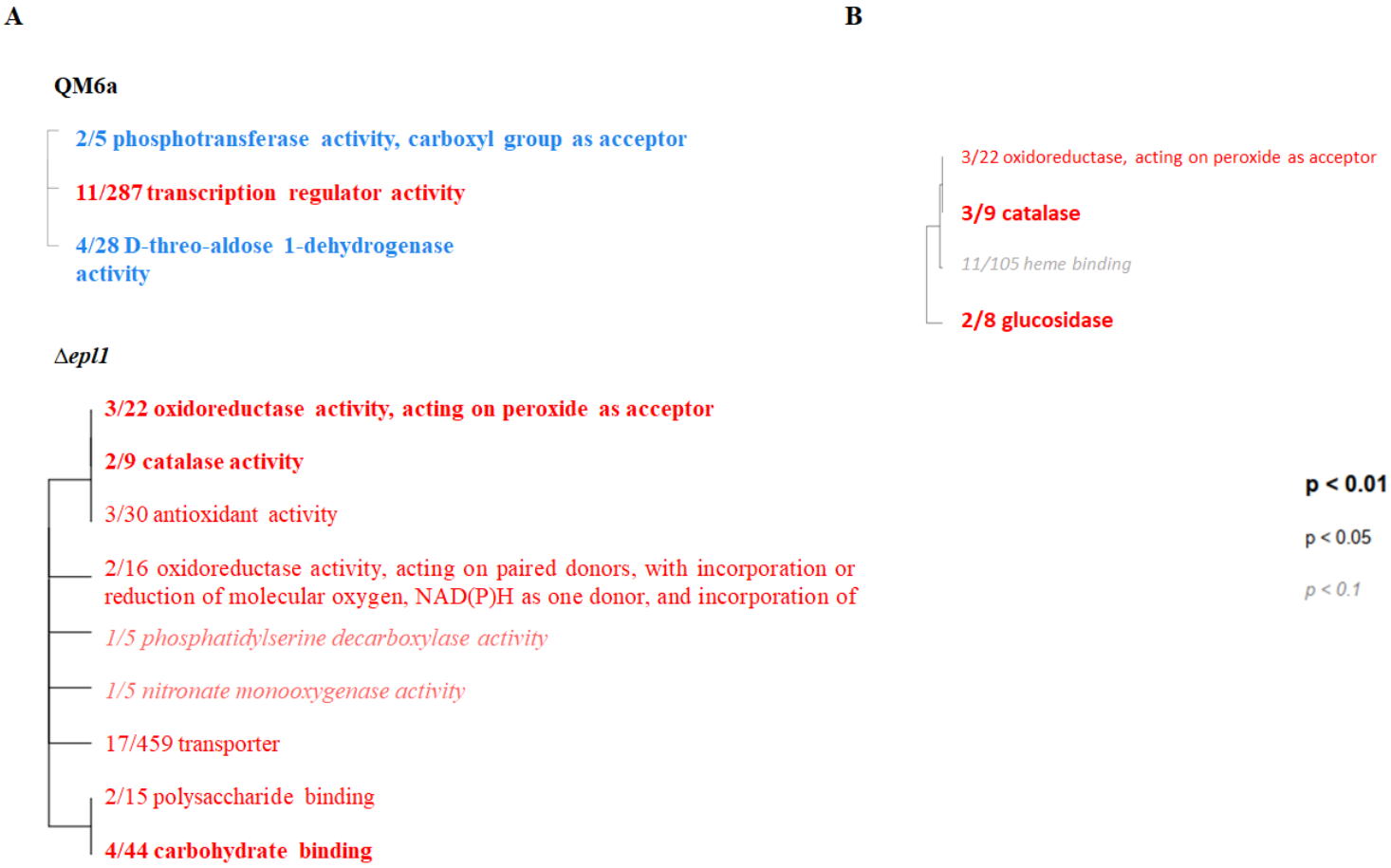

Figura 20: Funções moleculares envolvidas no cultivo de *T. reesei* em celulose. A: Funções exclusivas em QM6a e Δ*epl1*. B: Funções compartilhados entre QM6a e Δ*epl1*. Em vermelho estão representadas as funções reguladas positivamente, e em azul, as reguladas negativamente. As frações anteriores as categorias indicam o número de genes regulados em relação ao número total de genes de *T. reesei*. A árvore representa a relação entre os termos. O tamanho da fonte indica a significância estatística (p-valor).

Os componentes celulares ocupados pelos genes mais positivamente regulados foram: complexo associado a microtúbulos e complexo DASH em QM6a, e região extrecelular em Δ*epl1*. Já para os genes mais regulados negativamente foram, principalmente, complexos envolvendo ribonucleases em Δ*epl1* (Figura 21A). O componente celular citoplasma se apresentou positivamente regulado em ambas linhagens (Figura 21B).

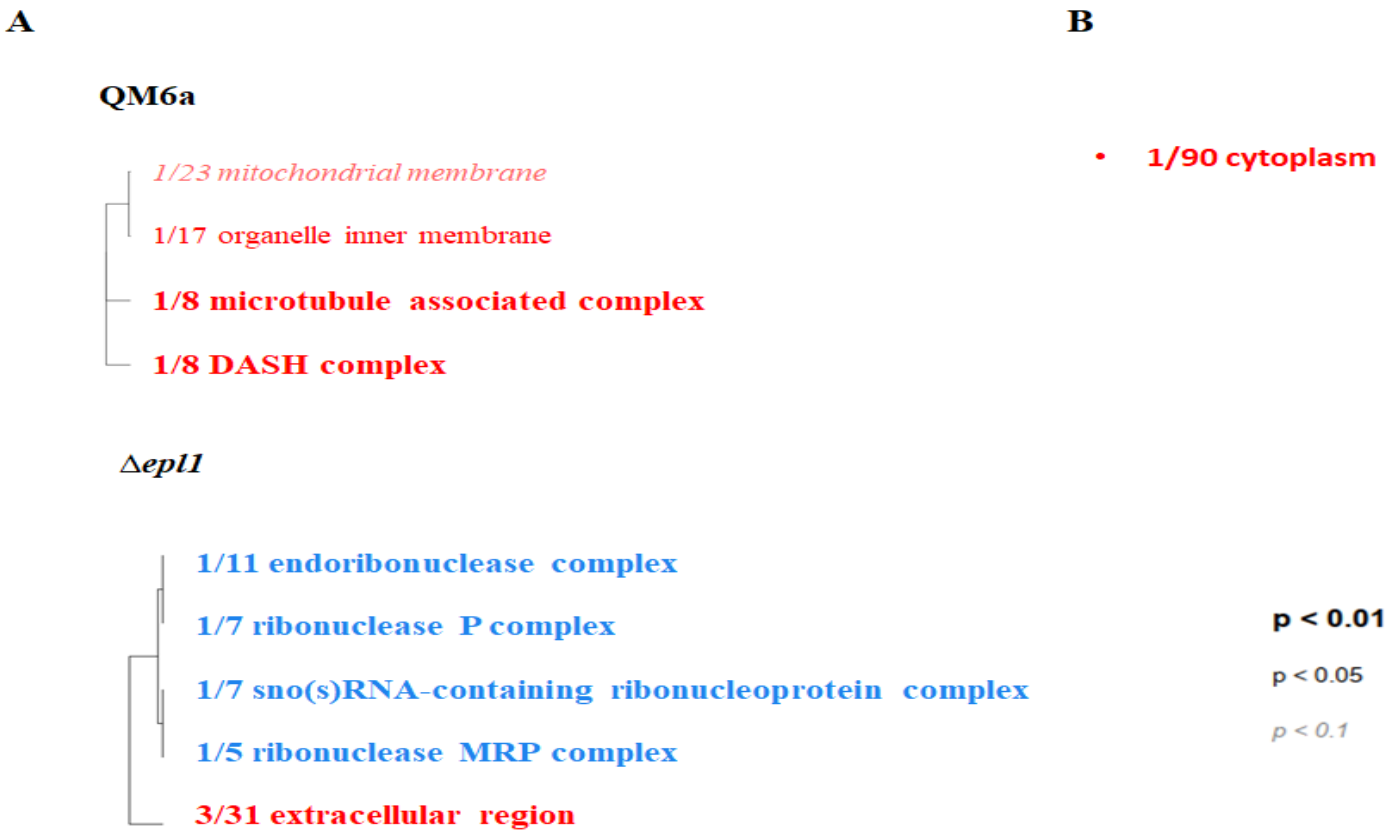

Figura 21: Compartimentos celulares envolvidos no cultivo de *T. reesei* em celulose. A: compartimentos exclusivos em QM6a e Δ*epl1*. B: Componentes compartilhados entre QM6a e Δ*epl1*. Em vermelho estão representadas as funções reguladas positivamente, e em azul, as reguladas negativamente. As frações anteriores as categorias indicam o número de genes regulados em relação ao número total de genes de *T. reesei*. A árvore representa a relação entre os termos. O tamanho da fonte indica a significância estatística (p-valor).

5.3.4- Reconstrução vias metabólicas

Os genes diferencialmente expressos foram utilizados para a análise de reconstrução de vias metabólicas através de dados KEGG (BlastKOALA). As vias metabólicas estão demonstradas em mais detalhes nas Figuras 24, 25 e 26 (Anexo 2). Dos 286 genes compartilhados diferencialmente expressos entre QM6a e Δ*epl1*, 48 foram anotados (16,8%), sendo que as principais categorias funcionais enriquecidas indicaram principalmente metabolismo de carboidratos e famílias de proteínas de sinalização e processos celulares (Figura 22).

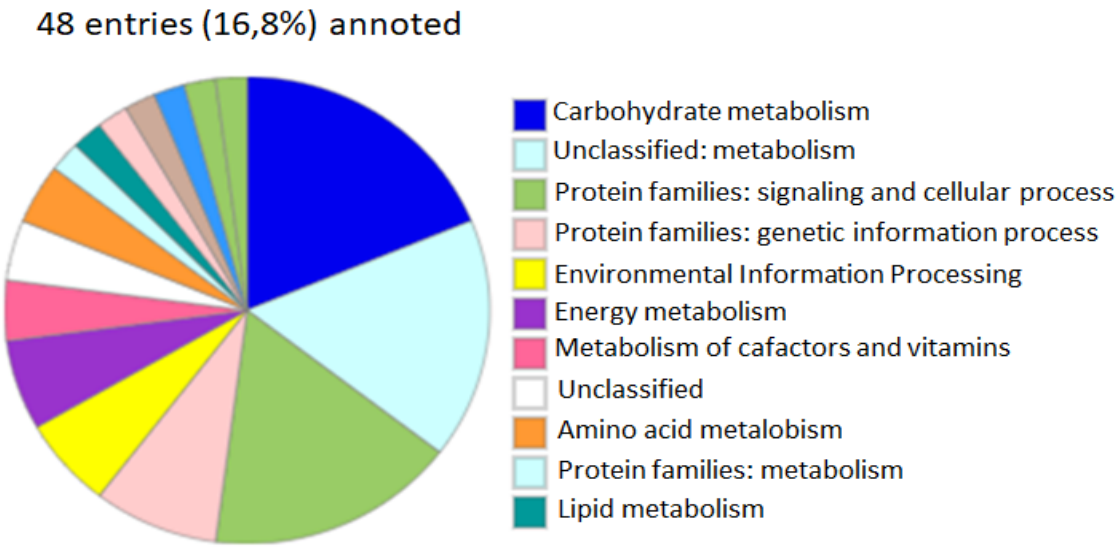

Figura 22: Reconstrução de vias metabólicas simultâneas em QM6a e Δ*epl1*. Categorias funcionais dos genes diferencialmente expressos.

Para os 260 genes diferencialmente expressos exclusivamente em QM6a, 51 foram anotados (19,6%). Desses, 19 estão *up* regulados (11,45%) e 32 estão *down* regulados (34%). As principais categorias funcionais para os genes regulados positivamente são: metabolismo de carboidratos, sinalização e processos celulares e processos de informação genética. Para os genes regulados negativamente, as principais categorias funcionais são: metabolismo de carboidratos, sinalização e processos celulares (Figura 23A). Já para os 214 genes exclusivos em Δ*epl1*, 28 foram anotados (13,1%). Desses, 24 estão *up* regulados (13,6%) e 4 estão *down* regulados (10,8%), sendo as principais categorias funcionais: sinalização e processos celulares, metabolismo

energético e metabolismo de carboidratos para genes regulados positivamente e, para os genes regulados negativamente, as categorias são: sinalização e processos celulares, metabolismo energético, metabolismo e biossíntese de glicanos e processamento de informação genética (Figura 23B).

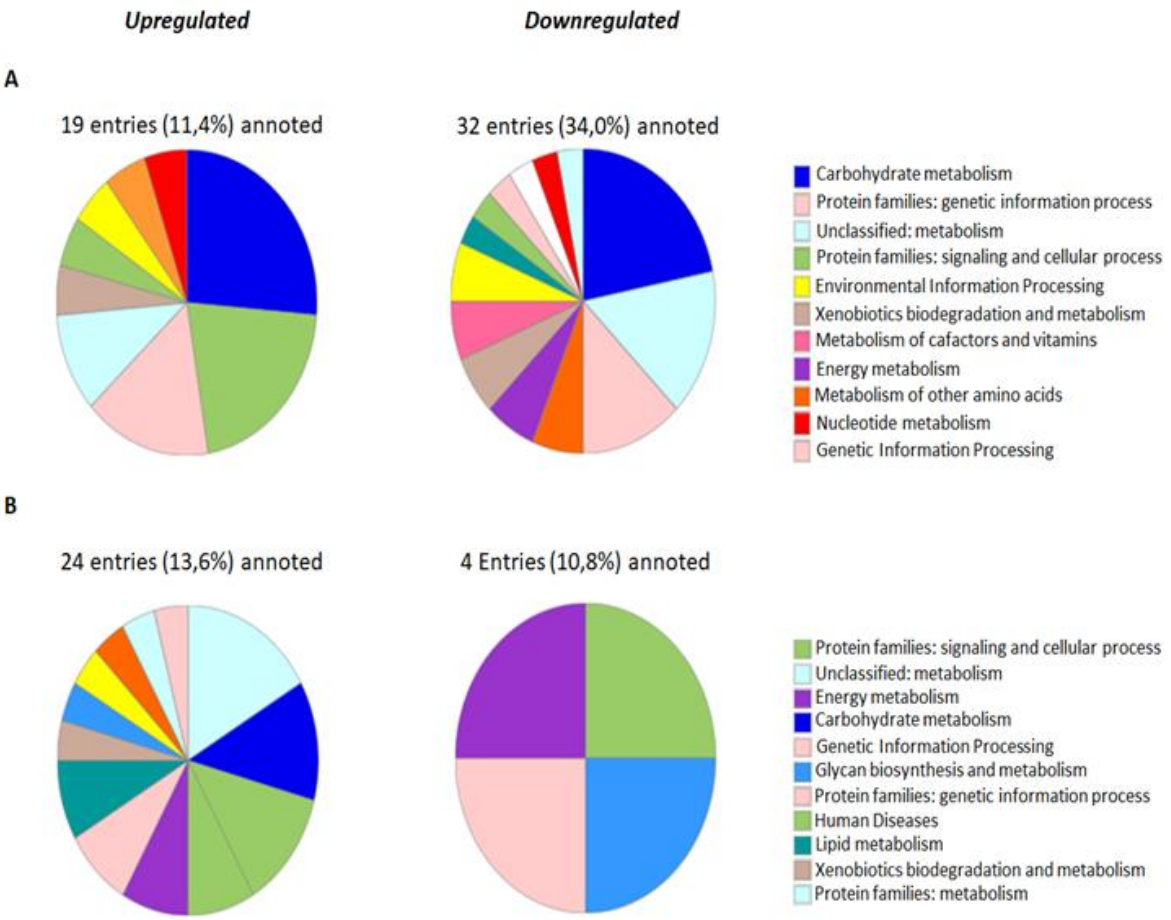

Figura 23: Reconstrução de vias metabólicas exclusivas de cada linhagem. Categorias funcionais reguladas positivamente e negativamente para genes diferencialmente expressos exclusivamente em QM6a (A) e Δ*epl1* (B).

5.3.5- Principais genes *up* e *down* regulados no mutante Δ*epl1* na condição celulose.

Os dez principais genes regulados positivamente e negativamente no mutante Δ*epl1* estão representados na Tabela 4.

O gene que apresenta maior regulação positiva pertence a família de proteínas glicose-metanol-colina oxidorredutase, conhecidas por apresentarem um domínio de

ligação a FAD e um domínio de ligação ao substrato, que podem ser diversos açucares, álcoois, colesterol e colina (Sützl et al., 2019). Entre os genes *up* regulados também se encontra uma epimerase/desidratase dependente de NAD, um transportador de fosfato, um facilitador maior da superfamília MSF e uma catalase.

Já o gene mais *down* regulado é uma Acil-CoA ligase de ácido graxo de cadeia longa, envolvido no metabolismo de lipídeos. Essa enzima é responsável pela formação de Acil-Coa, permitindo que os ácidos graxos entrem na via de β-oxidação (Reiser et al., 2010). Os outros genes regulados negativamente são: oxidorredutase dependente de NADP, metiltransferase, hidrolase, transportador ABC e glicosil transferases.

Tabela 4: Descrição dos 10 genes mais *up* e *down* regulados em Δ*epl1* na condição celulose. O *fold change* está em log_2 (p-valor ajustado < 0,05).

Proteína ID	**Descrição**	***Fold change***	**p-valor**
80659	Glucose-methanol-choline oxidoreductase	14,56	3,9262E-30
105808	NA	11,08	3,9847E-19
123726	Candidate β-1,3-1,4-glucanase	10,54	7,7847E-54
111890	Phosphate transporter	10,26	5,9438E-24
70972	MFS transporte	10,14	1,0183E-15
111716	NAD-dependent epimerase/dehydratase	9,95	6,0035E-15
121785	NA	9,02	7,2384E-91
112147	NA	8,94	2,0014E-46
58472	Catalase	8,90	9,4420E-46
109146	NA	8,55	6,2582E-11
66999	AMP-binding enzyme	-7,23	3,5562E-07
65067	NADP-dependent oxidoreductase	-5,74	0,0010
105242	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase	-5,51	0,0031
76682	ABC-transporter	-5,21	0,00
105220	Mycotoxin biosynthesis protein UstYa-like	-4,48	0,0092
105488	NA	-4,25	0,0017
70500	NA	-4,24	0,0042
70838	NA	-4,19	0,0004
3914	Glycosyl transferase CAP10 domain	-4,12	0,0013
32027	α/β hydrolase fold	-3,60	0,0156

5.3.6- CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes)

As CAZys são formadas por enzimas que possuem a capacidade de degradar ou construir carboidratos complexos. Em *T. reesei* há 201 genes de glicosil hodrolases (GH),

22 de carboidrato esterases (CE) e 5 de polissacarídeo liases (Häkkinen et al., 2012). A partir desses dados, foram selecionados genes pertencentes ao CAZy que são diferencialmente expressos em Δ*epl1* em celulose (Tabela 5). Dos 13 genes *up* regulados, 11 pertencem a família de glicosil hidrolases e dois pertencem a família de carboidrato esterase. Dentre eles, se destacam enzimas relacionadas a degradação de açucares presentes na parece celular, como candidatos β-1,3-1,4-glucanase, N-acetil-glicosamina, N-acetylglucosaminidases e glicasidases. Além disso, a polissacarídeo monooxigenase Cel61a (ID 73643) e a xilanase 2 (ID 123818) também estão reguladas positivamente em Δ*epl1*. Apenas o gene que codifica uma fucosidase (ID 72488) se encontra regulado negativamente no mutante.

Tabela 5: Proteínas do CAZy *up* e *down* reguladas no mutante Δ*epl1* em relação ao QM6a em celulose. *O fold change* está em log2 (p-valor <0,05).

Proteína ID	**Classe**	**Família**	**Anotação**	***Fold Change***	**p-valor**
123726	Glycosyde hydrolase	16	Candidate β-1,3-1,4-glucanase	10,54	7,7847E-54
123639	Glycosyde hydrolase	64	Candidate β-1,3-glucanase	8,16	1,1093E-08
123818	Glycosyde hydrolase	11	Xylanase 2	5,98	0,0019
73643	Glycosyde hydrolase	61	Endoglucanase	5,81	0,0142
69700	Glycosyde hydrolase	89	α-N-acetylglucosaminidases	3,97	0,002498
71532	Glycosyde hydrolase	71	Glucan endo-1,3-α-glucosidase	3,67	4,4209E-108
60635	Glycosyde hydrolase	92	Candidate α−1,2-mannosidase	2,98	0,002006
79671	Carbohydrate Esterase	9	Candidate N-acetyl-glucosamine-6-phosphate deacetylase	2,89	8,1418E-42
108672	Glycosyde hydrolase	71	Candidate α-1,3-glucanase	278	0,0088
72072	Carbohydrate Esterase	1	Candidate esterase	2,02	0,0101
54242	Glycosyde hydrolase	55	Candidate β−1,3-glucanase	1,80	1,7101E-06
4221	Glycosyde hydrolase	88	Six-hairpin glycosidase-like superfamily	1,41	0,04991
25224	Glycosyde hydrolase	65	Candidate α,α-trehalase	1,15	0,0210
72488	Glycosyde hydrolase	95	α-L-fucosidase	-1,76	0,0216

5.3.7 – Fatores de transcrição

Fatores de transcrição são proteínas que estão envolvidas em diversos processos metabólicos necessários no meio extracelular. Durante a degradação de açucares complexos, essas proteínas regulatórias controlam a expressão de enzimas celulolíticas, transportadores e outras biomoléculas.

Em Δ*epl1*, dois fatores de transcrição estão regulados positivamente (Tabela 6). O gene que apresentou *maior fold change* foi identificado como Fator de transcrição T-box (TBX2) (ID105718), segundo a base de dados KOG. A família T-box é caracterizada por um domínio altamente conservado e estudos demonstraram que esses genes foram perdidos nos fungos pertencentes ao sub-reino Dycaria (Sebé-Pedrós & Ruiz-Trillo, 2017). O segundo fator de transcrição *up* regulado é um *zinc finger* do tipo Cys6 (Zn2Cys6) (ID110689). Esses fatores de transcrição são encontrados exclusivamente em fungos e caracterizados por um domínio de ligação as DNA contém seis resíduos de cisteína ligados a dois átomos de zinco. Nenhum fator de transcrição apresentou regulação negativa no mutante Δ*epl1*.

Tabela 6: Fatores de transcrição *up* reguladas no mutante Δ*epl1* em relação ao QM6a em celulose. *O fold change* está em log2 (p-valor < 0,05).

Proteína ID	**KOG**	**Descrição**	***Fold change***	**p-valor**
105718	TBX2 and related T-box transcription factors	NA	3,93	0,0226
110689	NA	Zn2Cys6 transcriptional regulator	1,25	0,0022

5.3.8- Sinalização celular

A transmissão de informação e a comunicação entre as células ocorre através do processo de sinalização celular. De forma geral, um estímulo externo é identificado por um receptor responsável por transmitir a informação através de uma cascata de sinalização, levando a efetores celulares que geram a ação. Na presença de celulose, várias proteínas sinalizam e induzem a expressão de genes celulolíticos.

Dentre as proteínas envolvidas nos processos de sinalização celular em *T. reseei*, onze estavam diferencialmente expressas no mutante Δ*epl1* em relação ao parental QM6a (Tabela 7). Três genes apresentaram regulação negativa, sendo uma proteína fosfatase (ID 124001), uma proteína serina/treonina quiase (ID 110773) e um ativador transcricional (ID 53956). Dentre os genes regulados positivamente foram identificadas proteínas de ligação a carboidratos, como uma lectina do tipo C (ID 73103) e uma proteína com domínio GLEYA (ID 72379). Esse domínio é encontrado em adesinas fúngicas, e se assemelha a lectinas de *S. cerevisiae* (Linder & Gustafsson, 2008). Também foi

encontrado um canal iônico sódio/cálcio (NCX - *sodium/calcium exchanger*) (ID 4171), um receptor de lipoproteína de baixa densidade (ID 124177) e uma proteína serina/treonina quiase (ID 61703). Por último, foi identificado uma proteína com domínio DEP (ID 54395), envolvida nas vias de sinalização desencadeadas por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Esse domínio tem se mostrado importante para o reconhecimento específico de GPCRs, uma vez que sinalização por proteína G desempenha funções universais em eucariotos.

A sinalização desencadeada por proteína G é uma das mais estudas, uma vez que os sinais gerados desencadeam uma série de respostas celulares. De forma geral, os GPCRs recebem um estímulo que ativa proteína G, que ativa adenilato ciclase, formando AMP cíclico (cAMP) ou ativando fosfolipasa C (PLC). PLC catalisa a produção dos segundos mensageiros diacilglicerol e o inositol-1,4,5-trifosfato (IP3). IP3 aumenta a concentração de Ca_2^+ no citosol e, em conjunto com diacilglicerol, ativam a proteína quinase C (PKC). PKC fosforila diversas proteínas, inclusive as que estão envolvidas na regulação gênica (Nelson e Cox, 2011).

Tabela 7: Proteínas envolvidas nos processos de sinalização celular *up* e *down* reguladas no mutante Δ*epl1* em relação ao QM6a em celulose. *O fold change* está em log2 (p-valor < 0,05).

Proteína ID	KOG	Descrição	*Fold change*	p-valor
72379	Fibrillins and related proteins containing Ca_2^+ binding EGF-like	GLEYA adhesin domain	7,18	0,00
124002	Oligopeptide transporter	Sexual differentiation process protein ISP4	3,93	2,0970E-37
73103	C-type lectin	NA	2,58	0,0025
4171	K^+ dependent Ca_2^+/Na^+ exchanger NCKX1 and related proteins	Sodium/calcium exchanger membrane region	2,48	0,0009
124177	Low-density lipoprotein receptors containing Ca_2^+ binding EGF-like domains	NA	2,25	0,00
54395	G protein signaling regulators	DEP domain	1,42	5,6293E-08
61703	Serine/threonine protein kinase	Serine/threonine-protein kinase	1,18	0,0008
81609	K^+-channel ERG and related proteins	PAS domain superfamily	1,02	0,0156
124001	Protein phosphatase 2C/pyruvate dehydrogenase (lipoamide) phosphatase	Protein phosphatase 2C family	-2,85	6,1266E-41
110773	NA	Serine/threonine protein kinase	-1,66	0,0182
53956	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase	Transcriptional activator	-1,02	0,00

5.3.9- Transportadores

No genoma de *T. reesei* cerca de 5% dos genes correspondem a proteínas relacionadas ao transporte. Sabendo da importância do deslocamento de solutos através das membranas celulares para o desenvolvimento do fungo, foi feita a seleção das proteínas relacionadas ao transporte durante o crescimento em celulose. Essa análise demonstrou que 31 transportadores estão regulados positivamente e dois estão regulados negativamento no mutante Δ*epl1*. A maioria dos transportadores *up* regulados pertencem as MFS (*Major Facilitator Superfamily*), composta por 17 proteínas. Dentre elas, foram identificados transportadores de vesículas sinápticas (ID78585; ID70972; ID54972; ID123473; ID 102953; ID 70108) e transportadores de açúcares (ID26160; ID80091; ID3405). Também foram encontrados transportadores de aminoácidos (ID82014; ID121486; ID5787; ID 57015; ID 109122; ID 62172), canal de ânion dependente de voltagem (ID2076), transportador de fosfato (ID111890), proteína de efluxo de cátions (ID103712), transportador de acetato (ID60810), transportador de oligopeptídeo (ID124002) e uma aquoporina (ID82321).

Já os transportadores que se encontram regulados negativamente são: um transportador ABC (ID 76682) e um transportador de cátions divalentes (ID 122242). A relação completa dos transportadores diferencialmente expressos no mutante Δ*epl1* está representada na Tabela 8.

Tabela 8: Proteínas envolvidas no transporte *up* e *down* reguladas no mutante Δ*epl1* em relação ao QM6a em celulose. O *fold change* está em log2 (p-valor <0,05).

Proteína ID	KOG	Descrição	*Fold change*	p-valor
111890	Na^+/P_i symporter	Phosphate transporter	10,26	5,9440E-24
70972	Synaptic vesicle transporter SVOP and related transporters	MFS transporter superfamily	10,14	1,0183E-15
60810	NA	Acetate transporter GPR1/FUN34/SatP family	8,23	2,6667E-50
78585	Synaptic vesicle transporter SVOP and related transporters	MFS transporter superfamily	7,73	6,0480E-21
82321	Aquaporin (major intrinsic protein family)	Major intrinsic protein	6,99	5,8720E-20
2076	NA	Voltage-dependent anion channel	6,48	0,00
62380	Predicted transporter	MFS transporter superfamily	6,14	6,3156E-56

Proteína ID	KOG	Descrição	*Fold change*	p-valor
121486	Amino acid transporters	Transmembrane amino acid transporter protein	5,21	3,3190E-25
82014	Amino acid transporters	Transmembrane amino acid transporter protein	5,16	0,01623
103712	Zn_2^+ transporter ZNT1 and related Cd_2^+/Zn_2^+ transporters	Cation efflux protein	4,62	0,00
74953	Predicted transporter	MFS transporter superfamily	4,40	9,3241E-61
124002	Sexual differentiation process protein ISP4	Oligopeptide transporter	3,93	2,0970E-37
57015	Amino acid transporters	Amino acid transporter	2,31	0,01320
5787	Amino acid transporters	Amino acid permease	2,58	2,4724E-09
56684	Predicted transporter	MFS transporter superfamily	2,11	0,0204
26160	Predicted transporter	Sugar transporter	2,04	0,0103
55634	Predicted transporter	MFS transporter superfamily	1,88	0,0153
60177	Permease of the major facilitator superfamily	MSF transporter superfamily	1,87	0,00
54036	Predicted transporter	MFS transporter superfamily	1,75	0,0016
80091	Predicted transporter	MFS transporter superfamily	1,71	0,0117
70108	Synaptic vesicle transporter SVOP and related transporters	MFS transporter superfamily	1,60	0,0138
54972	Synaptic vesicle transporter SVOP and related transporters	MSF superfamily	1,55	0,0324
61374	Permease of the major facilitator superfamily	MFS transporter superfamily	1,37	0,0385
109122	Amino acid transporters	Amino acid permease/ SLC12A domain	1,25	0,00
62172	Amino acid transporters	Amino acid/polyamine transporter I	1,25	0,0062
3405	Predicted transporter	MSF transporter superfamily Sugar transporter	1,19	0,0003
102953	Synaptic vesicle transporter SVOP and related transporters	MFS transporter superfamily	1,13	0,0003
53501	Permease of the drug/metabolite Transporter (DMT) superfamily	EamA domain	1,13	7,8246E-09
82309	Predicted transporter	MFS transporter superfamily	1,08	0,04514
123473	Synaptic vesicle transporter SV2	MFS transporter superfamily	1,05	0,00
55630	Monocarboxylate transporter	MFS transporter superfamily	1,02	0,0128
76682	Pleiotropic drug resistance proteins (PDR1-15)	ABC transporter	-5,21	0,00
122242	Predicted divalent cation transporter	NA	-1,04	1,1944E-11

6- Discussão

A família de proteínas das cerato plataninas são encontradas exclusivamente em fungos e já foram identificadas em mais de 150 genomas (Gao et al., 2020). De forma geral, os fungos possuem dois ou três genes que codificam para essas proteínas, e elas estão envolvidas no crescimento, desenvolvimento, reconhecimento, adesão, morfogênese de parede celular e parasitismo. Apesar dos esforços, pouco se sabe sobre a função primária das CPs (Frischmann et al., 2013; Luti et al., 2020; Pazzagli et al., 2009; Yu et al., 2012). No presente trabalho, a fim de estudar o potencial papel fisiológico da proteína EPL1, foi investigado o comportamento do fungo *T. reesei* frente a deleção do gene *epl1*. O estudo da função gênica utilizando a cepa mutante deletada foi realizado através de uma transformação da linhagem selvagem de *T. reesei* com um cassete de deleção contendo as regiões flanqueadoras 5' e 3' do gene alvo e um gene de seleção (*pyr4*).

Inicialmente, foi avaliado a capacidade do mutante Δ*epl1* expressar celulases na presença de celulose, uma fonte indutora. Nossos resultados mostraram que Δ*epl1* apresentou um aumento na expressão de *cel7a* e diminuição na expressão de *cel6a*, indicando uma possível compensação entre esses genes, o que pode ser observado pela ausência de diferença estatística na atividade enzimática de celobiohidrolase. Também foi observado a diminuição da expressão de *cel3a* (β-glicosidase) e *cel74a* (endoglicanase), no entanto não houve diferença estatística na atividade de β-glicosidase. Esses resultados sugerem que a proteína EPL1 não influencia diretamente a produção de enzimas celulolíticas pelo fungo na presença de celulose.

Outra abordagem escolhida para analisar a produção de celulases foi a fermentação em meio semi-sólido (FES), utilizando bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono. Essa técnica é definida pelo cultivo de micro-organismos em substratos com umidade suficiente para suportar o crescimento microbiano na ausência de água livre (Hölker et al., 2004; Pandey, 2003). O uso de FES tem se mostrado interessante no cultivo de fungos filamentosos, uma vez que simula seu habitat natural e, estudos com *T. reesei*, demonstraram um alto rendimento na produção de celulases (Chahal, 1985; Singhania et al., 2007). Nossos resultados não mostraram diferença significativa na atividade de celobiohidrolase, no entanto houve diminuição de atividade de β-glicosidase no mutante. Nos últimos anos, estudos demonstraram a capacidade de CPs em se ligar e enfraquecer materiais celulósicos, tornando-os mais acessíveis a atividade enzimática, agindo de forma semelhante as expansinas vegetais (Baccelli et al., 2014; Luti et al., 2020). Essa

característica foi relatada para cerato platanina Pop1 de *Ceratocystis populicola* (Baccelli et al., 2014), MpCP2 de *Moniliophthora perniciosa* (Barsottini et al., 2013), FgCPPs de *Fusarium graminearum* (Quarantin et al., 2019) e ThCP de *Trichoderma harzianum* (Pitocchi et al., 2020). Cerato plataninas recombinantes de *Fusarium graminearum* (FgCPPs 1 e 2) também aumentaram a atividade de enzima β-1,4- glicosidase em CMC (carboximetilcelulose), papel de filtro e trigo (Quarantin et al., 2019). Já o trabalho realizado com CPs de *Trichoderma harzianum* (ThCP), demonstrou a capacidade dessas proteínas em afrouxar a celulose presente no bagaço de maça, aumentando o rendimento na conversão de açúcares (Pennacchio et al., 2021). Além disso, análise do secretoma de *T. harzianum* demonstraram a presença de CPs quando esse fungo foi cultivado em glicose, celulose, xilana e bagaço de cana (Gómez-Mendoza et al., 2014). CPs também foram encontradas no secretoma de *T. reesei* durante processos de fermentação em bagaço de cana (Florencio et al., 2016).

Apesar das CPs serem abundantes em secretomas de fungos, elas ainda não foram estudadas sitematicamente no gênero *Trichoderma*. Com o objetivo de compreender quais mecanismos estão envolvidos com a proteína EPL1, foi feita a análise da regulação transcricional no mutante Δ*epl1* cultivado em celulose 1% por 72 horas. Dos 9.143 genes preditos pelo genoma de referência, 760 foram considerados diferencialmente expressos, sendo 260 exclusivos para QM6a (166 *up* e 94 *down* regulados), 214 genes exclusivos em Δ*epl1* (177 *up* e *37* down regulados) e 286 compartilhado entre eles. Através do enriquecimento de categorias baseado em GO e reconstrução de vias metabólicas, foram observados em Δ*epl1* funções relacionadas ao transporte, atividade oxidorredutase, ligação de polissacarídeo, metabolismo energético e metabolismo e biossíntese de glicanos. De forma geral, os processos observados em Δ*epl1* podem estar relacionados ao desevolvimento, sugerindo que a ausência de EPL1 pode ocasionar um aumento na expressão de protéinas relacionadas ao reconhocimento e fisiologia de *T. reesei*.

Alguns estudos realizados com espécies de *Trichoderma* demonstraram que genes para CPs estão presentes em níveis mais elevados de transcrição durante os processos inicias do desenvolvimento do fungo. Em *T. atroviride*, a expressão de *epl1* ocorreu durante o crescimento de hifas e desenvolvimento micelial, e *epl2* foi expresso durante a conidiação. No entanto, estudos realizados com linhagens deletadas para *epl1* e/ou *epl2* não apresentaram diferenças no crescimento, conidiação, germinação e formação de hifas (Frischmann et al., 2013). De forma semelhante, o gene *sm1* de *T. virens* foi expresso em

esporos em germinação, e a cepa deletada ou superexpressa também não apresentou diferença no crescimento e no desenvolvimento de conídios e hifas (Djonović et al., 2006, 2007). Em *T. reesei*, a anotação completa dos cromossomos demonstrou que durante o início da esporulação e durante o crescimento em celulose houve um agrupamento de genes que codificam pequenas proteínas ricas em cisteínas (SSCP), e essas proteínas estão localizadas em *clusters* que contêm CAZymes (Druzhinina et al., 2016). Esses dados apoiam a ideia que a proteína EPL1 pode estar relacionada ao processo de adaptação e desenvolvimento do fungo no ambiente.

Para avaliar o efeito da deleção de *epl1* no crescimento do fungo em celulose, foi feita a análise de genes CAZy que estão *up* reguladas no mutante Δ*epl1*. De forma geral, foi encontrado um grande número de CAZys envolvidas na remodelação da parede celular do fungo. Dentre eles, se destacam algumas proteínas candidatas a β-1,3(4)-glucanase, enzimas capazes de hidrolisar ligação gicosídicas do β- glucano (Pedersen et al., 2021). Outra ezima envolvida na degradação da parede celular é a α-N-acetylglucosaminidase (GH89), responsável pela degração de N-acetil-glicosisamina, principal componente da quitina, (Shrivastava, 2020). Alguns trabalhos demostraram a capacidade de CPs em afrouxar ou proteger a parede celular, como foi observado em FgCPP1-2 de *F. graminearum*, capazes de defender a parede celular contra degradação por quitinases e β-1,3-glucanases (Quarantin et al., 2016). Já EPL1 de *T. atroviride* foi capaz de se ligar a várias formas de quitina, mostrando que essas proteínas podem atuar interrompendo as interações não covalentes entre os componentes da parede celular do fungo (Frischmann et al., 2013). Outras enzimas também encontraram-se *up* reguladas em Δ*epl1*, como a polissacarídeo monooxigenase Cel61a (GH61), responsável por clivar ligações glicosídicas do tipo β-1,4, além de modificar a estrutura cristalina da celulose e aumentar a acessibilidade das celulases nesse polímero (Karlsson et al., 2001; Meng et al., 2020). Outra enzima importante que está *up* regulada em Δ*epl1* é a xilanase 2, umas das principais hemicelulases secretadas por *T. reesei*, responsável por clivar exclusivamente ligações endo-β-1,4 do xilano. Devida a alta especificidade, xilanases são interessantes para produção de xilo-oligossacarídeos prebióticos emergentes (XOS) através da utilização de resíduos agroindustriais (Ramoni et al., 2017; Wang et al., 2021; F. Zhang et al., 2019).

Outro grupo de genes de grande interesse é formado pelos transportadores. Essas proteínas são responsáveis pelo trânsito de moléculas entre o interior e exterior celular.

Em Δ*epl1*, 31 genes para transportadores estão regulados positivamente, sendo uma grande parcela deles pertencentes a família das MFS. Transportadores MFS podem atuar como simportadores (tráfego de moléculas ou íons na mesma direção), antiportadores (tráfego de moléculas em direções opostas) e unipórteres (tráfego de um único substrato em uma direção). Além disso, eles são conhecidos por transportar uma grande variedade de substratos, como: açúcares, peptídeos, aminoácidos, nucleosídeos, drogas, neurotransmissores, polióis, metabólitos do ciclo de ácido cítrico, intermediários glicolíticos fosforilados, entre outros (W. Zhang et al., 2013). Dentre os genes *up* regulados que pertencem as MFS, três estão relacionados com o transporte de açúcar, sendo ID26160 um transportador de monossacarídeos, e ID80091 um transportador de ácido de açucar. Os transportadores de monossacarídeos são os mais abundantes, uma vez que *T. reesei* consegue transportar glicose, principal fonte de carbono utilizada por esse fungo, além de diversos açúcares derivados da biomassa (xilose, rabinose e ácido d-galacturônico) (Havukainen et al., 2021; Sloothaak et al., 2016). Foi previsto no genoma de *T. reesei* cerca de 50 a 100 genes que condificam transportadores de açúcar, e a grande maioria deles ainda não foi caracterizado. Como a regulação desses genes depende da fonte de carbono, acredita-se que os transportadores desempenham algum papel na indução de celulases (Havukainen et al., 2021; Ries et al., 2013; J. Zhang et al., 2019).

Outra classe de MFS *up* regulados está relacionada com transportadores de vesículas sinápticas (ID78585; ID70972; ID54972; ID123473; ID 102953; ID 70108). Transportadores SVOP e SV2 são proteínas de ligação a nucleotídeos, que possuem afinidade por NAD e ATP. As funções de transporte das vesículas sinápticas são amplas, podendo estar relacionadas aos transportadores de fosfato, açúcar e ácido orgânico. Além disso, vesículas sinápticas associada ao transporte de íons e de pequenas e grandes moléculas são reguladas por um canal de Ca_2^+ dependente de voltagem, e, os níveis de cálcio citosóliso são determinados por duas vias opostas, uma de influxo e outra de efluxo, uma vez que a formação de vesícula e sua fusão na membrana necessitam do aumento desse íon no citoplasma. A presença de vesículas sinápticas abundantes podem acelerar a absorção e utilização de produtos gerados pelo microorganismo (Augustine et al., 1987; Waditee et al., 2004; Xie et al., 2018). O grande número de transportadores MFS pode estar relacionado aos processos de degradação da celulose, uma vez que essas proteínas estão envolvidas na absorção de nutrientes e íons essenciais, incluindo açúcares.

Dos genes relacionados às vias de sinalização celular, onze estão regulados positivamente no mutante Δ*epl1*, sendo identificado um canal iônico Ca_2^+/Na^+ dependente de K^+ e algumas proteínas com domínio de ligação a cálcio. Além disso, um gene que codifica o regulador de sinalização de proteína G (ID 54395) também está *up* regulado em Δ*epl1*, e de forma interessante, as proteínas RGS estão envolvidas na regulação de celulases em *T. reesei* (Schmoll, 2018; Tisch et al., 2011). Vários trabalhos têm demonstrado a importância do cálcio em *T. reesei*. Um estudo realizado por Martin-Santana e colaboradores, demonstraram que o Ca_2^+ é um íon importante para o controle da expressão de transportadores de açucares, podendo atuar em colaboração com o fator de transcrição CRZ1 (dedo de zinco responsivo à calcineurina 1) e induzir ou reprimir a expressão de celulases (Martins-Santana et al., 2019). Outro trabalho demonstrou que vias de sinalização por cálcio podem aumentar a expressão de celulases quando são estimuladas por Mn_2^+ e DMF (*N, N-dimethylformamide*). Nesse caso, Mn_2^+ e DMF geram cAMP, que ativam a via de sinalização de cálcio através de fosfolipase C (Y. Chen et al., 2021). Por último, foi observado que xiloglucanase (*cel74a*) é modulada por cálcio, uma vez que a presença desse íon aumentou sua atividade e adição de EDTA reduziu sua atividade (Lopes et al., 2021). De forma semelhante, Mach e colaboradores mostraram que a formação de xilanases em *T. reesei* está estreitamente relacionada à fosforilação dependente de Ca_2^+ /calmodulina (Mach et al., 1998). Desse modo, as vias de sinalização por cálcio podem estar relacionadas com os mecanismos pelo qual a celulose sinaliza a sua presença para a célula.

Após os sinais serem gerados pelas vias de sinalização, ocorre a ativação ou repressão de genes de acordo com a fonte de carbono. O processo de regulação gênica de *T. reesei* é feito de forma controlada e inteligente por diversos fatores de transcrição (FT). O principal ativador da expressão de celulases e hemicelulases é o Xyr1 (*Xylanase regulator 1*), um FT do tipo dedos de zinco (ZF, *zinc finger*) da família Zn_2Cys_6. Esse FT regula positivamente: *xyn1, xyn2, cel7a, cel6a e cel7b* (Castro et al., 2014; Stricker et al., 2006). O FT Ace3 (*Activador of cellulase expression 3*) regula de forma positiva a produção de enzimas celulolíticas se ligando aos promotores da *cel7a* e *cel6a*, *xyr1* e *crt1* (*Cellulose responsive transporter 1*) (J. Zhang et al., 2019; Häkkinnes et al., 2014). Já o principal repressor de celulases é o Cre1 (*Carbon catabolite repressor 1*), responsável por controlar o metabolismo do fungo quando este se encontra em fontes de carbono de fácil metabolização, como glicose. Cre1 pode inibir Xyr1, e, consequentemente, a

expressão de enzimas celulolíticas (Antoniêto et al., 2014; Ilmén et al., 1997). Outro FT conhecido por reprimir genes celulolíticos se ligando ao promotor de *cel7a*, é o Ace1 (*Activator of celulase expression 1*) (A. Saloheimo et al., 2000). A breve descrição da regulação gênica de *T. reesei* é interessante para entender o processo de adaptação desse fungo em diferentes fontes de carbono.

Afim de verificar se a ausência da proteína EPL1 influenciou de alguma forma os fatores de transcrição, os genes *up* regulados no mutante Δ*epl1* foram analizados, e dois FT apresentaram regulação positiva. O fator de transcrição ID 110689 é do tipo Zn_2Cys_6, no entanto não há mais informações sobre ele na literatura. Há vários fatores de transcrição desse tipo não caracterizados em *T. reesei*. Em 2014, Häkkien demonstrou que o FT ID 80291 aumentou em duas vezes a formação de CBH1 (Häkkinnes et al., 2014) e, outros dois genes (ID 26163 e ID 54675), possuem ortólogos em *N. crassa* que estão envolvidos com a expressão de celulases (CLR2 e VIB1) (Coradetti et al., 2012; Xiong et al., 2014). O outro fator de transcrição *up* regulado ID 105718 é do tipo T-box (TBX2). Curiosamente, os genes T-box eram considerados específicos do reino metazoa, até estudos demonstrarem sua presença em *Capsaspora owczarzaki* (ameba unicelular) e *Spizellomyces punctatus* (fungo quitrídeo encontrado no solo). No entanto, eles não foram identificados em nenhum outro eucarioto, sugerindo a perda secundária desses genes em coanoflagelados e fungos. Em animais, T-box estão envolvidos no desenvolvimento animal, com funções bem definidas na especificação de blastóporo, diferenciação do mesoderma e formação de notocórdio (Sebé-Pedrós & Ruiz-Trillo, 2017). A falta de genes diferencilamente expressos relacionados a fatores de transição sugere que *epl1* não interfere na regualação de FTs.

De forma geral, é possível supor que proteína EPL1 pode atuar na parede celular do fungo, agindo durante o alongamento das hifas, formação e germinação de esporos e em todos processos que requerem remodelação da parede celular. Dessa forma, EPL1 pode auxiliar na fixação e adaptação do fungo em diferentes habitats.

7-Conclusão

- Análises de PCR em tempo real em Δ*epl1* demonstraram que *cel7a* está *up* regulada em 72 horas e *cel6a* e *cel3a* estão *down* reguladas em 72 horas. No entanto não houve diferença estatística de atividade enzimática dessas enzimas.

- Em fermentação semi-sólida em bagaço de cana houve a diminuição da atividade enzimática de β-glicosidade em Δ*epl1* cultivado por 72 horas.

- Em análises de RNA-seq, 760 genes foram considerados diferencialmente expressos, sendo 260 exclusivos para QM6a (166 *up* e 94 *down* regulados), 214 exclusivos em Δ*epl1* (177 *up* e *37* down regulados) e 286 compartilhado entre eles.

- Em Δ*epl1* o enriquecimento de categorias baseado em GO foram: transporte de ácido orgânico, atividade oxidorredutase, transporte, ligação de polissacarídeo e ligação de carboidratos. Processos que podem estar relacionados com reconhecimento da celulose.

- Entre as CAZys *up* reguladas no mutante Δ*epl1* se destacam Cel61a, xilanase 2, α-N-acetylglucosaminidase e alguns candidatos a β-1,3(4) -glucanase.

- A maioria dos transportadores *up* regulados em Δ*epl1* pertencem as MFS, sendo seis transportadores de vesículas sinápticas e três transportadores de açúcares.

- Os mecanismos de sinalização celular em Δ*epl1* provavelmente estão relacionados à sinalização por cálcio.

8-Referências bibliográficas

Andberg, M., Penttilä, M., & Saloheimo, M. (2015). Swollenin from *Trichoderma reesei* exhibits hydrolytic activity against cellulosic substrates with features of both endoglucanases and cellobiohydrolases. *Bioresource Technology*, *181*, 105–113. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.024

Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, *31*(2), 166–169. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638

Antoniêto, A. C. C., dos Santos Castro, L., Silva-Rocha, R., Persinoti, G. F., & Silva, R. N. (2014). Defining the genome-wide role of CRE1 during carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* using RNA-Seq analysis. *Fungal Genetics and Biology*, *73*, 93–103. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.10.009

Anwar, Z., Gulfraz, M., & Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, *7*(2), 163–173. https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.02.003

Ashwin, N. M. R., Barnabas, L., Ramesh Sundar, A., Malathi, P., Viswanathan, R., Masi, A., Agrawal, G. K., & Rakwal, R. (2017). Comparative secretome analysis of *Colletotrichum falcatum* identifies a cerato-platanin protein (EPL1) as a potential pathogen-associated molecular pattern (PAMP) inducing systemic resistance in sugarcane. *Journal of Proteomics*, *169*, 2–20. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.05.020

Augustine, G. J., Charlton, M. P., & Smith, S. J. (1987). Calcium action in synaptic transmitter release. *Annual Review of Neuroscience*, *Vol. 10*, 633–693. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.10.1.633

Baccelli, I. (2015). Cerato-platanin family proteins: One function for multiple biological roles? *Frontiers in Plant Science*, *5*(JAN), 2013–2016. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00769

Baccelli, I., Luti, S., Bernardi, R., Scala, A., & Pazzagli, L. (2014). Cerato-platanin shows expansin-like activity on cellulosic materials. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(1), 175–184. https://doi.org/10.1007/s00253-013-4822-0

Barsottini, M. R. de O., de Oliveira, J., Adamoski, D., Teixeira, P. J. P. L., Tiezzi, H. O., Sforça, M. L., Cassago, A., Portugal, R. V, de Oliveira, P. S. L., Zeri, A. C. M., Dias, S. M. G., Pereira, G. A. G., & Ambrosio, A. L. B. (2013). Functional Diversification of Cerato-Platanins in. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, *26*(11), 1281–1293.

Biofuel Production_ Recent Developments and Prospects - Google Livros. (n.d.).

Bissett, J., Gams, W., Jaklitsch, W., & Samuels, G. J. (2015). Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus*, *6*(2), 263–295. https://doi.org/10.5598/imafungus.2015.06.02.02

Castro, L. D. S., Antoniêto, A. C. C., Pedersoli, W. R., Silva-Rocha, R., Persinoti, G. F., & Silva, R. N. (2014). Expression pattern of cellulolytic and xylanolytic genes

regulated by transcriptional factors XYR1 and CRE1 are affected by carbon source in *Trichoderma reesei*. *Gene Expression Patterns*, *14*(2), 88–95. https://doi.org/10.1016/j.gep.2014.01.003

Chahal, D. S. (1985). Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Applied and Environmental Microbiology*, *49*(1), 205–210. https://doi.org/10.1128/aem.49.1.205-210.1985

Chen, H., Kovalchuk, A., Keriö, S., & Asiegbu, F. O. (2013). Distribution and bioinformatic analysis of the cerato-platanin protein family in Dikarya. *Mycologia*, *105*(6), 1479–1488. https://doi.org/10.3852/13-115

Chen, Y., Fan, X., Zhao, X., Shen, Y., Xu, X., Wei, L., Wang, W., & Wei, D. (2021). cAMP activates calcium signalling via phospholipase C to regulate cellulase production in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels*, *14*(1), 1–13. https://doi.org/10.1186/s13068-021-01914-0

Coradetti, S. T., Craig, J. P., Xiong, Y., Shock, T., Tian, C., & Glass, N. L. (2012). Conserved and essential transcription factors for cellulase gene expression in ascomycete fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(19), 7397–7402. https://doi.org/10.1073/pnas.1200785109

Cox, M. M. (n.d.). *Lehninger - PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY*.

De Oliveira, A. L., Gallo, M., Pazzagli, L., Benedetti, C. E., Cappugi, G., Scala, A., Pantera, B., Spisni, A., Pertinhez, T. A., & Cicero, D. O. (2011). The structure of the elicitor cerato-platanin (CP), the first member of the CP fungal protein family, reveals a double ψβ-barrel fold and carbohydrate binding. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(20), 17560–17568. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.223644

De Paula, R. G., Antoniêto, A. C. C., Ribeiro, L. F. C., Carraro, C. B., Nogueira, K. M. V., Lopes, D. C. B., Costa Silva, A., Zerbini, M. T., Pedersoli, W. R., Do Nascimento Costa, M., & Nascimento Silva, R. (2018). New genomic approaches to enhance biomass degradation by the industrial fungus *Trichoderma reesei*. *International Journal of Genomics*, *2018*. https://doi.org/10.1155/2018/1974151

Derntl, C., Kiesenhofer, D. P., Mach, R. L., & Mach-Aigner, A. R. (2015). Novel strategies for genomic manipulation of Trichoderma reesei with the purpose of strain engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(18), 6314–6323. https://doi.org/10.1128/AEM.01545-15

Dhevagi Periasamy, Sudhakarn Mani, and R. A. (2019). *Chapter 4 White Rot Fungi and Their Enzymes for the Treatment of Industrial Dye Effluents. In:Nath A, Singh YS, Mishra S, Gupta A.(eds)Fungal Biology Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi* (Vol. 3, Issue October). https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1

Djonović, S., Pozo, M. J., Dangott, L. J., Howell, C. R., & Kenerley, C. M. (2006). Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *19*(8), 838–853. https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0838

Djonović, S., Vargas, W. A., Kolomiets, M. V., Horndeski, M., Wiest, A., & Kenerley, C. M. (2007). A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in Maize. *Plant Physiology*, *145*(3), 875–889. https://doi.org/10.1104/pp.107.103689

Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, *29*(1), 15–21. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635

Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., Kubicek, E. M., & Kubicek, C. P. (2016). A complete annotation of the chromosomes of the cellulase producer *Trichoderma reesei* provides insights in gene clusters, their expression and reveals genes required for fitness. *Biotechnology for Biofuels*, *9*(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/s13068-016-0488-z

Eibinger, M., Ganner, T., Bubner, P., Rošker, S., Kracher, D., Haltrich, D., Ludwig, R., Plank, H., & Nidetzky, B. (2014). Cellulose surface degradation by a lytic polysaccharide monooxygenase and its effect on cellulase hydrolytic efficiency. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(52), 35929–35938. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.602227

Ferreira, G. L. C. (2012). Global dengue epidemiology trends. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, *54*(SUPPL.18), 5–6. https://doi.org/10.1590/S0036-46652012000700003

Florencio, C., Cunha, F. M., Badino, A. C., Farinas, C. S., Ximenes, E., & Ladisch, M. R. (2016). Secretome data from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated in submerged and sequential fermentation methods. *Data in Brief*, *8*, 588–598. https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.05.080

Frías, M., Brito, N., González, M., & González, C. (2014). The phytotoxic activity of the cerato-platanin BcSpl1 resides in a two-peptide motif on the protein surface. *Molecular Plant Pathology*, *15*(4), 342–351. https://doi.org/10.1111/mpp.12097

Frías, M., González, C., & Brito, N. (2011). BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytologist*, *192*(2), 483–495. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03802.x

Frischmann, A., Neudl, S., Gaderer, R., Bonazza, K., Zach, S., Gruber, S., Spadiut, O., Friedbacher, G., Grothe, H., & Seidl-Seiboth, V. (2013). Self-assembly at air/water interfaces and carbohydrate binding properties of the small secreted protein EPL1 from the fungus *Trichoderma atroviride*. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(6), 4278–4287. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.427633

Gaderer, R., Bonazza, K., & Seidl-Seiboth, V. (2014). Cerato-platanins: A fungal protein family with intriguing properties and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(11), 4795–4803. https://doi.org/10.1007/s00253-014-5690-y

Gaderer, R., Lamdan, N. L., Frischmann, A., Sulyok, M., Krska, R., Horwitz, B. A., & Seidl-Seiboth, V. (2015). 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*, *15*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/s12866-014-0333-0

Gao, R., Ding, M., Jiang, S., Zhao, Z., Chenthamara, K., Shen, Q., Cai, F., & Druzhinina, I. S. (2020). The evolutionary and functional paradox of cerato-platanins in fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, *86*(13), 1–20. https://doi.org/10.1128/AEM.00696-20

Georgelis, N., Tabuchi, A., Nikolaidis, N., & Cosgrove, D. J. (2011). Structure-function analysis of the bacterial expansin EXLX1. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(19), 16814–16823. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.225037

Gomes, E. V., Ulhoa, C. J., Cardoza, R. E., Silva, R. N., & Gutiérrez, S. (2017). Involvement of *Trichoderma harzianum* Epl-1 protein in the regulation of botrytis virulence- and tomato defense-related genes. *Frontiers in Plant Science*, *8*(May), 1–11. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00880

Gómez-Mendoza, D. P., Junqueira, M., Do Vale, L. H. F., Domont, G. B., Ferreira Filho, E. X., Sousa, M. V. De, & Ricart, C. A. O. (2014). Secretomic survey of *Trichoderma harzianum* grown on plant biomass substrates. *Journal of Proteome Research*, *13*(4), 1810–1822. https://doi.org/10.1021/pr400971e

Grantham, N. J., Wurman-Rodrich, J., Terrett, O. M., Lyczakowski, J. J., Stott, K., Iuga, D., Simmons, T. J., Durand-Tardif, M., Brown, S. P., Dupree, R., Busse-Wicher, M., & Dupree, P. (2017). An even pattern of xylan substitution is critical for interaction with cellulose in plant cell walls. *Nature Plants*, *3*(11), 859–865. https://doi.org/10.1038/s41477-017-0030-8

Gruber, F., Visser, J., Kubicek, C. P., & de Graaff, L. H. (1990). The development of a heterologous transformation system for the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* based on a pyrG-negative mutant strain. *Current Genetics*, *18*(1), 71–76. https://doi.org/10.1007/BF00321118

Gupta, V. K., Steindorff, A. S., de Paula, R. G., Silva-Rocha, R., Mach-Aigner, A. R., Mach, R. L., & Silva, R. N. (2016). The Post-genomic Era of *Trichoderma reesei*: What's Next? *Trends in Biotechnology*, *34*(12), 970–982. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.06.003

Gutierrez-Correa, M., Portal, L., Moreno, P., & Tengerdy, R. P. (1999). Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology*, *68*(2), 173–178. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00139-4

Häkkinen, M., Arvas, M., Oja, M., Aro, N., Penttilä, M., Saloheimo, M., & Pakula, T. M. (2012). Re-annotation of the CAZy genes of *Trichoderma reesei* and transcription in the presence of lignocellulosic substrates. *Microbial Cell Factories*, *11*, 1–26. https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-134

Han, X., Guo, Y., Liu, X., Xia, Q., & Wang, Y. (2019). Catalytic conversion of lignocellulosic biomass into hydrocarbons: A mini review. *Catalysis Today*, *319*, 2–

13. https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.05.013

Havukainen, S., Pujol-Giménez, J., Valkonen, M., Westerholm-Parvinen, A., Hediger, M. A., & Landowski, C. P. (2021). Electrophysiological characterization of a diverse group of sugar transporters from *Trichoderma reesei*. *Scientific Reports*, *11*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-021-93552-7

Havukainen, S., Valkonen, M., Koivuranta, K., & Landowski, C. P. (2020). Studies on sugar transporter CRT1 reveal new characteristics that are critical for cellulase induction in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels*, *13*(1), 1–20. https://doi.org/10.1186/s13068-020-01797-7

Hölker, U., Höfer, M., & Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *64*(2), 175–186. https://doi.org/10.1007/s00253-003-1504-3

Hu, G., Heitmann, J. A., & Rojas, O. J. (2008). Feedstock pretreatment strategies for producing ethanol from wood, bark, and forest residues. *BioResources*, *3*(1), 270–294. https://doi.org/10.15376/biores.3.1.270-294

Ilmén, M., Saloheimo, A., Onnela, M. L., & Penttilä, M. E. (1997). Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(4), 1298–1306. https://doi.org/10.1128/aem.63.4.1298-1306.1997

Jeong, J. S., Mitchell, T. K., & Dean, R. A. (2007). The *Magnaporthe grisea* snodprot1 homolog, MSP1, is required for virulence. *FEMS Microbiology Letters*, *273*(2), 157–165. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00796.x

Jones, P., Binns, D., Chang, H. Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A. F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S. Y., Lopez, R., & Hunter, S. (2014). InterProScan 5: Genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, *30*(9), 1236–1240. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031

Kanehisa, M., Sato, Y., Furumichi, M., Morishima, K., & Tanabe, M. (2019). New approach for understanding genome variations in KEGG. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D590–D595. https://doi.org/10.1093/nar/gky962

Kang, X., Kirui, A., Dickwella Widanage, M. C., Mentink-Vigier, F., Cosgrove, D. J., & Wang, T. (2019). Lignin-polysaccharide interactions in plant secondary cell walls revealed by solid-state NMR. *Nature Communications*, *10*(1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41467-018-08252-0

Karlsson, J., Saloheimo, M., Siika-Aho, M., Tenkanen, M., Penttilä, M., & Tjerneld, F. (2001). Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei*. *European Journal of Biochemistry*, *268*(24), 6498–6507. https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02605.x

Laemmli, U. K. (1970). 227680a0. *Nature*, *227*, 680–685.

Linder, T., & Gustafsson, C. M. (2008). Molecular phylogenetics of ascomycotal adhesins-A novel family of putative cell-surface adhesive proteins in fission yeasts. *Fungal Genetics and Biology*, *45*(4), 485–497. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.08.002

Liu, Y. S., Baker, J. O., Zeng, Y., Himmel, M. E., Haas, T., & Ding, S. Y. (2011). Cellobiohydrolase hydrolyzes crystalline cellulose on hydrophobic faces. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(13), 11195–11201. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.216556

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), 490–495. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178

Lopes, D. C. B., Carraro, C. B., Silva, R. N., & de Paula, R. G. (2021). Molecular characterization of xyloglucanase cel74a from *Trichoderma reesei*. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9). https://doi.org/10.3390/ijms22094545

Lord, M. (2003). Gel Electrophoresis of Proteins. *Essential Cell Biology*, 197–268. https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)88594-9

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 1–21. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8

Luti, S., Caselli, A., Taiti, C., Bazihizina, N., Gonnelli, C., Mancuso, S., & Pazzagli, L. (2016). PAMP activity of cerato-platanin during plant interaction: An -Omic approach. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(6). https://doi.org/10.3390/ijms17060866

Luti, S., Sella, L., Quarantin, A., Pazzagli, L., & Baccelli, I. (2020). Twenty years of research on cerato-platanin family proteins: clues, conclusions, and unsolved issues. *Fungal Biology Reviews*, *34*(1), 13–24. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2019.10.001

Mach, R. L., Zeilinger, S., Kristufek, D., & Kubicek, C. P. (1998). Ca2+-calmodulin antagonists interfere with xylanase formation and secretion in *Trichoderma reesei*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1403*(3), 281–289. https://doi.org/10.1016/S0167-4889(98)00068-8

Machado, G., Leon, S., Santos, F., Lourega, R., Dullius, J., Mollmann, M. E., & Eichler, P. (2016). Literature Review on Furfural Production from Lignocellulosic Biomass. *Natural Resources*, *07*(03), 115–129. https://doi.org/10.4236/nr.2016.73012

Magalhães, A. I., de Carvalho, J. C., de Melo Pereira, G. V., Karp, S. G., Câmara, M. C., Medina, J. D. C., & Soccol, C. R. (2019). Lignocellulosic biomass from agro-industrial residues in South America: current developments and perspectives. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *13*(6), 1505–1519. https://doi.org/10.1002/bbb.2048

Maity, S. K. (2015). Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part i. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *43*, 1427–1445.

https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.11.092

Martinez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S. E., Chapman, J., Chertkov, O., Coutinho, P. M., Cullen, D., Danchin, E. G. J., Grigoriev, I. V., Harris, P., Jackson, M., Kubicek, C. P., Han, C. S., Ho, I., Larrondo, L. F., De Leon, A. L., … Brettin, T. S. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology*, *26*(5), 553–560. https://doi.org/10.1038/nbt1403

Martins-Santana, L., de Paula, R. G., Gomes Silva, A., Christian Borges Lopes, D., do Nascimento Silva, R., & Silva-Rocha, R. (2019). CRZ1 regulator and calcium cooperatively modulate holocellulases gene expression in *Trichoderma reesei* QM6a. *BioRxiv*, *20190244*, 1–12. https://doi.org/10.1101/622647

Meng, Q. S., Zhang, F., Liu, C. G., Zhao, X. Q., & Bai, F. W. (2020). Identification of a novel repressor encoded by the putative gene ctf1 for cellulase biosynthesis in *Trichoderma reesei* through artificial zinc finger engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, *117*(6), 1747–1760. https://doi.org/10.1002/bit.27321

Nixon, B. T., Mansouri, K., Singh, A., Du, J., Davis, J. K., Lee, J. G., Slabaugh, E., Vandavasi, V. G., O'Neill, H., Roberts, E. M., Roberts, A. W., Yingling, Y. G., & Haigler, C. H. (2016). Comparative Structural and Computational Analysis Supports Eighteen Cellulose Synthases in the Plant Cellulose Synthesis Complex. *Scientific Reports*, *6*(March), 1–14. https://doi.org/10.1038/srep28696

Oszust, K., Cybulska, J., & Frąc, M. (2020). How do *Trichoderma* genus fungi win a nutritional competition battle against soft fruit pathogens? A report on niche overlap nutritional potentiates. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(12), 1–19. https://doi.org/10.3390/ijms21124235

Pan, Y., Wei, J., Yao, C., Reng, H., & Gao, Z. (2018). SsSm1, a Cerato-platanin family protein, is involved in the hyphal development and pathogenic process of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Science*, *270*, 37–46. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.02.001

Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, *13*(2–3), 81–84. https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3

Pazzagli, L., Cappugi, G., Manao, G., Camici, G., Santini, A., & Scala, A. (1999). Purification, characterization, and amino acid sequence of cerato- platanin, a new phytotoxic protein from Ceratocystis fimbriata f. sp. platani. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(35), 24959–24964. https://doi.org/10.1074/jbc.274.35.24959

Pazzagli, L., Seidl-Seiboth, V., Barsottini, M., Vargas, W. A., Scala, A., & Mukherjee, P. K. (2014). Cerato-platanins: Elicitors and effectors. *Plant Science*, *228*, 79–87. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.02.009

Pazzagli, L., Zoppi, C., Carresi, L., Tiribilli, B., Sbrana, F., Schiff, S., Pertinhez, T. A., Scala, A., & Cappugi, G. (2009). Characterization of ordered aggregates of cerato-platanin and their involvement in fungus-host interactions. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1790*(10), 1334–1344.

https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.014

Pedersen, N. R., Tovborg, M., Farjam, A. S., & Pia, E. A. Della. (2021). Multicomponent carbohydrase system from Trichoderma reesei: A toolbox to address complexity of cell walls of plant substrates in animal feed. *PLoS ONE*, *16*(6 June), 1–23. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251556

Peña-Castro, J. M., Del Moral, S., Núñez-López, L., Barrera-Figueroa, B. E., & Amaya-Delgado, L. (2017). Biotechnological Strategies to Improve Plant Biomass Quality for Bioethanol Production. *BioMed Research International*, *2017*. https://doi.org/10.1155/2017/7824076

Pennacchio, A., Pitocchi, R., Varese, G. C., Giardina, P., & Piscitelli, A. (2021). *Trichoderma harzianum* cerato-platanin enhances hydrolysis of lignocellulosic materials. *Microbial Biotechnology*, *14*(4), 1699–1706. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13836

Peterson, R., & Nevalainen, H. (2012). *Trichoderma reesei* RUT-C30 - Thirty years of strain improvement. *Microbiology*, *158*(1), 58–68. https://doi.org/10.1099/mic.0.054031-0

Petridis, L., Xu, J., Crowley, M. F., Smith, J. C., & Cheng, X. (2010). Atomistic simulation of lignocellulosic biomass and associated cellulosomal protein complexes. *ACS Symposium Series*, *1052*, 55–73. https://doi.org/10.1021/bk-2010-1052.ch003

Philippini, R. R., Martiniano, S. E., Ingle, A. P., Franco Marcelino, P. R., Silva, G. M., Barbosa, F. G., dos Santos, J. C., & da Silva, S. S. (2020). Agroindustrial Byproducts for the Generation of Biobased Products: Alternatives for Sustainable Biorefineries. *Frontiers in Energy Research*, *8*(July). https://doi.org/10.3389/fenrg.2020.00152

Phitsuwan, P., Sakka, K., & Ratanakhanokchai, K. (2013). Improvement of lignocellulosic biomass in planta: A review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. *Biomass and Bioenergy*, *58*, 390–405. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.08.027

Pino, M. S., Rodríguez-Jasso, R. M., Michelin, M., Flores-Gallegos, A. C., Morales-Rodriguez, R., Teixeira, J. A., & Ruiz, H. A. (2018). Bioreactor design for enzymatic hydrolysis of biomass under the biorefinery concept. *Chemical Engineering Journal*, *347*(April), 119–136. https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.04.057

Pitocchi, R., Cicatiello, P., Birolo, L., Piscitelli, A., Bovio, E., Cristina Varese, G., & Giardina, P. (2020). Cerato-platanins from marine fungi as effective protein biosurfactants and bioemulsifiers. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(8). https://doi.org/10.3390/ijms21082913

Plessis, I. L. D., Druzhinina, I. S., Atanasova, L., Yarden, O., & Jacobs, K. (2018). The diversity of *Trichoderma* species from soil in south africa, with five new additions. *Mycologia*, *110*(3), 559–583. https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1463059

Quarantin, A., Castiglioni, C., Schäfer, W., Favaron, F., & Sella, L. (2019). The *Fusarium graminearum* cerato-platanins loosen cellulose substrates enhancing fungal cellulase activity as expansin-like proteins. *Plant Physiology and Biochemistry*, *139*(February), 229–238. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.03.025

Quarantin, A., Glasenapp, A., Schäfer, W., Favaron, F., & Sella, L. (2016). Involvement of the *Fusarium graminearum* cerato-platanin proteins in fungal growth and plant infection. *Plant Physiology and Biochemistry*, *109*, 220–229. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.10.001

Rambo, M. K. D., Schmidt, F. L., & Ferreira, M. M. C. (2015). Analysis of the lignocellulosic components of biomass residues for biorefinery opportunities. *Talanta*, *144*, 696–703. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.045

Ramoni, J., Marchetti-Deschmann, M., Seidl-Seiboth, V., & Seiboth, B. (2017). *Trichoderma reesei* xylanase 5 is defective in the reference strain QM6a but functional alleles are present in other wild-type strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(10), 4139–4149. https://doi.org/10.1007/s00253-017-8161-4

Reis, T. F. Dos, Menino, J. F., Bom, V. L. P., Brown, N. A., Colabardini, A. C., Savoldi, M., Goldman, M. H. S., Rodrigues, F., & Goldman, G. H. (2013). Identification of glucose transporters in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE*, *8*(11), 1–15. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081412

Reiser, K., Davis, M. A., & Hynes, M. J. (2010). Aspergillus nidulans contains six possible fatty acyl-CoA synthetases with FaaB being the major synthetase for fatty acid degradation. *Archives of Microbiology*, *192*(5), 373–382. https://doi.org/10.1007/s00203-010-0565-9

Ries, L., Pullan, S. T., Delmas, S., Malla, S., Blythe, M. J., & Archer, D. B. (2013). Genome-wide transcriptional response of *Trichoderma reesei* to lignocellulose using RNA sequencing and comparison with Aspergillus niger. *BMC Genomics*, *14*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-541

Saeidipour, B., & Bakhshi, S. (2013). The relationship between organizational culture and knowledge management,& their simultaneous effects on customer relation management. *Advances in Environmental Biology*, *7*(10), 2803–2809.

Sagastume Gutiérrez, A., Cabello Eras, J. J., Hens, L., & Vandecasteele, C. (2020). The energy potential of agriculture, agroindustrial, livestock, and slaughterhouse biomass wastes through direct combustion and anaerobic digestion. The case of Colombia. *Journal of Cleaner Production*, *269*. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122317

Salas-Marina, M. A., Isordia-Jasso, M. I., Islas-Osuna, M. A., Delgado-Sánchez, P., Jiménez-Bremont, J. F., Rodríguez-Kessler, M., Rosales-Saavedra, M. T., Herrera-Estrella, A., & Casas-Flores, S. (2015). The Epl1 and Sm1 proteins from *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma virens* differentially modulate systemic disease resistance against different life style pathogens in Solanum lycopersicum. *Frontiers in Plant Science*, *6*(FEB), 1–13. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00077

Saloheimo, A., Aro, N., Ilmén, M., & Penttilä, M. (2000). Isolation of the ace1 gene encoding a Cys2-His2 transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter cbh1 of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(8), 5817–5825. https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5817

Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, J., Swanson, B., Nyyssönen, E., Bhatia, A., Ward, M., & Penttilä, M. (2002). Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *European Journal of Biochemistry*, *269*(17), 4202–4211. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03095.x

Schlittler, L. A. F. S., Antunes, A. M. de S., & Pereira, N. (2012). Use of patent applications as a tool for technology development investigations on ethanol production from lignocellulosic biomass in Brazil. *Journal of Technology Management and Innovation*, *7*(3), 80–90. https://doi.org/10.4067/s0718-27242012000300008

Schmoll, M. (2018). Regulation of plant cell wall degradation by light in *Trichoderma*. *Fungal Biology and Biotechnology*, *5*(1), 1–20. https://doi.org/10.1186/s40694-018-0052-7

Schmoll, M., Dattenböck, C., Carreras-Villaseñor, N., Mendoza-Mendoza, A., Tisch, D., Alemán, M. I., Baker, S. E., Brown, C., Cervantes-Badillo, M. G., Cetz-Chel, J., Cristobal-Mondragon, G. R., Delaye, L., Esquivel-Naranjo, E. U., Frischmann, A., Gallardo-Negrete, J. de J., García-Esquivel, M., Gomez-Rodriguez, E. Y., Greenwood, D. R., Hernández-Oñate, M., … Herrera-Estrella, A. (2016). The Genomes of Three Uneven Siblings: Footprints of the Lifestyles of Three *Trichoderma* Species. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *80*(1), 205–327. https://doi.org/10.1128/mmbr.00040-15

Schmoll, M., & Schuster, A. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *87*(3), 787–799. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1

Sebé-Pedrós, A., & Ruiz-Trillo, I. (2017). Evolution and Classification of the T-Box Transcription Factor Family. *Current Topics in Developmental Biology*, *122*, 1–26. https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.06.004

Senatore, A., Giorgianni, G., Giglio, E., & Dalena, F. (2021). Lignocellulosic biomass conversion into bioenergy: Feedstock overview. *Journal of Phase Change Materials*, *1*(1). https://doi.org/10.6084/jpcm.v1i1.7

Shrivastava, S. (2020). Industrial Applications of Glycoside Hydrolases. In *Industrial Applications of Glycoside Hydrolases*. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4767-6

Singh, A., Patel, A. K., Adsul, M., & Singhania, R. R. (2017). Genetic modification: A tool for enhancing cellulase secretion. *Biofuel Research Journal*, *4*(2), 600–610. https://doi.org/10.18331/BRJ2017.4.2.5

Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., & Pandey, A. (2007). Improved cellulase production by Trichoderma reesei RUT C30 under SSF through process optimization. *Applied*

Biochemistry and Biotechnology, *142*(1), 60–70. https://doi.org/10.1007/s12010-007-0019-2

Sipos, B., Benkő, Z., Dienes, D., Réczey, K., Viikari, L., & Siika-Aho, M. (2010). Characterisation of specific activities and hydrolytic properties of cell-wall-degrading enzymes produced by *Trichoderma reesei* rut C30 on different carbon sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *161*(1–8), 347–364. https://doi.org/10.1007/s12010-009-8824-4

Sloothaak, J., Tamayo-Ramos, J. A., Odoni, D. I., Laothanachareon, T., Derntl, C., Mach-Aigner, A. R., Martins Dos Santos, V. A. P., & Schaap, P. J. (2016). Identification and functional characterization of novel xylose transporters from the cell factories *Aspergillus Niger* and *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels*, *9*(1), 1–15. https://doi.org/10.1186/s13068-016-0564-4

Stricker, A. R., Grosstessner-Hain, K., Würleitner, E., & Mach, R. L. (2006). Xyr1 (Xylanase Regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryotic Cell*, *5*(12), 2128–2137. https://doi.org/10.1128/EC.00211-06

Sützl, L., Foley, G., Gillam, E. M. J., Bodén, M., & Haltrich, D. (2019). The GMC superfamily of oxidoreductases revisited: Analysis and evolution of fungal GMC oxidoreductases. *Biotechnology for Biofuels*, *12*(1), 1–18. https://doi.org/10.1186/s13068-019-1457-0

Tisch, D., Kubicek, C. P., & Schmoll, M. (2011). The phosducin-like protein PhLP1 impacts regulation of glycoside hydrolases and light response in *Trichoderma reesei*. *BMC Genomics*, *12*(December). https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-613

Tissue, D., Tissue, V., & Tissue, G. (n.d.). PANEL 22 – 2 : The Cell Types and Tissues From Which Higher Plants Are Constructed Stomata. *Cell*, 1404–1405.

Toribio-cuaya, H., Pedraza-segura, L., & Macías-bravo, S. (2014). Journal of Chemical , Biological and Physical Sciences Characterization of Lignocellulosic Biomass Using Five Simple Steps. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, *4*(5), 28–49.

Tsopelas, P., Santini, A., Wingfield, M. J., & De Beer, Z. W. (2017). Canker stain: A lethal disease destroying iconic plane trees. *Plant Disease*, *101*(5), 645–658. https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1235-FE

Waditee, R., Hossain, G. S., Tanaka, Y., Nakamura, T., Shikata, M., Takano, J., Takabe, T., & Takabe, T. (2004). Isolation and Functional Characterization of Ca2+/H+ Antiporters from Cyanobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(6), 4330–4338. https://doi.org/10.1074/jbc.M310282200

Wang, L., Cao, K., Pedroso, M. M., Wu, B., Gao, Z., He, B., & Schenk, G. (2021). Sequence- and structure-guided improvement of the catalytic performance of a GH11 family xylanase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, *297*(5), 101262. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101262

Williams, C. L., Westover, T. L., Emerson, R. M., Tumuluru, J. S., & Li, C. (2016). Sources of Biomass Feedstock Variability and the Potential Impact on Biofuels Production. *Bioenergy Research*, *9*(1), 1–14. https://doi.org/10.1007/s12155-015-9694-y

Wright, R. M., Aglyamova, G. V., Meyer, E., & Matz, M. V. (2015). Gene expression associated with white syndromes in a reef building coral, *Acropora hyacinthus. BMC Genomics*, *16*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s12864-015-1540-2

Xie, H., Ma, Q., Wei, D. Z., & Wang, F. Q. (2018). Transcriptomic analysis of *Aspergillus niger* strains reveals the mechanism underlying high citric acid productivity. *Bioresources and Bioprocessing*, *5*(1). https://doi.org/10.1186/s40643-018-0208-6

Xiong, Y., Sun, J., & Glass, N. L. (2014). VIB1, a Link between Glucose Signaling and Carbon Catabolite Repression, Is Essential for Plant Cell Wall Degradation by *Neurospora crassa. PLoS Genetics*, *10*(8). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004500

Yan, S., Xu, Y., & Yu, X. W. (2021). From induction to secretion : a complicated route for cellulase production in *Trichoderma reesei*. *Bioresources and Bioprocessing*. https://doi.org/10.1186/s40643-021-00461-8

Yang, G., Tang, L., Gong, Y., Xie, J., Fu, Y., Jiang, D., Li, G., Collinge, D. B., Chen, W., & Cheng, J. (2018). A cerato-platanin protein SsCP1 targets plant PR1 and contributes to virulence of *Sclerotinia sclerotiorum. New Phytologist*, *217*(2), 739–755. https://doi.org/10.1111/nph.14842

Yu, H., Duan, J., Wang, B., & Jiang, X. (2012). The function of snodprot in the cerato-platanin family from Dactylellina cionopaga in nematophagous fungi. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *76*(10), 1835–1842. https://doi.org/10.1271/bbb.120173

Zhang, F., Bunterngsook, B., Li, J.-X., Zhao, X.-Q., Champreda, V., Liu, C.-G., & Bai, F.-W. (2019). Regulation and production of lignocellulolytic enzymes from *Trichoderma reesei* for biofuels production. In *Advances in Bioenergy* (1st ed., Vol. 4). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/bs.aibe.2019.03.001

Zhang, J., Chen, Y., Wu, C., Liu, P., Wang, W., & Wei, D. (2019). The transcription factor ACE3 controls cellulase activities and lactose metabolism via two additional regulators in the fungus *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(48), 18435–18450. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008497

Zhang, W., Kou, Y., Xu, J., Cao, Y., Zhao, G., Shao, J., Wang, H., Wang, Z., Bao, X., Chen, G., & Liu, W. (2013). Two major facilitator superfamily sugar transporters from *Trichoderma reesei* and their roles in induction of cellulase biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(46), 32861–32872. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.505826

Zheng, F., Yang, R., Cao, Y., Zhang, W., Lv, X., Meng, X., Zhong, Y., Chen, G., Zhou, Q., & Liu, W. (2020). Engineering *Trichoderma reesei* for Hyperproduction of Cellulases on Glucose to Efficiently Saccharify Pretreated Corncobs. *Journal of*

Agricultural and Food Chemistry. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04663

Zin, N. A., & Badaluddin, N. A. (2020). Biological functions of *Trichoderma spp*. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, *65*(2), 168–178. https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.09.003

Zou, G., Bao, D., Wang, Y., Zhou, S., Xiao, M., Yang, Z., Wang, Y., & Zhou, Z. (2021). Alleviating product inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase complex with a product-activated mushroom endoglucanase. *Bioresource Technology*, *319*(September 2020), 124119. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124119

9 - Anexos

9.1 - Anexo 1

Tabela 9: Categorias do GO com seus respectivos genes *up* e *down* regulados exclusivamente em QM6a e Δ*epl1* na condição celulose.

GO	Linhagem	Proteína ID	Descrição	Regulação	*Fold Change*
Transcription regulator activity	QM6a	105979	Zn(2-C6 fungal-type DNA-binding domain	*up*	1,78
Transcription regulator activity	QM6a	58389	Zn(2-C6 fungal-type DNA-binding domain superfamily	*up*	1,02
Transcription regulator activity	QM6a	26163	Transcription factor domain	*up*	1,38
Transcription regulator activity	QM6a	65854	Zn(2-C6 fungal-type DNA-binding domain	*up*	1,10
Transcription regulator activity	QM6a	108013	Zn(2-C6 fungal-type DNA-binding domain superfamily	*up*	2,43
Transcription regulator activity	QM6a	112129	Zn(2-C6 fungal-type DNA-binding domain	*up*	2,58
Transcription regulator activity	QM6a	109549	Zn(2-C6 fungal-type DNA-binding domain superfamily	*up*	1,15
Transcription regulator activity	QM6a	62386	Zn(2-C6 fungal-type DNA-binding domain superfamily	*up*	1,13
Transcription regulator activity	QM6a	103158	Transcription factor domain	*up*	1,34
Transcription regulator activity	QM6a	104380	Fungal transcription factor	*up*	2,74
Transcription regulator activity	QM6a	69695	Zn(2-C6 fungal-type DNA-binding domain	*up*	1,28
D-threo-aldose 1-dehydrogenase activity	QM6a	5502	NADP-dependent oxidoreductase domain	*down*	-1,20
D-threo-aldose 1-dehydrogenase activity	QM6a	58675	NADP-dependent oxidoreductase domain superfamily	*down*	-1,71
D-threo-aldose 1-dehydrogenase activity	QM6a	82204	Aldo-keto reductase	*down*	-1,75

GO	Linhagem	Proteína ID	Descrição	Regulação	*Fold Change*
D-threo-aldose 1-dehydrogenase activity	QM6a	68336	NADP-dependent oxidoreductase domain superfamily	*down*	-5,42
Phosphotransferase activity	QM6a	21716	Aliphatic acid kinase	*down*	-1,62
Phosphotransferase activity	QM6a	21406	Phosphoglycerate kinase superfamily	*down*	-1,38
Oxidoreductase activity	Δ*epl1*	106245	Catalase immune-responsive domain	*up*	5,53
Oxidoreductase activity	Δ*epl1*	67538	Catalase	*up*	1,27
Oxidoreductase activity	Δ*epl1*	54129	Haem peroxidase superfamily	*up*	2,17
Catalase activity	Δ*epl1*	67538	Catalase	*up*	1,27
Catalase activity	Δ*epl1*	106245	Catalase immune-responsive domain	*up*	5,53
Antioxidant activity	Δ*epl1*	106245	Catalase immune-responsive domain	*up*	5,53
Antioxidant activity	Δ*epl1*	67538	Catalase	*up*	1,27
Antioxidant activity	Δ*epl1*	54129	Haem peroxidase superfamily	*up*	2,17
Oxidoreductase activity	Δ*epl1*	59396	FAD/NAD(P-binding domain superfamily	*up*	3,55
Oxidoreductase activity	Δ*epl1*	70988	Flavin monooxygenase FMO	*up*	6,39
Phosphatidylserine decarboxylase activity	Δ*epl1*	29642	Phosphatidylserine decarboxylase-related	*up*	2,79
Nitronate monooxygenase activity	Δ*epl1*	63397	Nitronate monooxygenase	*up*	1,18
Polysaccharide binding	Δ*epl1*	73643	Glycoside hydrolase	*up*	5,81
Polysaccharide binding	Δ*epl1*	123992	Expansin/pollen allergen	*up*	1,60
Carbohydrate binding	Δ*epl1*	25224	Glycoside hydrolase family 65	*up*	1,15
Carbohydrate binding	Δ*epl1*	60635	Alpha-1,2-mannosidase	*up*	2,98

GO	Linhagem	Proteína ID	Descrição	Regulação	*Fold Change*
Carbohydrate binding	Δ*epl1*	73643	Glycoside hydrolase, family 61	*up*	5,81
Transporter activity	Δ*epl1*	80091	MFS transporter superfamily	*up*	1,71
Transporter activity	Δ*epl1*	56684	MFS transporter superfamily	*up*	2,11
Transporter activity	Δ*epl1*	55634	MFS transporter superfamily	*up*	1,88
Transporter activity	Δ*epl1*	54230	Multi antimicrobial extrusion protein	*up*	1,62
Transporter activity	Δ*epl1*	26160	Sugar transporter	*up*	2,04
Transporter activity	Δ*epl1*	54036	Major facilitator superfamily domain	*up*	1,75
Transporter activity	Δ*epl1*	3405	Major facilitator, sugar transporter-like	*up*	1,19
Transporter activity	Δ*epl1*	55630	Major facilitator superfamily domain	*up*	1,02
Transporter activity	Δ*epl1*	102953	MFS transporter superfamily	*up*	1,13
Transporter activity	Δ*epl1*	60177	Major facilitator superfamily	*up*	1,87
Transporter activity	Δ*epl1*	70108	MFS transporter superfamily	*up*	1,60
Transporter activity	Δ*epl1*	62172	Amino acid/polyamine transporter I	*up*	1,25
Transporter activity	Δ*epl1*	61374	MFS transporter superfamily	*up*	1,37
Transporter activity	Δ*epl1*	123473	MFS transporter superfamily	*up*	1,36
Transporter activity	Δ*epl1*	54972	Major facilitator superfamily domain	*up*	1,55
Transporter activity	Δ*epl1*	82309	Major facilitator superfamily domain	*up*	1,08
Transporter activity	Δ*epl1*	41590	Ccc1 family	*down*	-133

GO	Linhagem	Proteína ID	Descrição	Regulação	*Fold Change*
Glycosyl compound metabolic process	QM6a	70377	Nucleoside phosphorylase superfamily	*up*	1,31
Glycosyl compound metabolic process	QM6a	57280	Nucleoside phosphorylase superfamily	*up*	1,28
Glycosyl compound metabolic process	QM6a	67795	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase	*up*	3,41
Glycosyl compound metabolic process	QM6a	111680	Nucleoside phosphorylase domain	*up*	1,20
Regulation of RNA biosynthetic process	QM6a	105979	Zn(2-C6 fungal-type DNA-binding domain	*up*	1,78
Regulation of RNA biosynthetic process	QM6a	58389	Zn(2-C6 fungal-type DNA-binding	*up*	1,02
Regulation of RNA biosynthetic process	QM6a	26163	Transcription factor domain	*up*	1,38
Regulation of RNA biosynthetic process	QM6a	65854	Zn(2-C6 fungal-type DNA-binding domain	*up*	1,10
Regulation of RNA biosynthetic process	QM6a	108013	Zn(2-C6 fungal-type DNA-binding domain superfamily	*up*	2,43
Regulation of RNA biosynthetic process	QM6a	112129	Zn(2-C6 fungal-type DNA-binding domain	*up*	2,58
Regulation of RNA biosynthetic process	QM6a	109549	Zn(2-C6 fungal-type DNA-binding domain superfamily	*up*	1,15
Regulation of RNA biosynthetic process	QM6a	62386	Zn(2-C6 fungal-type DNA-binding domain superfamily	*up*	1,13
Regulation of RNA biosynthetic process	QM6a	103158	Transcription factor domain	*up*	1,34
Regulation of RNA biosynthetic process	QM6a	104380	Fungal transcription factor	*up*	2,74
Regulation of RNA biosynthetic process	QM6a	69695	Zn(2-C6 fungal-type DNA-binding domain	*up*	1,28
Organic acid transport	Δ*epl1*	62172	Amino acid/polyamine transporter I	*up*	1,25

GO	Linhagem	Proteína ID	Descrição	Regulação	*Fold Change*
Organic acid transport	Δ*epl1*	109122	Amino acid permease/ SLC12A domain	*up*	1,25
Organic acid transport	Δ*epl1*	5787	Amino acid permease	*up*	2,58
Response to oxidative stress	Δ*epl1*	54129	Haem peroxidase superfamily	*up*	2,17
Response to oxidative stress	Δ*epl1*	67538	Catalase	*up*	1,27
Response to oxidative stress	Δ*epl1*	106245	Catalase immune-responsive domain	*up*	5,53
Reproductive process	Δ*epl1*	65286	Nuclear fusion protein Kar5	*up*	1,11
Reproductive process	Δ*epl1*	55126	E3 ubiquitin-protein ligase CCNB1IP1	*up*	1,97
mRNA cleavage		69288	RNase P subunit Pop5/Rpp14/Rnp2-like	*down*	-1,54
Mitochondrial membrane	QM6a	104106	Mitochondrial carrier protein	*up*	3,13
Microtubule associated complex	QM6a	106731	HAUS augmin-like complex subunit 1	*up*	1,47
DASH complex	QM6a	33840	DASH complex subunit Dad2	*up*	1,19
Extracellular region	Δ*epl1*	123992	Expansin/pollen allergen	*up*	1,60
Extracellular region	Δ*epl1*	72072	Alpha/Beta hydrolase fold	*up*	2,02
Extracellular region	Δ*epl1*	73643	Glycoside hydrolase, family 61	*up*	5,81
Endoribonuclease complex	Δ*epl1*	69288	RNase P subunit Pop5/Rpp14/Rnp2-like	*down*	-1,54

Tabela 10: Categorias do GO com seus respectivos genes *up* e *down* regulados simultaneamente em QM6a e Δ*epl1* na condição celulose.

Linhagem	*Fold Change*	Proteína ID	GO	Descrição	Regulação
QM6a	2,32	70803	oxidoreductase activity	Haem peroxidase	*up*
Δ*epl1*	3,46				
QM6a	5,35	120371	oxidoreductase activity	Catalase core domain	*up*
Δ*epl1*	7,36				
QM6a	6,63	58472	oxidoreductase activity	Catalase	*up*
Δ*epl1*	8,90				
QM6a	2,32	70803	catalase activity	Haem peroxidase	*up*
Δ*epl1*	3,46				
QM6a	5,35	120371	catalase activity	Catalase core domain	*up*
Δ*epl1*	7,36				
QM6a	6,63	58472	catalase activity	Catalase	*up*
Δ*epl1*	8,90				
QM6a	2,60	71532	glucosidase activity	Glycoside hydrolase family 71	*up*
Δ*epl1*	3,67				
QM6a	6,11	120873	glucosidase activity	Glycoside hydrolase family 71	*up*
Δ*epl1*	3,34				
QM6a	2,32	70803	heme binding	Haem peroxidase	*up*
Δ*epl1*	3,46				
QM6a	1,20	75713	heme binding	Cytochrome P450	*up*
Δ*epl1*	2,43				
QM6a	11,17	73344	heme binding	Cytochrome P450	*up*
Δ*epl1*	7,23				
QM6a	3,85	70842	heme binding	Cytochrome P450	*up*
Δ*epl1*	5,89				
QM6a	5,35	120371	heme binding	Catalase core domain	*up*
Δ*epl1*	7,36				
QM6a	4,26	54260	heme binding	Indoleamine 2,3-dioxygenase	*up*
Δ*epl1*	8,22				
QM6a	6,63	58472	heme binding	Catalase	*up*
Δ*epl1*	8,90				

Linhagem	*Fold Change*	Proteína ID	GO	Descrição	Regulação
QM6a	5,94	59377	heme binding	Cytochrome P450	*up*
Δ*epl1*	4,58				
QM6a	2,90	64869	heme binding	Cytochrome P450 superfamily	*up*
Δ*epl1*	1,41				
QM6a	2,34	49898	glucosamine-containing compound metabolic process	Glucosamine-6-phosphate isomerase	*up*
Δ*epl1*	3,47				
QM6a	1,73	79671	glucosamine-containing compound metabolic process	Metal-dependent hydrolase	*up*
Δ*epl1*	2,89				
QM6a	2,34	49898	amino sugar metabolic process	NagB/RpiA transferase-like	*up*
Δ*epl1*	3,47				
QM6a	1,73	79671	amino sugar metabolic process	Metal-dependent hydrolase	*up*
Δ*epl1*	2,89				
QM6a	2,32	70803	response to oxidative stress	Haem peroxidase	*up*
Δ*epl1*	3,46				
QM6a	5,35	120371	response to oxidative stress	Catalase core domain	*up*
Δ*epl1*	7,36				
QM6a	6,63	58472	response to oxidative stress	Catalase	*up*
Δ*epl1*	8,90				
QM6a	4,13	57204	lipid catabolic process	Lipase	*up*
Δ*epl1*	5,76				
QM6a	1,54	123572	lipid catabolic process	Platelet-activating factor acetylhydrolase-like	*up*
Δ*epl1*	2,86				
QM6a	6,70	56911	amide transport	Sodium/solute symporter	*up*
Δ*epl1*	2,79				
QM6a	8,90	112564	cytoplasm	Aminoacyl-tRNA synthetase	*up*
Δ*epl1*	6,05				
QM6a	-3,35	123251	heme binding	Flavoprotein pyridine nucleotide cytochrome reductase-like	*down*
Δ*epl1*	-1,78				
QM6a	-5,40	70984	heme binding	Cytochrome P450 superfamily	*down*
Δ*epl1*	-3,32				

9.2- Anexo 2

Carbohydrate metabolism
- 00010 Glycolysis / Gluconeogenesis (2)
- 00030 Pentose phosphate pathway (1)
- 00051 Fructose and mannose metabolism (1)
- 00052 Galactose metabolism (1)
- 00053 Ascorbate and aldarate metabolism (1)
- 00500 Starch and sucrose metabolism (1)
- 00520 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism (4)
- 00620 Pyruvate metabolism (1)
- 00630 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism (1)
- 00650 Butanoate metabolism (1)

Energy metabolism
- 00710 Carbon fixation in photosynthetic organisms (1)
- 00680 Methane metabolism (1)
- 00910 Nitrogen metabolism (1)
- 00920 Sulfur metabolism (1)

Lipid metabolism
- 00071 Fatty acid degradation (1)
- 00561 Glycerolipid metabolism (1)
- 00565 Ether lipid metabolism (1)

Amino acid metabolism
- 00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism (1)
- 00280 Valine, leucine and isoleucine degradation (2)
- 00310 Lysine degradation (1)
- 00220 Arginine biosynthesis (1)
- 00330 Arginine and proline metabolism (1)
- 00340 Histidine metabolism (1)
- 00360 Phenylalanine metabolism (1)
- 00380 Tryptophan metabolism (4)

Metabolism of other amino acids
- 00410 beta-Alanine metabolism (1)

Glycan biosynthesis and metabolism
- 00511 Other glycan degradation (1)

Metabolism of cofactors and vitamins
- 00770 Pantothenate and CoA biosynthesis (1)
- 00130 Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis (2)

Metabolism of terpenoids and polyketides
- 00981 Insect hormone biosynthesis (1)
- 00903 Limonene and pinene degradation (1)

Biosynthesis of other secondary metabolites
- 00940 Phenylpropanoid biosynthesis (2)
- 00521 Streptomycin biosynthesis (1)
- 00524 Neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis (1)

Xenobiotics biodegradation and metabolism
- 00625 Chloroalkane and chloroalkene degradation (1)
- 00621 Dioxin degradation (1)
- 00626 Naphthalene degradation (1)
- 00624 Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation (1)
- 00983 Drug metabolism - other enzymes (1)

Genetic Information Processing

Translation
- 00970 Aminoacyl-tRNA biosynthesis (1)

Environmental Information Processing

Membrane transport
- 02010 ABC transporters (1)

Signal transduction
- 04016 MAPK signaling pathway - plant (1)
- 04011 MAPK signaling pathway - yeast (2)
- 04066 HIF-1 signaling pathway (1)
- 04068 FoxO signaling pathway (1)

Signaling molecules and interaction
- 04080 Neuroactive ligand-receptor interaction (1)

Cellular Processes

Transport and catabolism
- 04146 Peroxisome (1)

Cell growth and death
- 04111 Cell cycle - yeast (1)
- 04113 Meiosis - yeast (1)

Figura 24: Vias metabólicas compartilhadas entre QM6a e Δ*epl1*.

Carbohydrate metabolism
- 00010 Glycolysis / Gluconeogenesis (2)
- 00040 Pentose and glucuronate interconversions (2)
- 00051 Fructose and mannose metabolism (1)
- 00052 Galactose metabolism (1)
- 00500 Starch and sucrose metabolism (3)
- 00520 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism (3
- 00620 Pyruvate metabolism (1)
- 00640 Propanoate metabolism (1)

Energy metabolism
- 00710 Carbon fixation in photosynthetic organisms (1)
- 00720 Carbon fixation pathways in prokaryotes (1)
- 00680 Methane metabolism (2)
- 00910 Nitrogen metabolism (2)

Lipid metabolism
- 00561 Glycerolipid metabolism (1)
- 00564 Glycerophospholipid metabolism (1)

Nucleotide metabolism
- 00230 Purine metabolism (1)
- 00240 Pyrimidine metabolism (1)

Amino acid metabolism
- 00270 Cysteine and methionine metabolism (1)

Metabolism of other amino acids
- 00430 Taurine and hypotaurine metabolism (2)
- 00460 Cyanoamino acid metabolism (2)
- 00480 Glutathione metabolism (1)

Glycan biosynthesis and metabolism
- 00513 Various types of N-glycan biosynthesis (1)
- 00531 Glycosaminoglycan degradation (1)
- 00603 Glycosphingolipid biosynthesis - globo and isoglobo series (1)
- 00604 Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series (1)
- 00511 Other glycan degradation (1)

Metabolism of cofactors and vitamins
- 00760 Nicotinate and nicotinamide metabolism (1)
- 00860 Porphyrin and chlorophyll metabolism (1)

Biosynthesis of other secondary metabolites
- 00940 Phenylpropanoid biosynthesis (1)

Xenobiotics biodegradation and metabolism
- 00627 Aminobenzoate degradation (1)
- 00623 Toluene degradation (1)
- 00980 Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 (2)
- 00982 Drug metabolism - cytochrome P450 (1)
- 00983 Drug metabolism - other enzymes (2)

Genetic Information Processing

Replication and repair
- 03450 Non-homologous end-joining (1)

Environmental Information Processing

Signal transduction
- 04066 HIF-1 signaling pathway (1)
- 04020 Calcium signaling pathway (1)
- 04024 cAMP signaling pathway (1)
- 04022 cGMP-PKG signaling pathway (2)
- 04152 AMPK signaling pathway (1)

Cellular Processes

Transport and catabolism
- 04142 Lysosome (2)

Cell growth and death
- 04217 Necroptosis (1)
- 04218 Cellular senescence (1)

Figura 25: Vias metabólicas exclusivas em QM6a

Carbohydrate metabolism
- 00030 Pentose phosphate pathway (1)
- 00630 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism (1)

Energy metabolism
- 00190 Oxidative phosphorylation (1)
- 00680 Methane metabolism (1)
- 00910 Nitrogen metabolism (1)

Lipid metabolism
- 00564 Glycerophospholipid metabolism (1)
- 00590 Arachidonic acid metabolism (1)

Amino acid metabolism
- 00380 Tryptophan metabolism (1)

Metabolism of other amino acids
- 00480 Glutathione metabolism (1)

Glycan biosynthesis and metabolism
- 00531 Glycosaminoglycan degradation (1)
- 00511 Other glycan degradation (1)

Xenobiotics biodegradation and metabolism
- 00625 Chloroalkane and chloroalkene degradation (1)
- 00980 Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 (1)
- 00982 Drug metabolism - cytochrome P450 (2)
- 00983 Drug metabolism - other enzymes (1)

Genetic Information Processing

Translation
- 03008 Ribosome biogenesis in eukaryotes (1)

Folding, sorting and degradation
- 04141 Protein processing in endoplasmic reticulum (1)

Environmental Information Processing

Signal transduction
- 04016 MAPK signaling pathway - plant (1)
- 04011 MAPK signaling pathway - yeast (2)
- 04068 FoxO signaling pathway (1)

Cellular Processes

Transport and catabolism
- 04142 Lysosome (1)
- 04146 Peroxisome (2)

Figura 26: Vias metabólicas exclusivas em Δ*epl1*.