



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

ANÁLISE DO SECRETOMA DA INTERAÇÃO ENTRE *Trichoderma Harzianum* E OS ESTAGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO FITOPÁTOGENO *Sclerotinia Sclerotiorum*.

ROGÉRIO FRAGA TROIAN

BRASÍLIA, AGOSTO DE 2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

ANÁLISE DO SECRETOMA DA INTERAÇÃO ENTRE *Trichoderma Harzianum* E OS ESTAGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO FITOPÁTOGENO *Sclerotinia Sclerotiorum*.

ROGÉRIO FRAGA TROIAN

Tese apresentada à Pós-graduação em Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília (UnB) para a obtenção do Título de Doutor em Ciências (Biologia Molecular)

Orientador: Dr Cirano José Ulhoa

BRASÍLIA, AGOSTO DE 2014

RESUMO

Trichoderma harzianum tem recebido considerável atenção como potencial agente de controle biológico, agindo como um micoparasita contra diversos fitopatógenos habitantes do solo, incluindo *Sclerotinia sclerotiorum*. O objetivo deste estudo foi visualizar por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a interação entre *T. harzianum* e *S. sclerotiorum*, assim como mapear e identificar as proteínas secretadas por *T. harzianum* quando cultivado na presença de parede celular, apotécio e escleródio de *S. sclerotiorum*. Nos testes de interação por MEV, *T. harzianum* provou ser um potente antagonista de *S. sclerotiorum*, mostrando que as hifas do antagonista penetraram nas estruturas do fitopatógeno. Posteriormente foram construídos os mapas bidimensionais permitindo a visualização das diferentes proteínas secretadas de *T. harzianum* quando cultivadas na presença de diferentes etapas da vida de *S. sclerotiorum* sendo que um total de 139 spots foram analisados, e destes foram identificados 63. Das proteínas identificadas no secretoma 5 são exclusivas quando cultivadas em meio contendo apotécio, 9 em meio contendo escleródio e 4 contendo parede celular sendo 11 proteínas expressas nas 3 condições. A expressão dos genes foi feita usando PCR em tempo real a partir de RNA total de *T. harzianum* quando cultivadas na presença das três fases do ciclo de vida *S. sclerotiorum* (micélio, escleródios e apotécio) confirmando as proteínas secretadas. Nossos resultados fornecem um passo para a compreensão do processo de micoparasitismo entre *T. harzianum* durante sua interação com *S. sclerotiorum* permitindo a identificação das diferentes proteínas secretadas quando cultivadas com as fases do ciclo de vida desse fitopatógeno.

Palavras-chave: *Trichoderma harzianum*, *S. sclerotiorum*, micoparasitismo, secretoma, MEV.

ABSTRACT

Trichoderma harzianum has received considerable attention as a potential biological control agent, acting as a mycoparasite against several soilborne plant pathogens including *Sclerotinia sclerotiorum*. The objective of this study was to visualize electron microscopy (SEM), the interaction between *T. harzianum* and *S. sclerotiorum* as well as map and identify the proteins secreted by *T. harzianum* when grown in the presence of cell wall, and sclerotia of apothecium *S. sclerotiorum*. In MEV interaction tests, *T. harzianum* proved to be a potent antagonist of *S. sclerotiorum*, showing that antagonist hyphae penetrated pathogen structures. After dimensional maps were constructed allowing the visualization of the different secreted proteins from *T. harzianum* when cultured in the presence of different stages of the life of *S. sclerotiorum* with a total of 139 spots were analyzed and identified 63. Of these proteins identified in secretome 5 are unique when grown in medium containing apothecium, 9 in medium containing sclerotia and 4 containing cell wall being 11 proteins expressed in the 3 conditions. Expression of the gene was done using real-time PCR from total RNA of *T. harzianum* when cultured in the presence of the three phases of the lifecycle *S. sclerotiorum* (mycelium and sclerotia apothecium) confirming secreted proteins. Our results provide a step towards understanding the mycoparasitism process between *T. harzianum* during their interaction with *S. sclerotiorum* allowing the identification of various secreted proteins when grown with the phases of the life of this pathogen cycle.

Keywords: *Trichoderma harzianum*, *S. sclerotiorum*, mycoparasitism, secretome, SEM.

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Gostaria, por este fato, de expressar toda a minha gratidão e apreço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta tarefa se tornasse uma realidade. A todos quero manifestar os meus sinceros agradecimentos.

Agradeço primeiramente a Deus, pois em minha vida sempre pude contar com uma força maior que guiou o meu caminho, conduzindo à mim, oportunidades que aproveitei.

Faço um agradecimento especial a Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro concedido, através da bolsa de doutorado, sem a qual não seria possível a conclusão deste trabalho científico.

Faço um agradecimento especial a meu orientador Prof^o Dr. Cirano José Ulhoa que me recebeu em seu laboratório e me deu a oportunidade de aperfeiçoar minha vida acadêmica em um laboratório bem equipado e preocupado com o bem público, onde se procura sempre justificar, em forma de publicações de qualidade, todo o suporte financeiro recebido.

Agradeço em especial minha família, que sempre colocou os estudos em primeiro lugar. Especialmente minha mãe, que sempre me deu apoio emocional e sólida formação até à minha juventude, que me proporcionou a continuidade nos estudos até à chegada a este doutorado, os meus eternos agradecimentos.

Agradeço a Ana Flávia, minha esposa, essa sim esteve presente na maioria dos dias (dias inteiros) durante quase toda minha graduação, meu mestrado e doutorado. Esperou 10 anos pelo casamento e contou com uma ajudinha do professor Cirano para que esse se realizasse antes da defesa.

Aos professores Luis Arthur, Ivan, Chico, Kênia, Raphaela e Guilherme pelas inúmeras “discussões de protocolo e coletas de materiais” depois de um longo dia de trabalho.

À professora Val, minha co-orientadora por sempre me receber muito bem no laboratório e me ajudar nos momentos difíceis. Além dos assuntos de suma importância (engraçadíssimos) que sempre debatíamos com nossa grande amiga Marcela Suriani, a Tchutchuca do laboratório.

Ao Marcelo e o Andrei que sempre me ajudaram bastante e com certeza teria sido muito mais difícil a conclusão desse doutorado sem eles. Mas ganhar deles no futebol era fácil.

Aos amigos do Laboratório de Enzimologia, Pabline, Saulo, Fabiano, Amanda, Alonso, Juliana, Kenia, Gabriela, pela amizade e companheirismo.

Aos meus amigos que nunca estiveram ausentes, agradeço a amizade e o carinho que sempre me disponibilizaram.

À todos, um muito obrigado por permitirem que esta tese seja uma realidade.

Lista de figuras

Página

- Figura 1.** Formação de micélio branco e escleródios na haste da soja causada pelo fungo *S.sclerotiorum* _____ 02
- Figura 2.** Ciclo de vida da *Sclerotinia sclerotiorum* _____ 03
- Figura 3-**Evento de pré-contato na interação de *Trichoderma*-Fungo hospedeiro. Fase 1) Produção de compostos de alta massa molecular pelo micoparasita que atinge o hospedeiro. Fase 2) Geração de produtos de baixa massa molecular que são liberados do parede celular do hospedeiro e que ativam a cascata de expressão de genes. _____ 09
- Figura 4:** Culturas mostrando a colonização da cultura de *S. sclerotiorum* por *T. harzianum*. Após 24 horas do início da interação a avaliação foi realizada através da visualização da frequência de enrolamento do antagonista sobre a hifa hospedeira na zona de interação com auxílio de microscópio ótico _____ 25
- Figura 5:** Microscopia da interação entre *T. harzianum* (303/02) e *S.sclerotiorum*. AB- Confronto entre hifas de *T. harzianum* e hifas de *S.sclerotiorum*, CD-Confronto entre *T. harzianum* e escleródio, EF Confronto entre *T. harzianum* e apotécio. Foi observado que o fungo *T. harzianum* foi capaz de parasitar o fitopatógeno em todos seus estágios de desenvolvimento. _____ 27
- Figura 6:** Eletromicrografia de varredura da interação entre *T. harzianum* e *S.sclerotiorum*: A, B e C; enrolamento entre as hifas de *T. harzianum* micélio e *S.sclerotiorum* micélio: D, E e F; hifas de *T. harzianum* penetrando a estrutura de apotécio: G, H e I ; hifas de *T. harzianum* penetrando a estrutura de escleródio _____ 28
- Figura 7:** Mapas proteômicos com as proteínas identificadas durante a interação entre *T.harzianum*(303/02) e Apotécio, Micélio e Escleródio de *S. sclerotiorum* _____ 33
- Figura 8:** Total de spots identificados e diferencialmente identificados das induções com escleródio, parede celular e apotécio. _____ 36
- Figura 9** placas mostrando o micoparasitismo entre o *T. harzianum* e as estruturas do fitopatogeno *S.sclerotiorum*. A área destacada é o local da coleta de material para a análise da expressão gênica *in vivo*. Legenda T- *T. harzianum*,M- micélio, A-apotécio, S- escleródio _____ 45

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1. Resumo das β -1,3-glucanase purificadas de <i>Trichoderma harzianum</i> _____	10
Tabela 2. Classificação de peptidases de acordo com o sítio catalítico._____	11
Tabela 3- Atividade enzimática dos sobrenadantes das diferentes condições de crescimento. Todos os experimentos foram realizados em triplicata_____	30
Tabela 4. Resumo dos parâmetros observados dos géis bidimensionais de cada condição e sua correlação com sua réplica._____	34
Tabela 5. De um total de 139 spots analisados foram identificadas 35 proteínas diferentes condições_____	35
Tabela 6. Proteínas identificadas do secretoma de <i>T. harzianum</i> 303/02 quando cultivado em diferentes condições._____	39
Tabela 7. Análise <i>in vitro</i> da expressão gênica do micélio de <i>T.harzianum</i> cultivado em diferentes condições. Os dados são expressos em \log_2 _____	43
Tabela 8. Análise <i>in vivo</i> da expressão gênica do micélio de <i>T.harzianum</i> cultivado em diferentes condições. Os dados são expressos em \log_2 _____	46

Lista de Abreviaturas e Siglas

2-DE Eletroforese Bidimensional
ABF Arabinofuranosidase
ACN Acetonitrila
AF Acido Fórmico
BCA *Bicinchoninic Acid* (Ácido bicinconínico)
BDA Batata Dextrose Agar
BGL Beta-Glicosidase
BLAST *Basic Local Alignment Search Tool* (Ferramenta Básica de Busca por Alinhamento Local)
BSA *Bovine Soroalbumin* (Albumina Sérica Bovina)
CAZymes *Carbohydrate-Active Enzymes* (Enzimas Ativas em Carboidratos)
DNS Ácido Dinitro-Salicílico
DTT Ditioneitol
ESI *Electrospray Ionization* (Ionização por *electrospray*)
GlcNAc N-Acetilglicosamina
GHS Glicosilhidrolases
GT Glicosiltransferase
IAA Iodoacetamida
IEF Focalização Isoelétrica
IPG *Immobilized pHGradient* (Gradiente de pH Imobilizado)
kDa kilo Dalton
LC *Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida)
LC-MS/MS *Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry* (Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial)
MALDI *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz)
MGF MASCOT generic format (formato genérico MASCOT)
MM Massa Molecular
MS *Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas)
MS/MS *Tandem mass spectrometry* (Espectrometria de massas sequencial)
m/z Razão massa/carga
NAG N-Acetilglicosaminidases
pI Ponto Isoelétrico
PMF *Peptide Mass Fingerprint*
rpm Rotações por minuto
SDS-PAGE *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em presença de SDS)
SDS *Sodium Dodecyl Sulfate*(Dodecil Sulfato de Sódio)
TFA Ácido Trifluoroacético
TOF *Time of Flight* (Tempo de Voo)

Sumário

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	01
2.1 Cultura do Feijoeiro	01
2.2 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib) de Bary	02
2.3 Controle tradicional	04
2.4 Controle biológico	04
2.5 O gênero <i>Trichoderma</i>	06
2.6 Proteômica de fungos filamentosos	11
3 JUSTIFICATIVA	16
4 OBJETIVO GERAL	17
4.1 Objetivos Específicos	17
5 MATERIAIS E MÉTODOS	18
5.1 Microrganismos utilizados e condições de cultura	18
5.2 Avaliação da capacidade antagonista de <i>Trichoderma spp.</i> , contra hifa do fungo <i>S. sclerotiorum</i>	
5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura	18
5.4 Produção da parede celular de <i>S. sclerotiorum</i>	18
5.5 Cultivos em meio líquido	19
5.6 Dosagens de proteínas Totais	19
5.7 Ensaio Enzimáticos	19
5.7.1 α -mannosidase	19
5.7.2 Fosfatase ácida	20
5.7.3 N-acetil-B-D-glicosaminidase	20
5.7.4 β -glicosidase	20
5.7.5 α -L-arabinofuranosidase	20
5.7.6 Protease Total	20
5.7.7 Quitinase	21
5.7.8 β -1,3-glicanase	21
5.8 Preparo das amostras para construção dos mapas proteômicos	21
5.9 Isoeletrofocalização (IEF)	21
5.10 Equilíbrio das tiras de Gradiente de pH imobilizado (IPG)	22
5.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	22
5.12 Coloração dos géis bidimensionais	22
5.13 Análise dos mapas Proteômicos	22
5.14 Preparo das amostras para análise por espectrometria de massas	22

5.15	Espectrometria de massas, análise dos espectros e identificação das proteínas.	
5.16	PCR em tempo real	24
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
7	CONCLUSÃO	49
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
9	ANEXOS	64

1. Introdução

O Ministério da Agricultura (Conab) estimou para 2010/11 uma produção de feijão de 3,45 milhões de toneladas, sendo produzido em cada hectare de terra plantada 965 toneladas. Estes valores são 6% maior do que os obtidos para os cinco anos anteriores. Grande parte dessa produção é utilizada para atender o mercado interno, devido ao aumento da demanda e perdas causadas por doenças fúngicas (SILVA, 2011). A produção de feijão brasileira e mundial sofrem perdas de até 60% causadas por fungos como *Colletotrichum lindemuthianum* (anthracnose), *Sclerotinia sclerotiorum* (mofo branco), *Rhizoctonia solani* (podridão da raiz), *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* (murcha de fusarium), e outros fungos do solo (HAGEDORN, 1986). As hifas desses fitopatógenos penetram na planta diretamente ou através de feridas e aberturas naturais, promovendo a podridão da raiz, reduzindo vigor de plântulas e, conseqüentemente, causando redução na produção agrícola.

Fungos filamentosos têm se tornado importantes ferramentas para as indústrias de biotecnologia devido à sua habilidade de secretar grande quantidade de proteínas, formulação de uma variedade de produtos terapêuticos e as propriedades de biocontrole exibidas por algumas espécies contra nematóides, insetos e fungos fitopatogênicos (CARLILE et al, 2001).

O potencial das espécies do gênero *Trichoderma* (Ascomycetes, Hypocreales) como agentes de controle biológico foi reconhecido primeiramente por WEINDLING (1932), que descreveu a ação micoparasítica de *Trichoderma lignorum* em *Rhizoctonia* spp. e seus efeitos benéficos no controle da patologia na planta. Essa descoberta estimulou várias pesquisas nessa área e hoje algumas espécies, como *Trichoderma harzianum*, vêm sendo utilizadas com sucesso no controle biológico de fungos fitopatogênicos de interesse na agricultura (WOO et al., 2006).

O *Trichoderma* tem como principal habitat o solo/rizosfera, embora a diversidade máxima desta espécie ocorra na superfície, na casca de árvore, cogumelos selvagens e micotroficamente é vista como a característica ancestral deste gênero (DRUZHININA et al 2011). Em cultura podem ser facilmente reconhecidos pelas estruturas características de seus conídios. Além disto, caracterizam-se por utilizarem uma grande variedade de compostos como fonte de carbono e nitrogênio, serem resistentes a inibidores produzidos por outros microrganismos e tolerantes a diferentes tipos de fungicidas (KULLNING et al, 2000).

O micoparasitismo de *Trichoderma* é um processo complexo, de base molecular ainda em muito desconhecido. A atividade micoparasita de *Trichoderma* spp. pode ser devido a produção de antibióticos, competição por nutrientes, produção de enzimas envolvidas na hidrólise da parede celular ou uma combinação dessas atividades antagonistas (KUBICEK et al., 2001). O conhecimento do complemento total de proteínas intracelulares, extracelulares e de parede celular de *Trichoderma* é necessário para identificar produtos gênicos desempenhando funções no controle biológico. Num contexto mais amplo, a separação e identificação de proteínas de *Trichoderma* poderão fornecer possíveis alvos com atividade antifúngica para uso biológico e terapêutico.

Estratégias proteômicas têm sido uma importante ferramenta em estudos de padrão de expressão de proteínas em diferentes condições de crescimento e interação entre *Trichoderma* spp., e fungos fitopatogênicos (GRINYER et al., 2005; MARRA et al., 2006). A proteômica fornece informações mais completas relacionadas às vias de sinalização, conjunto de proteínas reguladoras, modificações

pós-traducionais e outras informações importantes em estados fisiológicos normais e anormais de células e/ou organismos através de técnicas capazes de identificação de um conjunto de proteínas produzidas por uma célula, bem como as interações e interdependência dos processos fisiológicos (ROCHA *et al.*, 2005).

Nesse trabalho foi avaliada através da microscopia eletrônica de varredura a interação das hifas do *T. harzianum* 303/02 com todas as estruturas do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (apotécio, escleródio e micélio). Construídos os mapas bidimensionais para visualizar o perfil das diferentes proteínas secretadas do isolado *T. harzianum* 303/02, com a utilização de abordagens proteômicas, interagindo com as estruturas das diferentes fases do ciclo de vida do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (apotécio, escleródio e micélio).

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Cultura do feijoeiro

Um dos produtos agrícolas de maior importância sócio-econômica no Brasil é o grão do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). Sua importância decorre da área efetivamente cultivada, volume, valor de produção, geração de mão-de-obra, e por ser uma das principais fontes de proteína e energia na alimentação da maior parte da população brasileira (OLIVEIRA *et al.*, 1997; BROUGHTON *et al.* 2003).

De acordo com o IBGE (2013), A estimativa da produção nacional de feijão, considerando as três safras do produto, foi de 2.959.310 toneladas, 3,3% menor que a informada em julho. A Região Nordeste foi a principal responsável por esta avaliação negativa da produção de feijão, em relação ao levantamento anterior ocorreu uma redução de 9,9%. A Região Centro-Oeste também apresentou decréscimo de 6,4% na estimativa de produção. A 1ª safra de feijão participa com 38,2% da produção nacional de feijão em grão, a 2ª safra participa com 45,0% e a 3ª safra participa com 16,8%. Alguns dos fatores levantados como críticos para este déficit de produção são: estiagem, o uso de sementes de má qualidade e a suscetibilidade desta cultura a doenças, que além de impactar na sua produtividade, reduzem o valor comercial do produto.

Fungos fitopatogênicos “de solo” têm sido relatados como os grandes responsáveis por grande parte da perda em lavouras no Brasil e no mundo, sendo que anualmente milhões de dólares são gastos no seu controle (OARD *et al.*, 2004). Nas lavouras brasileiras, infecções causadas por patógenos “de solo” como *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, e pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* causam perdas de até 100% na produção de culturas suscetíveis, principalmente de feijão e batata, cultivadas nos Cerrados (CAFÉ FILHO & LOBO JR., 2000; HALL & NASSER, 1996), e são amplamente reconhecidas como um dos maiores desafios para a agricultura brasileira (LOBO JR., 2002). Estes fungos são parasitas não-especializados, geralmente polífagos, que utilizam matéria orgânica como substrato e que apresentam uma alta capacidade de colonizar resíduos vegetais no solo, bem como de infectar diferentes tipos de culturas e, por isto, causam doenças com sintomas similares (POLETTO *et al.*, 2006).

2.2 *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary

Sclerotinia sclerotiorum é um fitopatógeno de importância mundial por ocorrer tanto em regiões temperadas quanto tropicais ou subtropicais, com pelo menos 408 espécies de plantas hospedeiras. Seus danos manifestam-se com maior severidade em áreas com clima úmido, associado à alta umidade relativa (BOLTON et al, 2006).

A doença causada pelo patógeno *S.sclerotiorum* é mais conhecida como mofo branco, em função dos sintomas causados na planta. Na soja, os sintomas ocorrem geralmente no terço médio das plantas, atingindo a haste principal, pecíolos, folhas e vagens. Inicialmente, ocorre nas folhas encharcamento do limbo foliar, sendo que com a evolução da doença as folhas secam (Figura 1). Na haste principal observam-se, primeiramente, manchas de coloração parda e de consistência mole; com o progresso da doença, há a formação de micélio branco de aspecto cotonoso e, no final do ciclo (Figura 2), lesões avermelhadas a arroxeadas.

Figura 1. Formação de micélio branco e escleródios na haste da soja causada pelo fungo



S.sclerotiorum (Fonte: Jaccoud Filho, 2009)

O fitopatógeno *S. sclerotiorum* possui capacidade de formar estruturas de resistência denominadas de escleródios, que garantem sua sobrevivência por vários anos, mesmo em condições adversas, (LI et al., 2003). Escleródios são estruturas rígidas, assexuadas, constituídos por uma camada contínua de células melanizadas e apresentando um aspecto de hifas entrelaçadas. Os escleródios podem sobreviver no solo por vários anos na ausência de hospedeiros ou em condições desfavoráveis para o seu desenvolvimento (COLEY-SMITH & COOKE 1971). Nesta forma, de acordo com PURDY (1979 apud ETHUR, 2005) ocorre a germinação carpogênica ou micelogênica.

A germinação carpogênica é originária dos ascósporos de *S. sclerotiorum* que são produzidos no apotécio que resultam da germinação de escleródios na superfície do solo e representam sua principal fonte de inóculo (NAPOLEÃO et al., 2007). Os escleródios germinam e infectam a planta,

aparecendo inicialmente, como lesões encharcadas nas folhas ou outro tecido da parte aérea da planta que tenham entrado em contato com flores infectadas. Das flores infectadas as lesões se espalham rapidamente para as hastas, ramos e vagens que ficam cobertas por um micélio branco de aspecto de algodão, que produzem os escleródios (ETHUR, L.Z. et al., 2001; OLIVEIRA, S.H.F., 2005). A doença se torna mais prejudicial à planta após a queda das flores infectadas, que caem sobre outras partes da planta disseminando o fungo rapidamente pelos demais tecidos (OLIVEIRA, S.H.F., 2005).

Os escleródios desempenham papel muito importante no ciclo de vida de *S. sclerotiorum*, visto que são precursores dos apotécios, onde são formados os ascósporos que, em condições ideais, podem infectar as plantas, principalmente pelas flores. As flores servem como fonte básica de nutrientes para iniciar as infecções por esporos (HUNTER et al., 1978, SUN & YANG, 2000).

Ascósporos são o inóculo primário de epidemias em muitas culturas de plantas (LUMSDEN, 1979; PURDY, 1979; SCHWARTZ & STEADMAN, 1978). Eles são levados a longas distâncias para áreas vizinhas e infectam flores, folhas, frutos ou caules. Vários fatores influenciam a germinação dos escleródios desse fungo, tais como: os nutrientes do substrato no qual o escleródio é formado, a idade dos escleródios, os fatores ambientais como umidade, temperatura, luz, pH do solo, aeração e a profundidade na qual o escleródio se encontra no solo (WILLETS & WONG 1980).

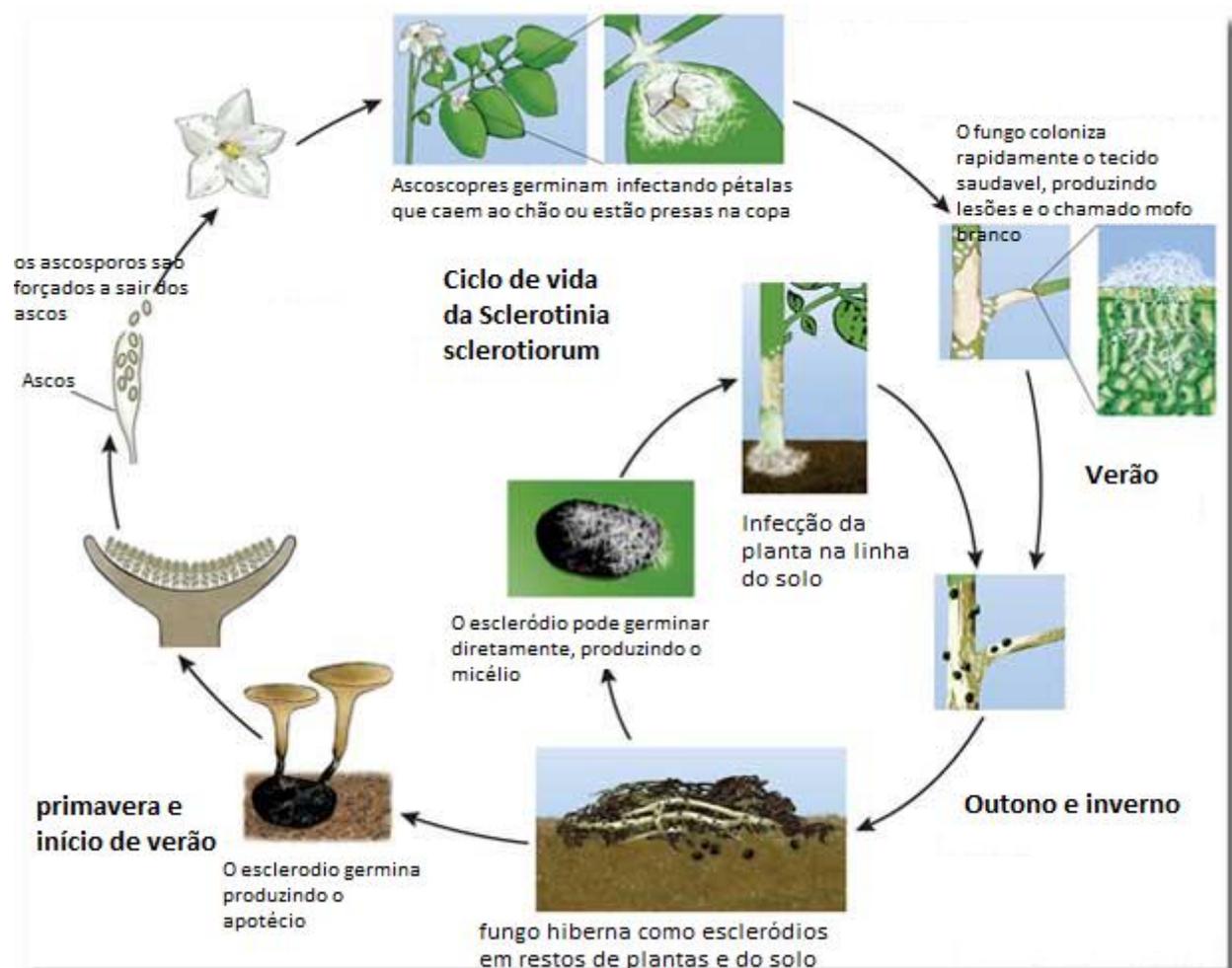


Figura 2. Ciclo de vida da *S.sclerotium* Phillip Wharton, 2006.(Adaptado)

As epidemias causadas por esse fitopatógeno nas culturas de soja e feijão têm sido responsáveis pela diminuição da produção agrícola brasileira, com perdas de até 40% em condições favoráveis para o desenvolvimento do fungo, tais como excesso de precipitação aliado a temperaturas amenas (ALMEIDA et al., 2005; LEITE, 2005; CARREGAL et al., 2010) Grande parte da perda em lavouras no Brasil e no mundo atribui-se aos fungos fitopatogênicos de solo, sendo que anualmente milhões de dólares são gastos no seu controle (OARD et al., 2004).

Medidas de Controle

2.3 Controle Tradicional

Atualmente ainda são utilizadas como medidas de controle de fungos fitopatogênicos, práticas agrícolas tradicionais como: queimadas para eliminar o excesso de resíduos pós-colheita, drenagem do solo, tratamento térmico da água, solarização, rotação de culturas e aplicação de fungicidas (MELO & AZEVEDO, 2000; SALLAM NASHWA et al., 2008).

Estas medidas nem sempre são totalmente eficientes principalmente em função da elevada taxa de sobrevivência de formas resistentes dos patógenos de solo em condições ambientais adversas, além da sua permanência em outras plantas hospedeiras, que podem funcionar como reservatórios (YANGUI, 2008).

A aplicação de fungicidas comerciais apesar de eficiente é um processo oneroso, uma vez que requer repetidas aplicações, leva à seleção de patógenos resistentes e ao surgimento de pragas secundárias. Além disto, os produtos químicos utilizados são tóxicos e poluentes, causando grande impacto ambiental e à saúde dos produtores agrícolas e consumidores (PUNJA & UTKHEDE, 2003). Outra desvantagem no uso de fungicidas está relacionada à sua inespecificidade, podendo eliminar microrganismos já estabelecidos no solo e benéficos às plantas, aumentando assim sua suscetibilidade aos patógenos de solo (PIRES et al., 2003).

Devido à pressão imposta pelas leis de impacto ambiental, a crescente preocupação da população com o meio ambiente e saúde, bem como pela necessidade de desenvolvimento de métodos de controle mais eficientes, a necessidade por novas estratégias de controle desses fitopatógenos são de suma importância. Isso para que o aumento na produtividade agrícola não dependa da utilização de medidas que acarretem em danos ambientais e riscos à saúde humana. (FRIGHETTO, 2000; DI PIERO, 2008)

2.4 Controle Biológico

Uma maneira sustentável para a agricultura no combate de doenças em lavouras no Brasil e no mundo é através da utilização do controle biológico. De acordo com EILENBERG (2006), o controle biológico é o uso de organismos vivos para suprimir a densidade populacional ou o impacto de um organismo patogênico específico, tornando-o menos abundante ou menos prejudicial do que ele seria sem a presença do agente de biocontrole. Um bom agente de biocontrole deve apresentar um grupo de

características comuns, como por exemplo, alta capacidade reprodutiva, habilidade de sobreviver sob condições desfavoráveis, eficiência na utilização de nutrientes, agressividade e antagonismo contra diferentes hospedeiros (BENÍTEZ et al., 2004). Desta forma, a eficiência do biocontrole está associada às propriedades antagonistas e aos mecanismos de ação que o agente de biocontrole apresentar.

O controle biológico, que se baseia no uso de microrganismos antagonistas, é uma das alternativas no combate a estes fitopatógenos. Dos microrganismos utilizados como antagonistas para o controle de fitopatógenos, 90% correspondem a diferentes isolados de *Trichoderma* spp. (BENÍTEZ et al., 2004).

O antagonismo é um processo complexo que pode ocorrer por diferentes mecanismos, ou por uma combinação destes, como a predação, amensalismo (antibiose), parasitismo, e pela competição por nutrientes, espaço e sítios de infecção. Uma das vantagens do emprego de fungos antagonistas é que estes podem ser introduzidos em ambientes diferentes dos quais foram isolados por serem capazes de estabelecer e parasitar o patógeno, bem como se adaptar ao micro habitat deste (MELO & AZEVEDO, 2000).

A utilização de microrganismos de biocontrole na identificação de genes envolvidos na indução de resposta de defesa e resistência em plantas hospedeiras têm sido estudadas e desta forma, podem também contribuir para o desenvolvimento de cultivares agrícolas resistentes a doenças de diferentes origens (PUNJA & UTKHEDE, 2003; FRANCHESCHINI et al., 2001). A indução de resposta de defesa e resistência pode ser obtida pela inoculação prévia ou concomitante da semente de interesse com um indutor, como microrganismos saprofíticos ou metabólitos microbianos. Este tratamento induz o aumento na síntese de produtos de defesa vegetal como proteínas de defesa (quitinases, β -1,3-glucanases, peroxidases e proteases), fitoalexinas e compostos sinalizadores (DI PIERO, 2008). Assim como, a produção de antibióticos, e a inativação de enzimas do fungo fitopatogênico (TSENG, 2008).

Diferentes espécies de fungos de solo já foram descritos como biocontroladores de fungos causadores de doenças vegetais, como por exemplo, *Chaetomium globosum*, *Ch. cochlioides* e *Ch. cupreum* que inibem o crescimento dos fitopatógenos *Curvularia lunata*, *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia oryzae*, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*; *Aspergillus niger* contra patógenos de podridão branca; *Gliocladium catenulatum* que reduz a incidência da doença de tombamento causado por *Pythium ultimum* e *R. solani* (PUNJA & UTKHEDE, 2003; FRAVEL, 2005; KAEWCHAI & SOYTONG, 2010).

Dos organismos que já foram identificados como agente de controle biológico de fungos fitopatogênicos, alguns são comercialmente viáveis, em função de sua efetividade em condições de campo (SALLAM NASHWA et al., 2008). Espécies de *Trichoderma*, principalmente, *Trichoderma harzianum* foram comercialmente utilizados como agentes de controle biológico contra os fungos fitopatogênicos *Botrytis cinerea*, *Phytophthora palmivora* e *Pythium* spp, no mamão, tabaco, mamona e culturas de feijão (MARRA et al 2006, MONTERO-BARRIENTOS et al 2011, GONZALEZ-FERNANDEZ et al 2010). Eles são capazes de reduzir a colonização de plantas e o crescimento do fungo hospedeiro usando uma combinação de mecanismos específicos, tais como micoparasitismo, antibiose e competição por espaço e nutrientes no ambiente rizosfera (SHORESH & HARMAN, 2010).

Um habitat bastante promissor para o isolamento de possíveis antagonistas é a rizosfera, sendo que desta já foram isoladas cerca de 1200 espécies com potencial de utilização como agente de

biocontrole (APUD BRIDGE, 2001). Dentre os produtos comercialmente disponíveis com eficácia comprovada tem sido demonstrado que as chances de sucesso aumentam quando os potenciais agentes de biocontrole são isolados do próprio ambiente em que serão posteriormente aplicados. HADAR et al. (1984) ressaltam que os isolados de *Trichoderma* nativos são mais adaptáveis ao solo que os introduzidos.

O sucesso das linhagens de *Trichoderma* como agentes de controle biológico se deve ao fato de que esses indivíduos têm uma alta capacidade de reprodução, habilidade de sobrevivência mesmo sob condições muito adversas, utilizando com eficiência os nutrientes presentes no meio. Podem modificar a rizosfera onde se encontram, são extremamente agressivos contra outros fungos fitopatogênicos e podendo ainda promover o crescimento da planta e mecanismos de defesa. Todas essas qualidades fazem com que indivíduos deste gênero estejam presentes em muito ambientes e em grande concentração (BENÍTEZ *et al.*, 2004).

2.5 O gênero *Trichoderma*

Trichoderma, fase imperfeita de *Hypocrea*, pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Ascomycetes, Ordem Hypocreales, Família Hypocreaceae (KIRK, 2012). O gênero *Trichoderma* foi proposto por Persoon (1794) para fungos que possuem um conjunto de características bem definidas, porém com espécies pouco delimitadas com base na morfologia. Na determinação do gênero, são consideradas as seguintes características: crescimento rápido, atingindo de 2 a 9 cm de diâmetro após quatro dias em meio de cultura (ESPOSITO & SILVA, 1998); colônias dispersas, flocosas, ou compactadas em tufo; tamanho e formato dos conídios variados; clamidósporos, às vezes presentes; coloração de conídios variando de verde a amarelo, ou até mesmo hialino. Possuem conidióforos bem definidos (SAMUELS, 1996) e os conídios formados nas extremidades de fiáides de hifas diferenciadas. Os conídios tendem a se agregar em massas e em algumas espécies, há dependência da luz para a esporulação (GRESSEL & HARTMANN, 1968).

O gênero *Trichoderma* compreende um grupo de fungos presentes em quase todos os tipos de solo, especialmente naqueles contendo matéria orgânica. As espécies de fungos do gênero *Trichoderma* são componentes dominantes na microflora presente em uma grande variedade de habitats. Essa característica especial se deve à sua grande capacidade metabólica e a sua natureza agressivamente competitiva. Esse fungo dificilmente causa doenças em plantas, recentemente foi demonstrado que *T. longibrachiatum* e *T. citrinoviride* podem atuar como patógenos oportunistas em mamíferos imunocomprometidos, incluindo-se seres humanos, causando infecções invasivas e reações alérgicas (DRUZHININA *et al.*, 2008).

Espécies do gênero *Trichoderma* são de grande interesse da biotecnologia; no entanto a sua utilização no biocontrole requer uma análise abrangente dos princípios biológicos da sua ação (MUKHERJEE *et al.*, 2012). O uso de fungicidas tem somente um efeito temporário e usualmente

necessitam aplicações repetidas durante o período de crescimento da lavoura, os agentes de controle biológico são capazes de se estabelecer no ecossistema, reproduzir, colonizar rizosfera, filosfera e rizoplane. Além disso, as estratégias de controle biológico são altamente compatíveis com as práticas de agriculturas autossustentáveis que são necessárias para a conservação dos recursos naturais para a agricultura (PÁDUA et al., 2007).

Além de uma capacidade adaptativa elevada apresentam também grande potencial de dispersão. A grande maioria das linhagens de *Trichoderma* de interesse comercial compreende fungos anamórficos (assexuados), que provavelmente são mitóticos e clonais.

Muitas espécies de *Trichoderma* são princípios ativos de biofungicidas, produzidos comercialmente, como o Tricodex®, utilizado no controle de fungos causadores do apodrecimento pós-colheita da maçã; Trichodermil®, a base de *T. harzianum*, atua sobre vários patógenos de diferentes culturas, entre os quais, *R. solani* em feijão; combinada com o *T. polysporum*, constitui o composto denominado Binab-T®, que é recomendado para o controle do apodrecimento da madeira (RICARD, 1981; MELO, 1998). Outro composto, o GlioGard® tem como agente ativo *T. virens* e é utilizado na prevenção do tombamento de plântulas causado por espécies de *Phytophthora* e *Rhizoctonia* (LUMSDEN & LOCKE, 1989). Uma linhagem de *T. stromaticum* foi incorporada na formulação do biofungicida do Tricovab® para o controle da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro desde 1996.

São diversos os mecanismos de interação entre patógeno e antagonista que dão suporte ao controle biológico. Estes são: antibiose, competição, parasitismo, hipovirulência, predação, indução de resistência e promoção de crescimento vegetal. Entretanto, um mesmo antagonista pode atuar por vários mecanismos contra determinado patógeno, o que para o controle biológico é uma característica altamente favorável (BETTIOL & GHINI, 1995, HARMAN, 2011).

2.5.1 Antibiose

AMORIM et al. (2011) e BENÍTEZ et al. (2004) definem antibiose como a interação entre organismos na qual indivíduos de uma população secretam metabólitos voláteis ou não-voláteis capazes de inibir ou impedir o desenvolvimento dos indivíduos de uma população de outra espécie. Sendo estes metabólitos denominados de antibióticos. Há na literatura relatos de pelo menos 100 diferentes antibióticos, com capacidade de inibição sobre diversas espécies de fungos fitopatogênicos. *Trichoderma virens*, por exemplo, produz dois antibióticos efetivos contra patógenos de solo: gliotoxina, que inibe o crescimento de *Rhizoctonia* e de *S. sclerotium*, e gliovirina, capaz de inibir *Phytophthora* e *Phytophthora*.

2.5.2 Indução de resistência

Indução de resistência é um mecanismo de controle biológico indireto, onde a planta responde à agressão dos patógenos através da ativação dos mecanismos latentes de resistência. Esse processo ocorre quando as plantas expostas a um agente indutor, biótico ou abiótico, têm seus mecanismos de defesa ativados, não apenas no sítio de indução como também em outros locais distantes, de forma mais ou menos generalizada (ROMEIRO, 1999). Essa ativação pode durar períodos de tempo variáveis. Com a ativação destes a planta pode produzir fitoalexinas, lignina adicional das células e compostos fenólicos (HORSFALL & COWLING, 1980; AMORIM et al., 2011).

2.5.3 Competição

Outra forma de interação antagônica é a competição, considerada pré-requisito para qualquer agente de controle biológico, ou seja, o agente controlador deve ser capaz de crescer de maneira mais eficiente que o patógeno no local da infecção, para que o controle seja adequado (AMORIM *et al.*, 2011). Competição, segundo BETTIOL & GHINI (1995), refere-se à interação entre dois ou mais organismos empenhados numa mesma ação ou substrato, disputando recursos específicos, tais como espaço, nutrientes, água e luz. Como exemplos ilustrativos desse mecanismo, citam-se espécies de *Trichoderma* capazes de mobilizar e absorver prontamente os nutrientes à sua volta e de utilizar diferentes fontes de carbono, desse modo, multiplicando-se e colonizando rapidamente a rizosfera (HARMAN, 2004). Além disso, várias espécies desse gênero se caracterizam por apresentarem resistência a diferentes compostos tóxicos, tanto àqueles produzidos e liberados pelas plantas em resposta ao ataque por patógenos, quanto agrotóxicos comumente utilizados na agricultura (CHET *et al.*, 1997; BENÍTEZ *et al.*, 2004; HARMAN, 2006). Esse mecanismo, embora importante, é extremamente difícil de ser comprovado experimentalmente (HARMAN, 2000).

2.5.4 Parasitismo

Parasitismo designa a relação nutricional entre dois seres vivos em que um deles, o parasita, obtém todo ou parte de seu alimento à custa do outro, o hospedeiro. Quando o hospedeiro é um fitopatógeno, o parasita é designado hiperparasita. Druzhinina *et al.* (2011) ampliou o conceito de micoparasitismo para outra relação nutricional entre fungos e micotrofismo, definida para incluir a capacidade de *Trichoderma* alimentar-se de fungos mortos. O mecanismo mais importante empregado pelo *T.harzianum* é o micoparasitismo, que consiste no ataque direto ao fungo hospedeiro.

O processo envolve eventos sequenciais que incluem reconhecimento, ataque, penetração e morte do hospedeiro. Durante o ataque *T.harzianum* secreta ao meio extracelular enzimas degradadoras da parede celular que incluem endoquitinases, β -glicosidase, manosidases, fosfatases ácidas e proteases as quais agem sinergicamente causando o controle efetivo de micoparasitas como *Botrytis cinérea*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium* sp (MONTEIRO *et al.*, 2010). Quando se estabelece o contato físico entre micoparasita e hospedeiro, as hifas do primeiro aderem-se por meio de estruturas especializadas denominadas 'apressórios' e enovelam-se ao redor das hifas do hospedeiro (CHET *et al.*, 1998).

Durante o processo de micoparasitismo, *Trichoderma* secreta enzimas degradadoras da parede celular (CWDEs) que hidrolisam a parede celular do fungo hospedeiro liberando oligômeros da parede celular do patógeno (Fig. 3) ativando a expressão de genes envolvidos no micoparasitismo (VINALE *et al.*, 2008).

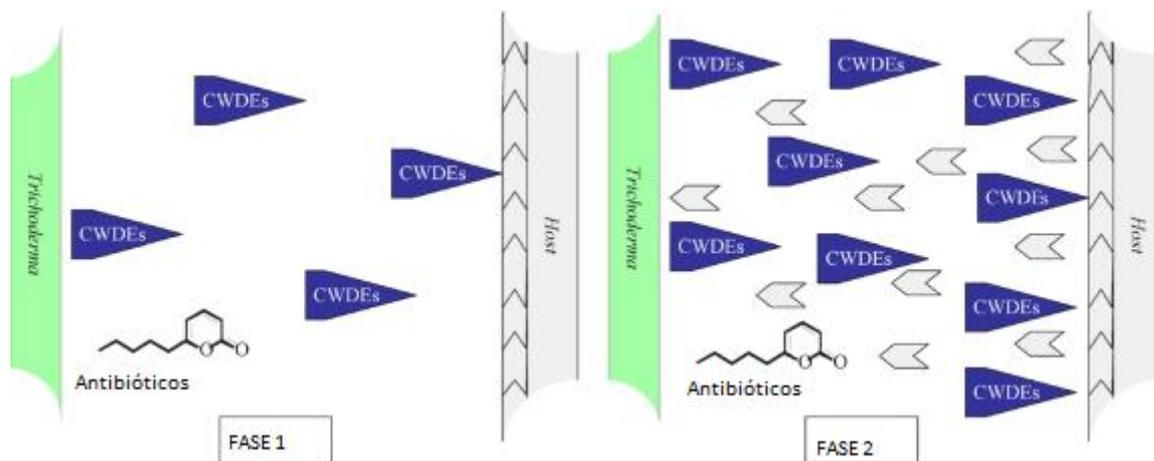


Figura 3-Evento de pré-contato na interação de *Trichoderma*-Fungo hospedeiro. Fase 1) Produção de compostos de alta massa molecular pelo micoparasita que atinge o hospedeiro. Fase 2) Geração de produtos de baixa massa molecular que são liberados da parede celular do hospedeiro e que ativam a cascata de expressão de genes. Fonte: Vinale et al. (2008).

O micoparasita, então, penetra no lúmen da hifa do hospedeiro, onde assimila e metaboliza o conteúdo protoplasmático, utilizando seu aparato enzimático (AMORIM et al., 2011). Os fungos do gênero *Trichoderma* são considerados excelentes hiperparasitas, atacando hifas e estruturas de reprodução e sobrevivência dos patógenos de plantas, assim reduzindo a capacidade infectiva e o inóculo do patógeno para infecções subsequentes (BETTIOL & GHINI, 1995).

2.5.5 Enzimas relacionadas ao parasitismo

As enzimas relacionadas ao processo de micoparasitismo são liberadas de acordo com a composição da parede celular dos fitopatógenos. Em geral, a parede celular desses fungos é composta por quitina, como um esqueleto estrutural disposto em camadas regulares ordenadas e β -1,3-glicanas (que podem possuir ramificações β -1,6) como material de preenchimento disposto de uma maneira amórfica (ALMEIDA et al., 2007). Proteínas também estão presentes na parede celular, principalmente associadas com hetero ou homopolissacarídeos (FONTAINE et al., 2000). Devido a essa composição, a lise da parede celular de fitopatógenos é feita principalmente por β -1,3-glicanases, quitinases e proteases.

2.5.5.1 Quitinases

As enzimas do sistema quitinolítico são divididas em: (a) endoquitinase (EC 3.2.1.14) cliva a quitina, polímero linear insolúvel formado por unidades de β -1,4-N-acetilglicosamina, e quitolímeros randomicamente e libera uma mistura de produtos solúveis de baixo peso molecular de diferentes tamanhos com diacetilquitobiose como o primeiro produto a ser formado; (b) quitina 1,4- quitobiosidase ou exoquitinase (EC 3.2.1.14) cliva a quitina e quitolímeros progressivamente da terminação não redutora e libera somente diacetilquitobiose como produto final; e (c) N-acetil- β -D-glicosaminidase (EC 3.2.1.52) cliva o polímero de quitina e quitolímeros progressivamente da terminação não redutora e libera somente N-acetilglicosamina como produto final e é a única enzima capaz de hidrolisar diacetilquitobiose (LORITO et al., 1998).

2.5.5.2 Glicanases

As β -1,3-glicanases hidrolisam a cadeia β -1,3-glicana, polímero constituído de resíduos de D-glicose ligados em uma configuração β -1,3, por um de dois mecanismos possíveis: (a) exo- β -1,3-glicanase hidrolisa as β -glicanas pela clivagem seqüencial de resíduos de glicose das extremidades não-redutoras, liberando glicose como produto; e (b) endo- β -1,3-glicanases hidrolisam a cadeia de β -glicanas em sítios aleatórios liberando pequenos oligossacarídeos.

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

Tabela 1. Resumo das β -1,3-glicanase purificadas de *T. harzianum*.

Designação	Massa Molecular (kDA)	Tipos de β -1,3-glicanase	Referências
GLUC 40	40	Exo-1,3- β	Duboudieu <i>et al.</i> (1985)
GLUC 31	31	Exo-1,3- β	Kitamoto <i>et al.</i> (1987)
GLUC 76	76	Endo -1,3- β	Lorito <i>et al.</i> (1994)
GLUC 78	78	Endo -1,3- β	De La Cruz <i>et al.</i> (1995)
GLUC 110	110	Exo-1,3- β	Cohen-Kupiec <i>et al.</i> (1999)
GLUC 36	36	Endo-1,3- β	Noronha & Ulhoa (2000)
GLUC 29	29	Endo-1,3- β	Noronha & Ulhoa (2000)
GLUC 75	75	Exo-1,3- β	Monteiro & Ulhoa (2006)
GLUC 27	27	Exo-1,3- β	Ramada <i>et al.</i> (2010)

2.5.5.3 Proteases

As proteases são divididas, segundo o Comitê de Nomenclatura Enzimática (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB; www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/), em seis famílias, de acordo com o seu mecanismo de catálise e ainda podem ser classificadas de

acordo com seu modo de ação em: (a) endopeptidases: (EC 3.4.21-99) clivam ligações no interior da cadeia polipeptídica; e (b) carboxipeptidases (EC 3.4.11- 18): atuam na extremidade da cadeia polipeptídica (Tabela 2) (MONTEIRO, 2008).

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

Tabela 2. Classificação de peptidases de acordo com o sítio catalítico.

Peptidases	EC subclasses
CARBOXIPEPTIDASES	
Serina-carboxipeptidase	3.4.16
Metal-carboxipeptidase	3.4.17
Cisteína-carboxipeptidase	3.4.18
ENDOPEPTIDASES	
Serina-endopeptidase	3.4.21
Cisteína-endopeptidase	3.4.22
Aspártico-endopeptidase	3.4.23
Metal-endopeptidase	3.4.24
Treonina-endopeptidase	3.4.25
Endopeptidase com mecanismo catalítico desconhecido	3.4.99

Assim, é notório que fungos do gênero *Trichoderma* possuem um grande potencial em diversas áreas, tais como industrial, ambiental e agrícola. Logo, estudos que visem elucidar melhor o potencial desses fungos são de fundamental importância no intuito de aperfeiçoar os seus benefícios.

2.6 Proteômica de Fungos Filamentosos

Diversos genomas fúngicos foram completamente sequenciados e vários outros projetos de sequenciamento de genomas de fungos estão em andamento. Um grande desafio da biologia está no entendimento da expressão, função e regulação do grupo total de proteínas codificadas nos genomas fúngicos, o que forneceria importantes informações sobre mecanismos de colonização fúngica, interações planta-fungo, patogênese e adaptação ecológica (BHADAURIA et al. 2007).

2.6.1 Proteômica

A proteômica é definida como a análise sistemática do proteoma, que segundo Mark Wilkins (1994), trata-se do conjunto de proteínas expressas por um genoma, célula ou tecido em uma condição

específica. Através da proteômica é possível identificar e quantificar o número de proteínas que influenciam diretamente a bioquímica celular, e prover uma análise do estado celular, ou mudanças que ocorrem durante o crescimento, desenvolvimento ou resposta a fatores ambientais, tornando-se assim uma tecnologia útil no estudo de sistemas biológicos altamente dinâmicos e complexos.

A pesquisa em proteômica de fungos filamentosos restringe-se devido às dificuldades associadas à eficiente extração de proteínas e a falta de sequências genômicas de fungos nas bases de dados. As informações das sequências genômicas disponibilizam uma grande quantidade de informações moleculares, pois, a partir das sequências de DNA dos genes é possível a dedução da sequência de aminoácidos das proteínas que são codificadas por estes. Porém, a chegada de novas técnicas de extração e separação de proteínas, combinada com avanços na espectrometria de massas (MS), tem permitido aumentar o conhecimento sobre a expressão diferencial de proteínas de fungos com relevância biotecnológica, em relação às variáveis ambientais (CARBERRY et al. 2007).

O recente desenvolvimento da proteômica e genômica de fungos filamentosos complementadas com metodologias clássicas de cinética de enzimas e bioensaios tem melhorado a precisão e sensibilidade na análise das proteínas secretadas, participação das mesmas na interação hospedeiro-patógeno, assim como mecanismos de regulação e secreção. Com ajuda de ferramentas da bioinformática mediante estudos *in silico*, importantes na confirmação dos dados teóricos disponíveis nas bases de dados, pode-se criar uma rede de informação sobre proteínas a fim de ajudar no nosso entendimento sobre mecanismos de ação, estabilidade e resposta dos secretomas fúngicos e o potencial deste a nível biotecnológico (PEREIRA et al. 2007).

Uma alta diversidade de proteínas encontram-se presentes nos proteomas de fungos filamentosos, heterogeneidade proporcionada pela aparição de múltiplas modificações pós traducionais, como glicosilação, fosforilação, sulfonação, acetilação e metilação, splicing alternativo entre outras, que são extremamente importantes porque determinam a função, estabilidade e localização das proteínas (KIM et al. 2007).

Um dos principais estudos em proteômica de fungos filamentosos foi realizado por Grinyer e colaboradores (2004-b) no qual foi analisado o sub-proteoma da mitocôndria do fungo *T. harzianum* conseguindo-se a eficiente extração das proteínas contidas na mitocôndria e a posterior separação de centenas de proteínas por 2-DE e identificação positiva de 31 spots, combinando técnicas de MALDI TOF (MS) e LC-MS/MS. Algumas das proteínas identificadas incluíram *cistrans* isomerases, gliceraldeído 3- fosfato desidrogenases, fosfoglicerato cinases, enolases, β - fosfogluconate desidrogenases, assim como proteínas de choque térmico.

O proteoma intracelular do fungo *T. harzianum* foi estudado pela primeira vez por Grinyer et al. (2004-a) utilizando em paralelo vários métodos para a identificação de proteínas (MALDI TOF/TOF, LC-MS MS, sequenciamento *de novo*) a fim de aumentar a quantidade de proteínas identificadas, considerando a limitada informação de proteínas de *T. harzianum* disponíveis nas bases de dados e o genoma não sequenciado da espécie. Algumas das proteínas identificadas foram HSP60, HSP80, fator de iniciação eucariótico 4a, actina, fosfoglicerato quinase, gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase e 6- fosfogluconato desidrogenase, entre outras.

Foi descrito por Grinyer e colaboradores. (2007), o mapeamento proteômico da sub-unidade 20S do proteasoma de *T. reesei*, identificando algumas proteínas UPR (*unfolded protein response*) como a proteína regulada por glicose, chaperonas que incluíram HSP 70, HSP98, e o regulador negativo UPR, serina/treonina fosfatase, algumas proteínas de interação também foram identificadas, como a 14-3-3 gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, transaldolase, enolase, ATPases e fatores de alongação e tradução.

Outros fungos filamentosos também já tiveram seu sub-proteoma analisados, por exemplo, o sub-proteoma da membrana de *Neurospora crassa*, *Phanerochaete chrysosporium* (SCHMITT et al. 2006; HERNÁNDEZ-MACEDO et al. 2002) proteoma intracelular de *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus* (ASIF et al. 2007; CARBERRY et al. 2006; BRUNEAU et al. 2001), *Botrytis cinerea* e *Sclerotinia sclerotium* (FERNÁNDEZ-ACERO et al. 2007).

Análise do Secretoma

Considerado como uma fração do proteoma total do organismo, ou seja, um sub-proteoma, está o secretoma, que segundo a definição dada por Tjalsma *et al.*(2000) é o conjunto de enzimas e demais proteínas secretadas por um determinado tipo celular ou por um conjunto de células, assim como a maquinaria responsável pela secreção destas proteínas. Análises do secretoma de fungos filamentosos são indispensáveis para conhecer a identidade e função do arsenal de enzimas hidrolíticas extracelulares que participam na degradação de compostos lignocelulósicos e outros biopolímeros em resposta à adaptação a diferentes fontes de carbono e nitrogênio, visando uma aplicação biotecnológica de tais enzimas (BOUWS et al. 2008)

As modificações pós-traducionais (MPT) são um passo essencial no processamento de proteínas secretadas e ativas biologicamente. A glicosilação é a mais abundante e diversa forma de MPT, ocorre como resultado da união de um glicano a um resíduo de asparagina recebendo o nome de N-glicosilação, ou O-glicosilação, quando o glicano se une a serina ou treonina (DESPHANDE et al.2008).

Outras pesquisas em secretômica de fungos filamentosos incluíram a análise das proteínas secretadas pelo fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em meios de cultura contendo exoesqueleto de *Callosobruchus maculatos*, coleóptero que ataca cultivos de cotilédôneas (MURAD *et al.* 2006); análise do exoproteoma do fungo fitopatogênico, *Fusarium graminearum* crescido sobre glicose e diferentes paredes celulares vegetais (Phalip *et al.* 2005); análise da expressão de proteínas extracelulares do fungo *Phanerochaete chrysosporium* cultivado meio líquido e sólido (SATO *et al.* 2007); perfil proteômico do fungo *Monascus pilosus* durante crescimento em condições limitantes de nitrogênio (LIN *et al.* 2008) e estudo proteômico da interação entre *Trichoderma atroviride*, plantas e fungos fitopatogênicos (MARRA *et al.* 2006).

No caso de *Trichoderma* sp, a maquinaria de modificações gera tanto O quanto N-oligossacarídeos. A O-glicosilação de proteínas em fungos do gênero *Trichoderma* ocorre de forma semelhante ao processo encontrado em *S. cerevisiae*. Um resíduo de manose do dolicol fosfato

manose, é transferido no retículo endoplasmático por ação da O-manosil transferase ao grupo OH da serina ou treonina. O oligossacarídeo é posteriormente alongado no complexo de Golgi com a adição de mais sete resíduos de manose por manosiltransferases que utilizam guanosina difosfato manose (GDP-manose) como doador de manosil no processo de alongação. A O-glicosilação em *Trichoderma* sp, está associada á secreção e estabilidade de uma das principais enzimas extracelulares, a celobiohidrolase I (CBHI), mantendo uma distância fixa entre o domínio catalítico e de união ao substrato (DESPHANDE et al. 2008).

As proteínas secretadas por *Trichoderma* sp, também podem ser N-glicosiladas. O processo de N-glicosilação em eucariotas requer o oligossacarídeo dolicol fosfato, o qual é transferido por ação da oligosacaril transferase à asparagina localizada na sequencia consenso (Asn-X-Ser/Thr). Em *Trichoderma* sp, a CBHI, possui quatro sítios de N-glicosilação, todos localizados no domínio catalítico. A estrutura dos N-saccarídeos vai depender do fungo e condições de cultivo (KRUSZEWSKA et al. 2008).

Um das maneiras de se estudar proteínas secretadas é através da construção de mapas proteômicos, pois esta técnica permite a comparação e análise dos perfis protéicos expressos sob diferentes condições fisiológicas. Esses mapas compreendem a separação das proteínas por eletroforese em géis bidimensionais de poliacrilamida separando as proteínas inicialmente pelos pontos isoelétricos em um gradiente de pH e posteriormente pelas massas moleculares.

Uma das vantagens da eletroforese bidimensional é a separação simultânea e eficiente das proteínas em uma amostra fornecendo informações do ponto isoelétrico, massa molecular, expressão, abundância relativa e modificações pós traducionais observadas pelas alterações na mobilidade eletroforética. Proteínas contendo grupos fosfatos podem ser identificadas em eletroforese bidimensional através de amostras marcadas com ³²P (CHAVES, 2004). Muito embora apresente vantagens é preciso ressaltar que a análise proteômica encontra ainda dificuldades com modificações pós traducionais das proteínas. Apenas as proteínas mais abundantes da célula são identificadas por meio de eletroforese bidimensional.

Foram realizados por Suárez e colaboradores (2005) experimentos relacionados ao controle biológico de *T. harzianum*, foi feita uma análise proteômica da produção das proteínas extracelulares, avaliando as variações que ocorriam no secretoma do fungo, quando crescia em presença de quitina e paredes celulares de fungos fitopatogênicos como *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* e *Phytophthora ultimum*, demonstrando diferenças significantes nos mapas bidimensionais das proteínas extracelulares e a presença de proteases tipo tripsina e uma nova aspartato-protease (P6281), proteínas que tem um papel fundamental na atividade parasítica de *Trichoderma* sp.

A secretômica de *Trichoderma* sp e outros *Ascomycetes* tem sido abordada por diversos pesquisadores no mundo inteiro como por exemplo os experimentos realizados por Medina et al. (2004), na análise das proteínas secretadas diferencialmente expressas por *Aspergillus flavus*, utilizando para o crescimento diferentes fontes de carbono (glicose, batata dextrose e rutina), achando proteínas comuns aos três meios, como proteases alcalinas, β 1-3 endoglucanases, glucoamilase, aminopeptidase e β -glicosidases, entre outras. Duas das proteínas acharam-se únicas para o meio de

Batata Dextrose, 10 para o meio onde a glicose foi a fonte de carbono e finalmente 18 proteínas achadas só para a degradação de rutina.

Outra abordagem proteômica trata da identificação de proteínas extracelulares formadas constitutivamente de *Hypocrea atroviridis* (*T. atroviride*). O fungo foi cultivado em glicose e o secretoma examinado por mapas proteômicos. Dois spots predominantes foram identificados por MALDI/MS e revelaram ser a mesma proteína (massa molecular de 12629 Da e pI 5.5-5.7) provavelmente representando monômero e o dímero. O gene correspondente foi clonado de *H. atroviridis* e denominado *ep1* pela similaridade com a família cerato-platanina de *Ceratocystis fimbriata* e Snodprot1 de *Phaeosphaeria nodorum*, que são relatadas por estarem envolvidas na resposta de defesa de plantas a patógenos e elicitação à resposta de defesa pela planta (SEIDL et al., 2006).

A análise do secretoma do fungo *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivado em diferentes meios suplementados com parede celular de *Fusarium solani* mostrou que foram identificadas um total de 94 proteínas em 105 proteínas retirados de mapas 2-DE. A única proteína observada em todas as condições foi EPL1. Nos meios suplementados com parede celular de *Fusarium solani*, foram identificadas diferentes hidrolases tais como quitinases, β -1,3-glucanases, glucoamilases, α -1,3-glucanases e proteases, juntamente com outras proteínas com funções não conhecidas no micoparasitismo, como NPP1 e cys (RAMADA et al 2014).

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

TSENG et al. (2008) estudaram as proteínas secretadas por *T. harzianum* ETS323 em resposta a *Rhizoctonia solani*, avaliando as diferenças das proteínas secretadas por ele quando crescido em meios contendo diferentes fontes de carbono (glicose, glicose + micélio de *R. solani* desativado e micélio de *R. solani*). Foram selecionadas 43 bandas, das quais 35 exibiram sinais de LC-MS/MS. No total, 8 proteínas foram identificadas [glicosil hidrolase 37 kDa, glicosil hidrolase 118 kDa, possível l-aminoácido oxidase (*T. harzianum*), possível protease aspártica (*T. harzianum*), β -glicosidase 92 kDa, endoquitinase 42 kDa (*Trichoderma* sp.), β -glicosidase 94 kDa, serina protease alcalina].

YANG et al. (2009) também avaliaram o secretoma de *T. harzianum* quando crescido na presença de parede celular de *Botrytis cinerea*. Atividades enzimáticas evidenciaram a secreção de algumas proteínas que degradam parede celular como quitinases, β -1,3(6)-glicanases, proteases. Dos géis obtidos, 100 bandas foram retiradas, 91 exibiram sinais de LC-MS/MS e 3proteínas foram identificadas (l-aminoácido oxidase, endoquitinase,), sendo todas elas de espécies de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. hamatum* e *T. harzianum*, respectivamente).

Justificativa

O controle de *S. sclerotiorum* é dificultado principalmente pela formação de estruturas de resistência, os escleródios, que podem sobreviver vários anos na ausência do hospedeiro e não se tem verificado eficiência dos fungicidas normalmente utilizados. O fitopatógeno *S. sclerotiorum* apresenta um ciclo de vida bastante peculiar, aonde cada etapa deste ciclo pode acabar gerando a doença que é mais conhecida como mofo branco. Assim, as recomendações para o controle do mofo branco baseiam-se no sistema integrado de medidas, como rotação de culturas, espaçamento entrelinhas, uso de fungicidas, controle biológico (COSTA & COSTA, 2006).

Espécies de *Trichoderma* tem potencial como agentes de controle biológico por induzir a expressão de genes envolvidos na resistência de plantas, competirem por nutrientes ou espaço com outros fungos, produzir antibióticos voláteis e não voláteis e enzimas líticas. O sucesso de espécies de *Trichoderma* como agentes de controle biológico, é devido à sua elevada capacidade de reprodução, a capacidade de sobreviver sob condições severas, com alta eficiência na utilização de nutrientes, grande capacidade em parasitar fungos, inclusive fungos patogênicos de plantas e eficiência na promoção de mecanismos de defesa da planta. É sabido que o gênero *Trichoderma spp* apresenta espécies de elevado potencial para utilização como agentes de controle de doenças causadas por fitopatógenos como a *S. sclerotiorum*.

Portanto o estudo das proteínas secretadas do fungo *Trichoderma harzianum* durante a interação com as diferentes estruturas do ciclo de vida do fitopatógeno *S. sclerotiorum* é pioneiro e de suma importância para o entendimento dos mecanismos do micoparasitismo. Os conhecimentos gerados com este trabalho, agregado com outros, poderão ser utilizados para o desenvolvimento de novos produtos e processos biotecnológicos para o controle dessa e de outras doenças fúngicas em lavouras.

3. Objetivo Geral

Avaliar e identificar as proteínas secretadas durante a interação entre os fungos *T. harzianum* e *Sclerotinia sclerotiorum* em seus estágios de vida (apotecio, escleródio e parede celular) mediante o uso de técnicas enzimológicas clássicas integradas a técnicas proteômicas como eletroforese bidimensional (2-DE), espectrometria de massas e ferramentas genômicas.

4.1 Objetivos específicos

- Avaliação da atividade antagônica de isolados de *T.harzianum* contra hifas do fungo *S. sclerotiorum*;
- Avaliar por microscopia eletrônica de varredura o mecanismo de interação entre o isolado de *T. harzianum* e o fungo *S. sclerotiorum*;
- Identificar e caracterizar proteínas (secretoma) produzidas por *T. harzianum* durante crescimento na presença de escleródios, apotecio parede celular de *S. sclerotiorum* e glicose;
- Estudar a expressão de genes diferencialmente expressos em situações de confronto *in vitro* e *in vivo*, em modelo de simulação do micoparasitismo entre *T. harzianum* e *S. sclerotiorum*;

4. Metodologia Utilizada

4.1 Microrganismos utilizados e condições de cultura

Os fungos utilizados nesse trabalho, *Trichoderma harzianum* (303/02) e *Sclerotinia sclerotiorum* foram obtidos da coleção do Laboratório de Enzimologia (ICB/UFG) e da coleção Embrapa Arroz e Feijão, foram cultivados em meio MYG à temperatura ambiente por 10 dias e estocados a 4 °C.

5.2 Avaliação da atividade antagônica de *Trichoderma harzianum* contra hifas do fungo *S. sclerotiorum*

A capacidade de antagonismo de *Trichoderma harzianum* sobre o fitopatógeno escolhido nesse estudo foi avaliada. Para isso discos de 5mm das culturas foram tomados da margem de crescimento ativo do antagonista (*T. harzianum*) e do fitopatógeno (*S. sclerotiorum*), crescidos em meio BDA e submetidos ao teste de pareamento em placa. Após 24 horas do início da interação a avaliação foi realizada através da visualização da frequência de enrolamento do antagonista sobre a hifa hospedeira na zona de interação com auxílio de microscópio ótico. A documentação desse processo foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Discos de cultura de 5 mm foram retirados das áreas de interação após 72 horas de crescimento e fixados em solução à base de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 2%, em tampão cacodilato 0,05M pH 7,2 por 12 horas a 4° C. Após a fixação o material sofreu quatro lavagens em tampão cacodilato 0,05M pH 7,2 e foi pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio e tampão cacodilato em uma proporção 1:1 por 1 hora. Todas as amostras foram envolvidas em papel alumínio para que ficassem ao abrigo da luz. Posteriormente, o material sofreu uma série de quatro lavagens com tampão cacodilato 0,05M pH 7,2 e, em seguida foi desidratado em série aquosa de acetona a concentração de 30, 50, 70, 85, 95 e 100%. O material permaneceu por 15 minutos em cada uma das concentrações, sendo que para a concentração final de 100% o material recebeu duas lavagens de 10 minutos cada. Logo após a desidratação foi feita a secagem ao ponto crítico, utilizando-se o equipamento de secagem ao ponto crítico Balzers CPD 030 (Bal-Tec, Fuerstentum, Liechtenstein). Em seguida o material foi vaporizado com ouro, durante 150 segundos, usando-se o "Sputter Coater" Balzers SCD 50 (Bal-Tec, Fuerstentum, Liechtenstein), completando-se assim o preparo do material para observação ao MEV. As eletromicrografias foram realizadas no LabMic/UFG com o microscópio eletrônico de varredura (MEV) Jeol, modelo JSM-6610 (Jeol Ltda, Tóquio, Japão).

5.4 Produção da parede celular de *S. sclerotiorum*

Para a produção de parede celular, 10 discos (10 mm) de meio MYG, contendo micélio de *S. sclerotiorum* foram inoculados em frascos de 2 l contendo 500 mL de meio MYG líquido [0,5% (p/v) de extrato de malte, 0,25% (p/v) de extrato de levedura, 1% (p/v) de glicose]. Estes frascos foram incubados à temperatura de 28 °C sob agitação constante de 180 rpm em agitador rotatório, por 3 dias. O micélio de cada frasco foi coletado por filtração, autoclavado, congelado a - 20 °C e liofilizado. Ao

término da liofilização, os micélios foram macerados utilizando cadinho e pistilo. A cada 1g do pó resultante da maceração, foram adicionados 200 ml de água destilada. Essa solução foi agitada e centrifugada a 12000 g por 15 minutos. Proteínas presentes no sobrenadante foram quantificadas através do método descrito por Bradford (1976). A solução foi filtrada e a parede de *S. sclerotiorum* coletada. Este processo foi repetido até não haver quantidades detectáveis de proteínas no sobrenadante. A parede celular coletada ao final do processo foi congelada, liofilizada e macerada novamente.

5.5 Cultivos em meio líquido

Esporos ($1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$) de *Trichoderma spp.*, foram inoculados em frascos de 1L contendo 200 ml de meio TLE [Bactopetona $1,0 \text{ g l}^{-1}$, Uréia $0,3 \text{ g l}^{-1}$, KH_2PO_4 $2,0 \text{ g l}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $1,4 \text{ g l}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,3 \text{ g l}^{-1}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0,2 \text{ g l}^{-1}$, 2% (v/v) de solução de elementos traços, pH 5,0] com 2% (p/v) de glicose ou 0,5% (p/v) de parede celular de *S. sclerotiorum* ou 0,5% (p/v) de apotécio ou 0,5% (p/v) de escleródio. Os frascos foram incubados em agitador rotatório à 28 °C e velocidade de 180 rpm. Após 48 horas de crescimento, os sobrenadantes foram filtrados, centrifugados e congelados a - 20 °C e utilizados para dosagens de proteínas totais, atividades enzimáticas e construção dos mapas proteômicos.

5.6 Dosagem de proteínas totais.

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

5.7 Ensaio enzimáticos.

5.7.1 α -mannosidase.

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

5.7.2 Fosfatase ácida.

Para determinação da atividade de fosfatase ácida, 100 μL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,8 foram incubados com 40 μL de p-nitrofenilfosfato 5 mM (pNP-fosfato) e 10 μL de amostra à 37 °C por 15 minutos em um termociclador. A reação foi parada com a adição de 100 μL de NaOH 0,1 M, 100 μL foram transferidos para uma placa de ELISA e a absorbância obtida à 405 nm em um leitor de microplacas. Uma unidade específica (U/mg) de fosfatase ácida foi definida como a quantidade de

enzima necessária para a produção de 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto por mg de proteínas do sobrenadante.

5.7.3 N-acetil-B-D-glicosaminidase.

Para determinação de da atividade de N-acetil-glicosaminidase, 100 μL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5 foram incubados com 40 μL de *p*NP-Nacetil- β -D-glicosamina 5 mM e 10 μL de amostra à 37 °C por 15 minutos em um termociclador. A reação foi parada com a adição de 100 μL de NaOH 0,1 M, 100 μL foram transferidos para uma placa de ELISA e a absorbância obtida à 405 nm em um leitor de microplacas. Uma unidade específica (U/mg) de N-acetil- β -D-glicosaminidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto por mg de proteínas do sobrenadante.

5.7.4 β -glicosidase.

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

5.7.5. α -L-arabinofuranosidase.

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

5.7.6. Protease total

Para determinação de proteases, foi utilizado o ensaio descrito por Cabral *et al.* (2004), no qual 20 μL de amostra foram incubados com 40 μL de tampão Tris-HCl 50 mM variando o pH entre 5.0 e 8.5 e 40 μL de azocaseína 0,25% (p/v) à 37 °C por 30 minutos em um termociclador. Foi adicionado 100 μL de ácido tricloroacético 10% (p/v) a reação e a mesma foi incubada a 4 °C por 10 minutos. A reação foi centrifugada a 10000 g por 15 minutos e 100 μL foram transferidos para uma placa de ELISA seguida pela adição de 100 μL de NaOH 1 M. A absorbância foi determinada à 450 nm em um leitor de microplacas. A absorbância obtida foi considerada 1 unidade de atividade enzimática.

5.7.7. Quitinase

Para determinação da atividade de quitinase, foram utilizados 500 µL de amostra, 500 µL de quitina coloidal. Banho maria a 40 °C over night. Como “branco” foi utilizada água no lugar da amostra. Centrifugar a 10.000 rpm durante 15 minutos. Após a centrifugação, foram recolhidos 100 µL do sobrenadante e adicionado 1 mL de ADNS. Foi fervido durante 5 minutos e feita a leitura a uma absorbância de 550 nm em um espectrofotômetro. Uma unidade específica (U/mg) de quitinase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1 µmol de *p*-nitrofenol por minuto por mg de proteínas do sobrenadante.

5.7.8. β-1,3-glicanase.

Para determinar a atividade de β-1,3-glicanases, foi utilizado o ensaio descrito por Ramada *et al.* (2010). A mistura de 10 µL de amostra com 20 µL de laminarina (Sigma) 0,75% (p/v) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 foi incubada em um termociclador a 50 °C por 10 minutos. Posteriormente, 100 µL do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) foram adicionados e a reação incubada a 95 °C por 5 minutos. A reação foi resfriada por 2 minutos a 25 °C e 100 µL foram transferidos para uma placa de ELISA e a absorbância obtida a 550 nm em um leitor de microplacas. Uma unidade específica (U/mg) de β-1,3- glicanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1 µmol de açúcar redutor por minuto (1 µmol min⁻¹) por mg de proteínas do sobrenadante.

5.8 Preparo das amostras para construção dos mapas proteômicos.

Os sobrenadantes das diferentes condições de crescimento das culturas foram filtrados concentrados por ultrafiltração em uma membrana de 10 kDa (Millipore) e no volume necessário para se obter 600 µg de proteínas de cada amostra foi liofilizado. As amostras liofilizadas foram ressuspensas em 120 µL de água destilada e as proteínas precipitadas com a utilização do Kit 2-D Clean-up (GE Healthcare).

5.9 Isoeletrofocalização (IEF).

A isoeletrofocalização das proteínas foi realizada no equipamento IPGphor III (GE Healthcare). A IEF foi conduzida em tiras IPG de 18 cm, pH 4 – 7 linear. Previamente à isoeletrofocalização, as amostras foram ressuspensas em 250 µL de solução de reidratação (DeStreak Rehydration Solution, GE Healthcare) e aplicadas em um suporte. As tiras IPG foram posicionadas sobre a amostra e ficaram por 14 horas, no IPGBox (GE Healthcare), para a reidratação das mesmas. A isoeletrofocalização foi iniciada logo após o período de reidratação e ocorreu em quatro etapas: 500 V por 1 h, 1000 V por 1 h, 10000 V por 4 h, e um passo linear de 10000 V por 7 h, totalizando 93250 Vh acumulados. Após a IEF as tiras foram acondicionadas em tubos plásticos e armazenadas em congelador - 80 °C para posterior utilização.

5.10 Equilíbrio das tiras de Gradiente de pH imobilizado (IPG).

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

5.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

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

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

5.12 Análise dos mapas Proteômicos.

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

5.13 Preparo das amostras para análise por espectrometria de massas.

Para análise por espectrometria de massas, 139 spots foram retirados dos géis bidimensionais. Estes spots foram tratados segundo SHEVCHENKO et al. (1996; 2007) com modificações. Os spots retirados dos géis foram colocadas em tubos de 0,5 ml. Em seguida, 200 µL de uma solução de

bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 em acetonitrila 50% (v/v) foram adicionados aos spots, agitados em vórtex por 20 minutos e o sobrenadante descartado. Esta etapa foi repetida até os pedaços de géis ficarem totalmente transparentes. Após o descarte, 100 µL de acetonitrila foram adicionados às amostras e agitados em vórtex por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram completamente secas em uma Speed-Vaccum.

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

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

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

5.14 Espectrometria de massas, análise dos espectros e identificação das proteínas.

As amostras foram analisadas no espectrômetro de massas Ultraflex III MALDI TOF/TOF (Bruker Daltonics), controlado nos parâmetros do software FLEX CONTROL 3.0 (Bruker Daltonics) no Laboratório de Espectrometria de Massas do CENARGEN/EMBRAPA. Os peptídeos obtidos foram ressuspensos com solução matriz (10 mg mL⁻¹ de α-ciano-4-ácido-hidroxicinâmico em 50% (v/v), acetonitrila/0,3% (v/v), ácido trifluoroacético) diretamente na placa MTP AnchorChip 400/384 e seca em temperatura ambiente. As massas médias das proteínas foram obtidas em modo linear com calibração externa, usando o Protein Calibration Standard (Bruker Daltonics) e foram calibrados internamente com picos conhecidos de tripsina.

As massas do peptídeo monoisotópico foram obtidas no modo reflector com calibração externa usando o Peptide Calibration Standard (Bruker Daltonics). Os espectros MS/MS dos peptídeos foram obtidos por meio da fragmentação LIFT.

O software PepSeq (Waters, Manchester, UK) foi usado para análise de espectrometria de massas. Estruturas primárias do peptídeo foram inferidas através do manual de interpretação *de novo*. A busca por sequências similares foi realizada com a ferramenta PROTEIN BLAST (algoritmo blastp) usando o banco de dados não redundante GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). As sequências combinadas foram ainda analisadas utilizando a ferramenta PEPTIDE MASS [www.expasy.org / tools](http://www.expasy.org/tools).

5.16 PCR em tempo real

Após a identificação das proteínas foram desenhados primers para a análise de sua expressão gênica. Aproximadamente 5 µg RNA total extraído do micélio foi digerido com DNase I. Com o RNA total de cada grupo de amostras, foi feita transcrição reversa em cDNA na presença de oligo(dT), em um volume final de reação de 20 µL usando o Kit Revertaid™ First Strand cDNA synthesis (Fermentas). O cDNA sintetizado foi diluído em 80 µl de água e usado como molde para as reações de PCR em tempo real. As reações foram feitas no iQ5 real-time PCR system (Bio-Rad). Cada reação (20 µl) continha 10 µl de MAXIMA® SYBR-green PCR Master mix (Fermentas), primers *forward* e *reverse* (5 µM de cada) (tabela suplementar), cDNA como molde e água livre de nuclease. As condições de ciclagem foram: 10 minutos a 95°C (1 ciclo), 15 segundos a 95°C seguido por 1 minuto a 60°C (40 ciclos). Foi feita também, a curva de *melting* nas seguintes condições: 1 minuto a 95°C, seguida por 10 segundos a 55°C e uma rampa final a 95°C com a coleta contínua de dados (1 ciclo) para observação da formação de dímeros de primers e amplificação não específica. O transcrito α -tubulina (HS574101) foi usado como controle interno para normalização da quantidade do RNA total presente em cada reação. O nível de expressão dos genes foi calculado de acordo com o C_t pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001)

5. Resultados e Discussão

6.1 O antagonismo do *Trichoderma harzianum* X *Sclerotinia sclerotiorum*

O antagonismo do *Trichoderma harzianum* X *Sclerotinia sclerotiorum* (figura 4) foi avaliado através do pareamento em placa de Petri. A figura 4 mostra testes de pareamento realizados entre as culturas de *T. harzianum* e o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Após 48 horas de crescimento, os fungos de biocontrole e o fitopatógeno têm o primeiro contato. Após este tempo nota-se que ocorre um crescimento de *T. harzianum* sobre a hifa de *S. sclerotiorum*, e com 96 horas foi observada a presença de esporulação, caracterizando uma colonização da hifa hospedeira.

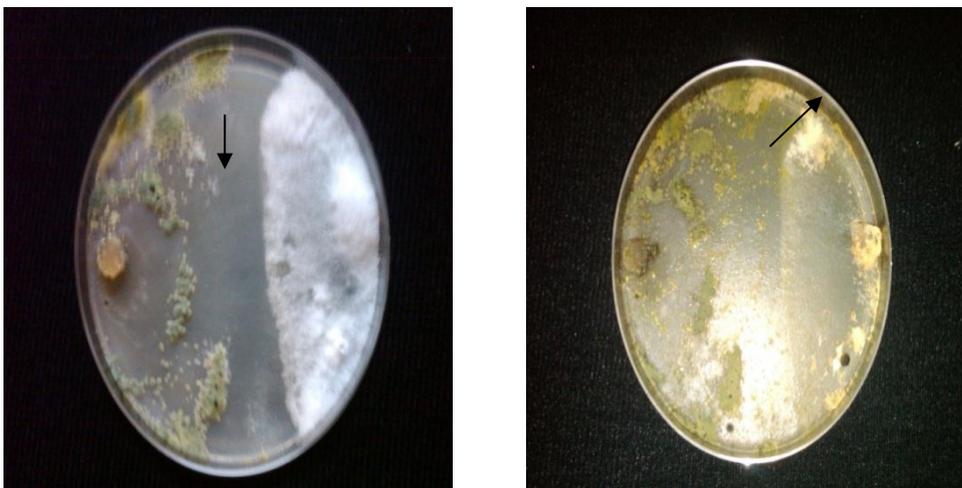


Figura 4: Testes de pareamento mostrando a colonização da cultura de *S. sclerotiorum* por *T. harzianum* 303/02. (A) Após 24 horas do início da interação a avaliação foi realizada através da visualização da frequência de enrolamento do antagonista sobre a hifa hospedeira na zona de interação com auxílio de microscópio ótico. Nota-se após 5 dias após o confronto (B), houve esporulação do *T. harzianum*

Hermosa et al (2000) demonstraram que o ensaio de confronto *in vitro* é um instrumento útil e um método confiável para o potencial micoparasitismo de espécies de *Trichoderma*. A capacidade de antagonismo em fitopatógenos é uma condição essencial para que isolados de *T. harzianum* sejam agentes efetivos no biocontrole (LIMA, 2002). Alguns fungos como *Coniothyrium minitans* (Huang, 1980; Huang & Kokko, 1987), *Trichoderma viride* (Huang, 1980), *Talaromyces* (McLaren et al., 1994) e *Trichothecium roseum* (Huang & Kokko, 1993) são micoparasitas capazes de atacarem micélio e escleródio de *S. sclerotiorum*.

6.2 Análise da interação do fungo *T. harzianum* com estruturas dos diferentes estágios do ciclo de vida do fitopatógeno *S. sclerotiorum* por microscopia.

A interação do fungo *T. harzianum* com estruturas das diferentes fases do ciclo de vida do fitopatógeno *S. sclerotiorum*, como, apotécio, escleródio e micélio, foram avaliadas por microscopia comum (figura 5), e posteriormente, analisada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

O teste de pareamento mostra que após 48 horas após a interação, o *T. harzianum* foi capaz de parasitar todas as estruturas do fitopatógeno. A partir desse teste, foram excisadas as partes do meio de cultura que continham as estruturas do agente de biocontrole e do fitopatógeno para posterior análise por MEV.

Durante o parasitismo, *T. harzianum* se fixa ao hospedeiro e começa a crescer ao redor do micélio do mesmo para formar o apressório, dando início à secreção de enzimas hidrolíticas as quais afetam a integridade da parede celular do fungo hospedeiro, uma vez que acontece a hidrólise dos polissacarídeos que a compõem. Este processo causa a lise da parede celular e conseqüentemente a inviabilidade do hospedeiro ao mesmo tempo em que facilita o processo de penetração do micélio por parte de *Trichoderma sp.* (BENÍTEZ, RINCÓN *et al.*, 2004).

Nas micrografias por varredura pode-se observar que a colonização de micélio de *T. harzianum* com estruturas como apotécio, escleródio e micélio de *S. sclerotiorum* ocorre de maneira efetiva, sendo observado um crescimento abundante de hifas do antagonista sobre a superfície, formando uma densa camada de micélio, ramificando sobre todas as estruturas do fitopatógeno. *T. harzianum* parasitou as hifas de *S. sclerotiorum* crescendo ao longo de suas hifas e formando ramos que enrolam-se em torno delas (Fig.6 –A,B,C).

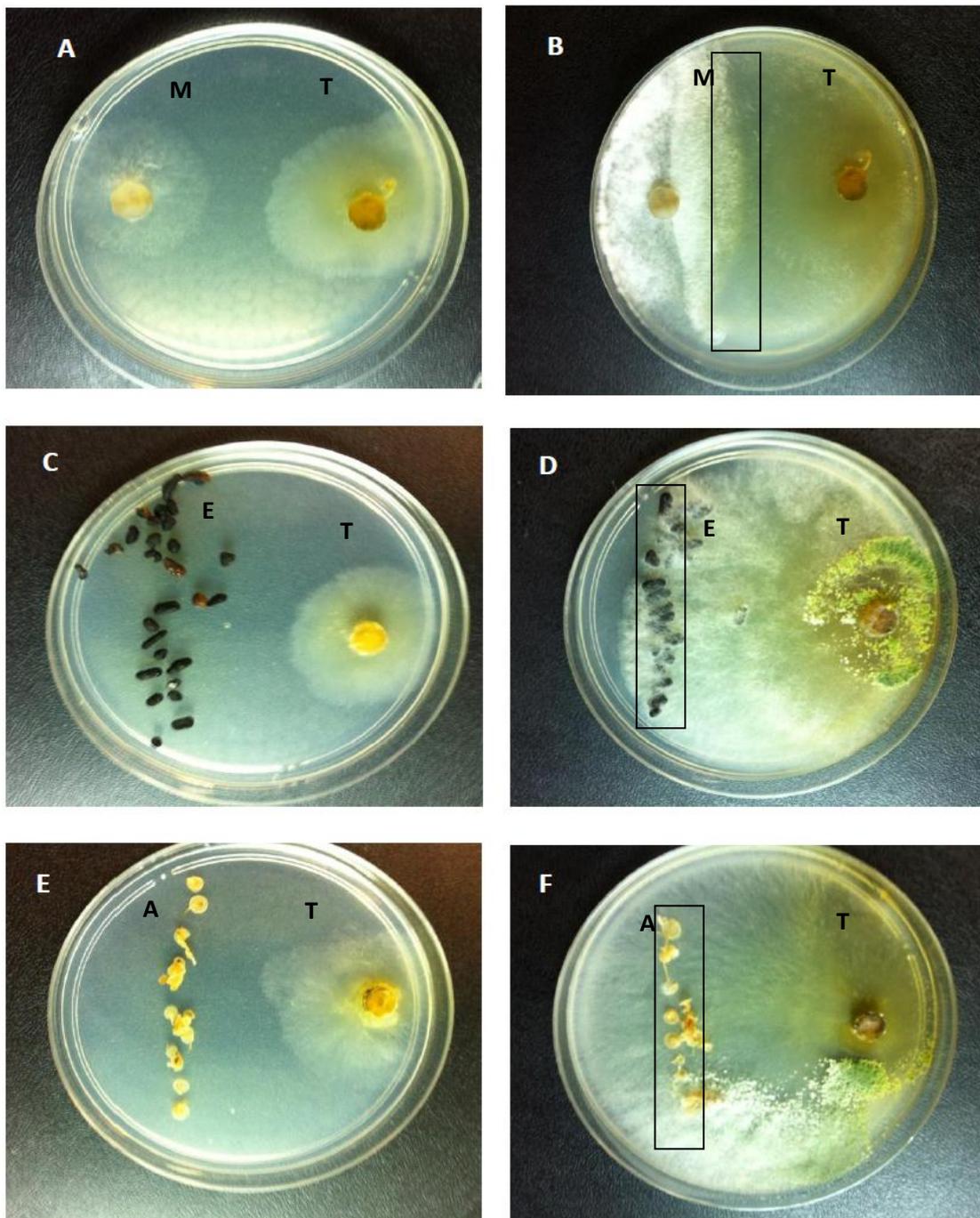


Figura 5: Teste de pareamento entre *T. harzianum* (303/02) e *S.sclerotiorum*. AB- Confronto entre hifas de *T. harzianum* e hifas de *S.sclerotiorum*, CD-Confronto entre *T. harzianum* e escleródio, EF Confronto entre *T. harzianum* e apotécio. Foi observado que o fungo *T. harzianum* foi capaz de parasitar o fitopatógeno em todos seus estágios de desenvolvimento. T-*Trichoderma*, M-Micélio, E-escleródio. As áreas demarcadas foram excisadas e foram realizadas os testes de MEV.

As hifas de *T. harzianum* 303/02 medem aproximadamente 2,9 μm de diâmetro, enquanto as de *S. sclerotiorum* medem 4,3 μm , o que facilitou a distinção entre eles (Fig.6 A,B,C). Observação da

MEV mostrou também que *T. harzianum* colonizou sobre as superfícies dos escleródios e apotécios, formando um micélio denso que penetrou a superfície interior dessas estruturas (Fig. 6-G,H,I e 6-D,E,F). Antagonismo de espécies de *Trichoderma* contra vários patógenos tem sido relatado previamente, variando entre as espécies de *Trichoderma* e mesmo entre cepas da mesma espécie (Amin et al 2010;.. Dubey et al 2011;. Qualhato et al 2013).

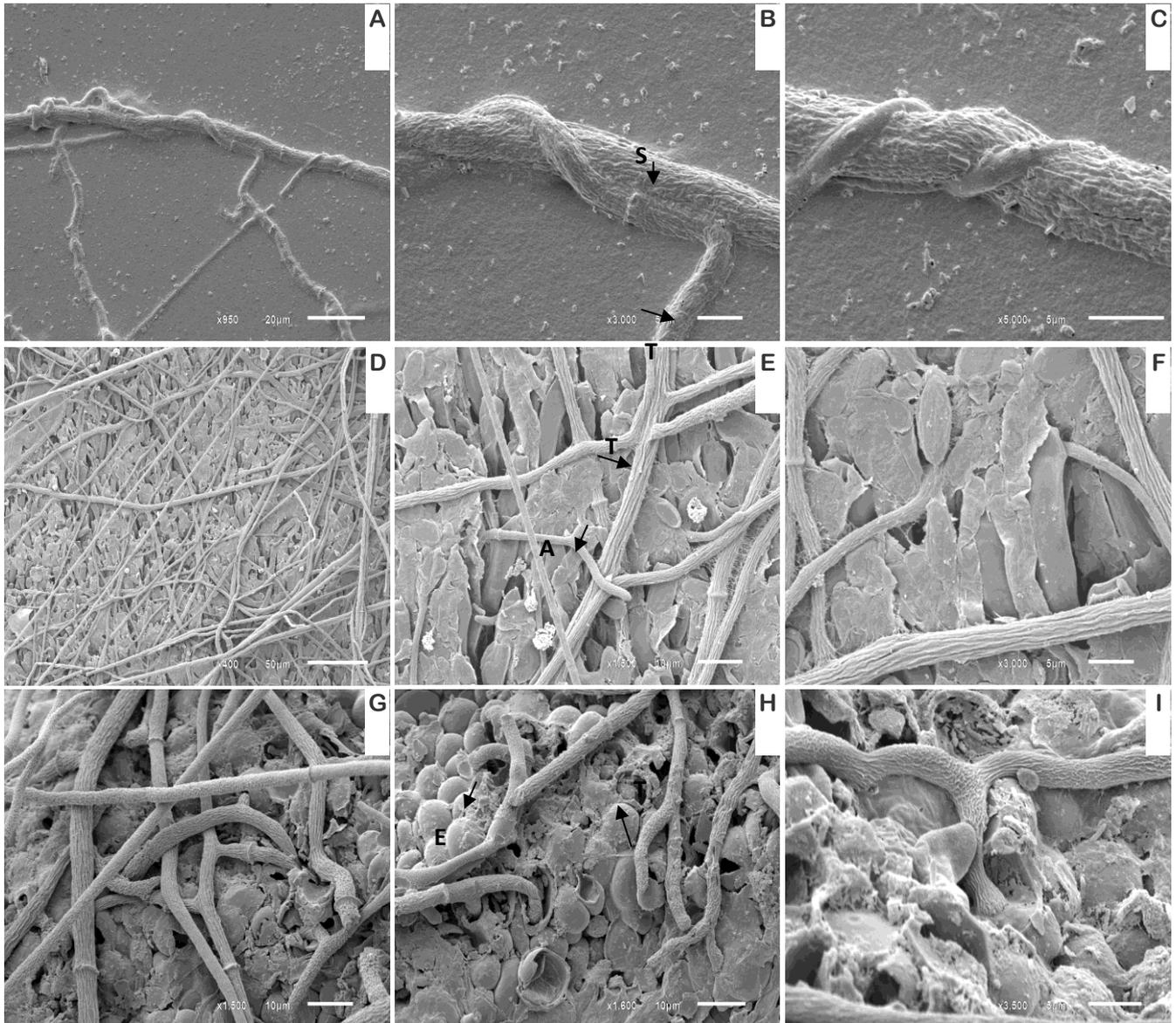


Figura 6: Eletromicrografia de varredura da interação entre *T. harzianum* e *S.sclerotiorum* 48 horas após o confronto: A, B e C; enrolamento entre as hifas de *T. harzianum* micélio e *S.sclerotiorum* micélio: D, E e F; hifas de *T. harzianum* penetrando a estrutura de apotécio: G, H e I ; hifas de *T. harzianum* penetrando a estrutura de escleródio. As setas indicam T-*Trichoderma*, S-Micélio de *S.sclerotiorum*, E-escleródio.

Benhamou & Chet (1996) demonstraram que uma linhagem de *T. harzianum* T203 conseguiu penetrar e colonizar com sucesso escleródio de *S. rolfii* causando alterações citológicas. As observações das amostras na região de interação do teste de cultura mostraram que a hifa de *T. harzianum* T203 multiplicava-se abundantemente na superfície do escleródio formando um micélio denso que estabelece contato com o exterior da célula hospedeira por meio de uma fina mucilagem, que é uma secreção rica em polissacarídeos. Sendo que essa fina mucilagem ocorre somente na superfície do escleródio parasitado com o *T.harzianum*, sugerindo que primeiramente ocorre o evento de reconhecimento, mediado por moléculas com propriedades aglutinantes, e podem ser importantes determinantes na relação de micoparasitismo entre hifas do antagonista e escleródio do fitopatógeno.

Monteiro *et al.* (2010) demonstraram que, durante a interação micoparasítica de *T. harzianum* ALL42 com *Fusarium sp.*, não houve enrolamento nas hifas do hospedeiro, apenas um contato, diferentemente do que foi observado da interação de *T. harzianum* ALL42 com *R. solani* e *M. phaseolina* o que sugere diferentes mecanismos de interação de acordo com diferentes fitopatógenos. A interação micoparasítica típica envolve a detecção do hospedeiro/ fungo, atração, fixação, enrolamento em volta e lise provocada por enzimas hidrolíticas, em muitos casos, em conjunto com metabólitos secundários. A compreensão dos mecanismos de sinalização celular em *Trichoderma* é limitada em comparação a fungos como *Magnaphorte grisea* e *Neurospora crassa*, mas tem havido um progresso significativo com base em abordagens genéticas (OMMAN *et al* 2012, ZEILINGER *et al* 2005, MUKHERJEE *et al* 2007).

6.3 Produção de enzimas de parede celular fúngica

As atividades enzimáticas mostraram perfis diferentes em cada uma das três induções avaliadas. A análise dos perfis enzimáticos dessas proteínas foi feita com base na atividade específica, sendo estudada a atividade enzimática de diferentes enzimas hidrolíticas nos diferentes sobrenadantes das condições de indução, como mostrada na tabela 3, sendo que a indução com escleródio foi a que mais secretou β -1-3 glicanase, seguida da indução com parede celular e apotécio. No presente trabalho, atividade enzimática de NAGase apresentou-se mais alta em induções com apotécio e parede celular.

A interação micoparasítica através do contato pode estar relacionada à liberação de enzimas que atuam no biocontrole. Tem sido relatado um importante papel das enzimas hidrolíticas de espécies de *Trichoderma* no micoparasitismo mostrando que enzimas como quitinases, glucanases, N-acetil-B-D-glicosaminidase (NAGase) e proteases são requeridas para a degradação da parede celular de vários fitopatógenos e essas atuam em sinergismo para uma efetiva atuação no biocontrole (VITERBO, RAMOT *et. al.*, 2002).

Tabela 3- Atividade específica de sobrenadantes das diferentes condições de crescimento no tempo de 48 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

ENZIMAS	GLICOSE (U.mg ⁻¹)	PAREDE CELULAR (U.mg ⁻¹)	ESCLERÓDIO (U.mg ⁻¹)	APOTÉCIO (U.mg ⁻¹)
β 1-3glucanase	0,11±0,01	4,33±1,03	12,49±0,23	3,2±0,09
N-acetil-B-D-glicosaminidase	0,11±0,02	2,3±0,03	1,2±0,01	2,1±0,04
α -mannosidase	0,23±0,04	0,34±0,1	0,2±0	0,23±0,01
β -glicosidase	0,05±0,01	0,23±0,01	0,13±0,01	0,12±0,01
fosfatase ácida	0,23±0,01	0,43±0,02	0,64±0,02	0,66±0,03
α -arabinofuranosidase	0,05±0,01	0,14±0,01	0,18±0,06	0,18±0,06
endoquitinase	0	0,02±0	0,01±0	0,03±0,001
protease pH 5.0	0,47±0,05	11,36±1,23	12,51±1,1	14,41±1,02
protease pH 8.5	0,44±0,2	4,75±0,85	2,91±0,5	8,75±0,8

A estrutura da parede celular fúngica é composta principalmente de β -1,3, 1,6-glicanos (polímeros de glicose) ligados à quitina (polímero de GlcNAc) via ligações β -1,4. Este complexo quitina-glicano está ligado a outros polissacarídeos cuja composição varia de acordo com a espécie do fungo, assim alguns dos polissacarídeos encontrados podem ser galactomanana, manana e galactosaminogalactana. Estes polissacarídeos constituem 80-85% da massa da parede celular enquanto que glicoproteínas constituem o restante 15-20% (LATGÉ, 2007; 2010). Algumas glicoproteínas da parede celular podem estar ancoradas à membrana celular via glicosilfosfatidilinositol

(GPI) participando do remodelamento da parede celular, entretanto outras GPI-proteínas podem estar covalentemente ligadas à quitina e são necessárias na transdução de sinais, formação de biofilmes, interação célula-célula e no caso de fungos patogênicos no reconhecimento do tecido hospedeiro (MADDI & FREE, 2010).

No ensaio enzimático realizado não foi detectada a atividade enzimática de quitinase, porém foi identificada nos mapas proteicos das três condições estudadas. As quitinases (GH 18) catalisam a hidrólise de polímeros lineares de quitina, polissacarídeo formado por unidades de N-acetilglicosamina (GlcNAc) unidas por ligações β -(1,4), que estão classificadas em três subgrupos A, B, C considerando a similaridade da sequência de aminoácidos do domínio catalítico. Os subgrupos A e C possuem atividade de exoquitinases e um mecanismo de ligação ao substrato mediante uma fenda na forma de túnel, entanto que o subgrupo B possui atividade de endoquitinases e uma fenda de ligação ao substrato mais aberta (SEIDL, HUEMER *et al.*, 2005).

No presente trabalho as atividades enzimáticas das proteases apresentaram um perfil diferenciado entre as condições, Houve um melhor desempenho na condição de apotécio, seguido do escleródio e parede celular para proteases ácidas. Enquanto que em protease básica, parede celular houve atividade enzimática maior em relação ao escleródio, mas o apotécio segue com uma melhor atividade enzimática.

Estudos têm relacionado às proteases na degradação de proteínas celulares estruturais desestabilizando a integridade celular do fitopatógeno e facilitando a penetração e colonização por *Trichoderma*. Elas também estão envolvidas na inativação de enzimas produzidas por patógenos durante o processo de infecção de plantas (SUÁREZ *et al.*, 2007).

α -L-Arabinofuranosidase, é uma enzima capaz de hidrolisar α -L-Arabinofuranosídeos tais como resíduos aril α -L-arabinofuranosídeos e resíduos não redutores de α -L-Arabinofuranosil de substratos que contém arabinofuranose (SAHA, 2000). Arabinose, fucose e ribose são detectadas como traços em paredes celulares da maioria dos fungos. Neste estudo, identificamos a proteína α -L-arabinofuranosidase (tabela 3), quando crescida na presença de escleródio. Em todas as condições do ensaio enzimático (apotécio, escleródio e parede celular), houve aumento da atividade enzimática de α -L-arabinofuranosidase.

α -Manosidase (α -manosídeo manohidrolase, E.C. 3.2.1.24) possui um importante papel no processamento de manooligossacarídeos de manoproteínas. Essa enzima catalisa a hidrólise de resíduos terminais não redutores de α -D-manose em α -D-manosídeos. A enzima também atua no processo dos N-glicanos recém formados e na degradação de glicoproteínas maduras. Há relatos de múltiplas isoformas da α -manosidase, cada uma com uma localização celular específica e pH ótimo (GAIKWAD; KESKAR; KHAN, 1995). No presente trabalho não houve atividade enzimática relatada de α -manosidase em nenhuma das condições avaliadas.

Monteiro *et al* (2010) identificaram as enzimas α -manosidase e α -arabinofuranosidase, em cultivos de *T. harzianum* com *R. solani*, *M. phaseolina* e *Fusarium sp*, a atividade dessas enzimas foi determinada nos extratos dos cultivos. Todas as induções apresentaram atividade das duas enzimas sendo o cultivo com *R. solani* a que mais apresentou atividade das duas enzimas. A atividade de

manosidase foi igual para os cultivos com *Fusarium sp* e *M. phaseolina* e a atividade de arabinofuranosidase foi um pouco maior em *Fusarium sp* quando comparada com a indução *M. phaseolina*. Levando a crer que outras proteínas que não as já tão reconhecidamente envolvidas no micoparasitismo, são expressas de acordo com a parede celular do fungo.

A fosfatase ácida (EC 3.1.3.2) é uma hidrolase que promove a hidrólise do fosfato monoéster, transformando fosfato orgânico numa forma inorgânica solúvel. Estas enzimas são largamente distribuídas nas plantas (DUFF et al. 1994), células animais (JING et al. 2006) e microorganismos (PALACIOS et al 2005). No solo, a hidrólise de compostos fosfato-orgânicos é predominantemente mediada pela atividade de fungos e de bactérias (YADAV & TARAFDAR 2003). Os fungos podem solubilizar o fósforo insolúvel por acidificação ou agentes quelantes, ou mediada pela fosfatase hidrolítica de fosfato orgânico. Leitão et al (2010), relataram pela primeira vez a purificação e caracterização de uma fosfatase ácida do agente de biocontrole *T. harzianum*. Identificamos a presença de atividade enzimática de fosfatase ácida em todas as condições, sendo que a atividade em apotécio e escleródio foi maior que em parede celular.

Análise do secretoma e identificação dos perfis bidimensionais

O secretoma fúngico depende estreitamente de seu ambiente biótico e abiótico, uma propriedade que depende do espectro ecológico das espécies fúngicas. A estrutura destes secretomas consiste de hidrolases necessárias para o fornecimento de alimentos fúngicos. Diferentes extratos de efetores podem aumentar a "força de ataque" do secretoma dos fungos manifestando-se pela produção de isoformas / multiformas de hidrolases funcionalmente necessários em diferentes ambientes físico-químicos, e / ou síntese de proteínas específicas de proteção (GIRARD et al 2013).

Após os experimentos realizados com o *T.harzianum* no antagonismo com fitopatígeno, como, análise por microscopia eletrônica de varredura e os testes enzimáticos, foram feitos cultivos para avaliar o perfil de proteínas secretadas pelo *T.harzianum* utilizando três condições diferentes como fonte de carbono. Para esse fim, esporos de *T. harzianum* 303/02 foram crescidos em meio TLE na presença de apotécio, escleródio e micélio (parede celular) lavados, autoclavados, e utilizados em uma concentração de 0,5% (p/v).

Para melhor visualizar o perfil de proteínas secretadas por *T. harzianum* 303/02 nas diferentes condições de crescimento foram construídos mapas proteômicos, que compreendem a separação das proteínas por eletroforese em géis bidimensionais de poliacrilamida, separando as proteínas inicialmente pelos pontos isoelétricos em um gradiente de pH e posteriormente pelas massas moleculares.

Os géis bidimensionais foram digitalizados e analisados através do programa ImageMaster™ 2D Platinum v7.0. Os géis que tiveram melhor resolução, menos imperfeições, e quando comparados com as réplicas, geraram um maior coeficiente de correlação, foram considerados os mapas de referência para análises (Figura 7).

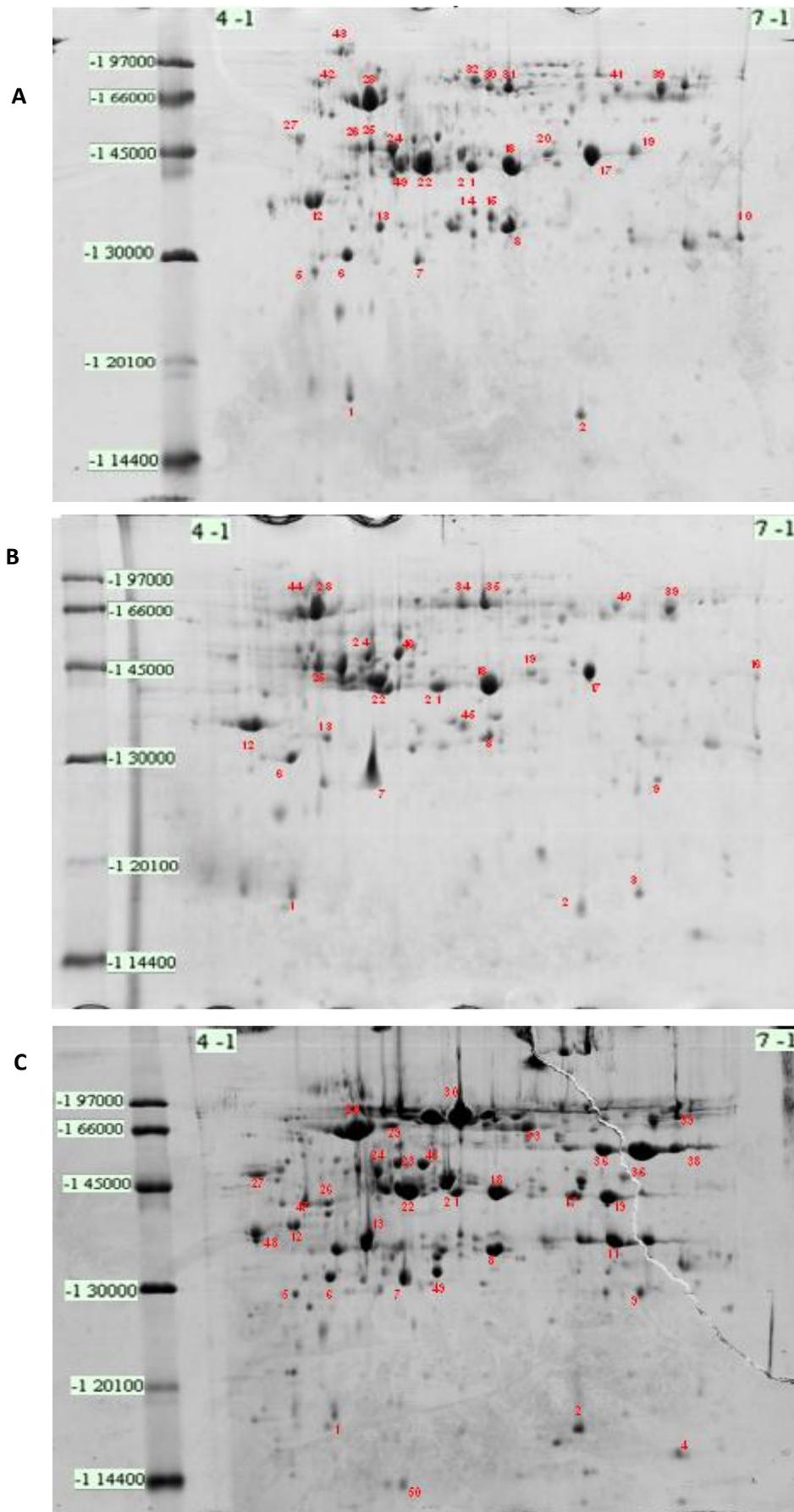


Figura 7: Mapas proteômicos com as proteínas identificadas durante a interação entre *T.harzianum*(303/02) *S. sclerotiorum*. **A**-Parede celular, **B**-Apotécio, **C**-Escleródio. Os números em vermelho são as proteínas que foram identificadas.

Após a detecção dos spots, uma análise foi feita para eliminar os pontos marcados no gel que não eram spots de proteínas (falso positivo). Para comparar as réplicas das condições, dois “landmarks” (marcadores) foram criados para ajustar as diferenças entre a disposição dos spots nos géis. Após essa etapa, foi observada correlação desses spots igualmente presentes nas réplicas, indicando uma boa reprodutibilidade no experimento (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo dos parâmetros observados dos géis bidimensionais de cada condição e sua correlação com sua réplica.

Condição cultivada	Número de spots ^a	R ^{2b}
Apotécio	172	0.97 / 0.92
Parede celular	158	0.98 / 0.96
Escleródio	182	0.98 / 0.97

^a Números de spots detectados pelo ImageMaster™ 2D Platinum v7.0 depois do processamento. A mesma quantidade de proteína (600 µg) foi usada para cada gel.

^b Correlação entre o mapa de referência e suas réplicas usando três spots diferentes como marcos para a correção dos erros.

Foram escolhidos os spots que apresentaram formas melhores definidas a com maior expressão no gel. Posteriormente foram analisados os spots que continham nas três condições de cultivo, os que continham em duas condições de cultivo e os que foram expressos somente em cada meio de cultura respectivamente.

Fazendo uma comparação entre as três condições dos géis, é possível observar diferenças entre os perfis protéicos de cada um deles. O cultivo com escleródio apresenta um número maior de bandas de proteínas do que as induções com micélio e apotécio, alguns spots da indução com escleródio apresentam-se mais intensos quando comparados tanto com induções de micélio quanto apotécio (ANOVA-p < 0,05).

Fazendo correlação com outro trabalho realizado por nosso grupo (Ramada, 2010), onde já foram identificadas proteínas a partir da análise do secretoma do fungo *T. harzianum* crescido na presença de parede celular de *Fusarium solani*, foi observado que algumas proteínas estavam presentes em todas as condições do estudo entre a interação *T. harzianum* e *S.sclerotiorum*. Foi feito um pareamento entre esses dois géis para uma possível identificação de proteínas homólogas e posteriormente foram analisadas as bandas de proteínas através de espectrometria de massas para confirmar a semelhança destas. Além destas proteínas, também foram analisadas proteínas diferencialmente expressas entre as condições (Figura 8).

Proteínas identificadas	APOTECIO	ESCLERODIO	MICELIO
Serine protease - SprT (<i>T. koningii</i>)	+	+	+
Hypothetical protein - Necrosis inducing protein (NPP1) (<i>T. atroviride</i>)	+	+	+
Hypothetical protein - Peptidase m14 (<i>T. virens</i>)	+	+	+
Hypothetical protein - Amidase (<i>T. virens</i>)	+	+	+
Endochitinase 33 kDa (<i>T. harzianum</i>)	+	+	+
Endochitinase 37 kDa (<i>T. harzianum</i>)	+	+	+
Endochitinase 42 kDa (<i>T. harzianum</i>)	+	+	+
Trypsin like protease (<i>T. harzianum</i>)	+	+	+
Predicted small secreted cysteine-rich protein (<i>Trichoderma virens</i>)	+	+	+
Glycoside hydrolase family 15 protein - Glucoamylase (<i>T. virens</i>)	+	-	+
Hypothetical protein - CDB9-like domain - carbohydrate binding (<i>T. virens</i>)	+	-	+
Glycoside hydrolase family 47 protein - α -1,2-D-mannosidase (<i>T. virens</i>)	+	+	+
Glycoside hydrolase family 71 protein - Alpha-1,3-glucanase (<i>T. harzianum</i>)	-	+	+
Hypothetical protein - β -1-6-glucan synthase (<i>T. virens</i>)	-	+	+
Predicted protein - Ribonuclease T2-secreted RNase (<i>T. reesei</i>)	-	+	+
Glycoside hydrolase family 72 protein - β -1,3-glucanosiltransferase (<i>T. virens</i>)	-	+	+
epl1 (<i>T. harzianum</i>)	+	+	+
Carbohydrate-binding module family 13 protein (<i>T. virens</i>)	+	-	-
Bacillolysin (<i>Bacillus cereus</i>)	+	-	-
Hypothetical protein - glutaminase-like (<i>T. virens</i>)	+	-	-
Predicted protein - Peptidase S9 (<i>T. reesei</i>)	+	-	-
Hypothetical protein - putativa glyoxal oxidase protein (<i>T. virens</i>)	+	-	-
Glycoside hydrolase family 30 protein - β -1,6-glucanase (<i>T. virens</i>)	-	+	-
Glycoside hydrolase family 72 protein - β -1,3-glucanosiltransferase (<i>T. virens</i>)	-	+	-
Glycoside hydrolase family 18 protein - GH18 chitinase-like (<i>T. virens</i>)	-	+	-
Hypothetical protein - GH catalytic core (<i>T. virens</i>)	-	+	-
Hypothetical protein duf1996 (<i>T. virens</i>)	-	+	-
Predicted protein - FAD binding domain (<i>T. reesei</i>)	-	+	-
Glycoside hydrolase family 64 protein - β -1,3-glucanase B-like (<i>T. virens</i>)	-	+	-
Alfa-L-arabinofuranosidase (<i>Trichoderma virens</i>)	-	+	-
Probable polygalacturonase (<i>T. virens</i>)	-	+	-
Hypothetical protein (<i>T. virens</i>) duf1349	+	+	-
glycoside hydrolase family 76 protein - Alpha-glucosidase (<i>T. virens</i>)	-	-	+
Gh2- β -galactosidase/ β -glucuronidase (<i>T. virens</i>)	-	-	+
Predicted protein - Peptidase M6 (<i>T. reesei</i>)	-	-	+
Hypothetical protein - Esterase_lipase (<i>T. virens</i>)	-	-	+

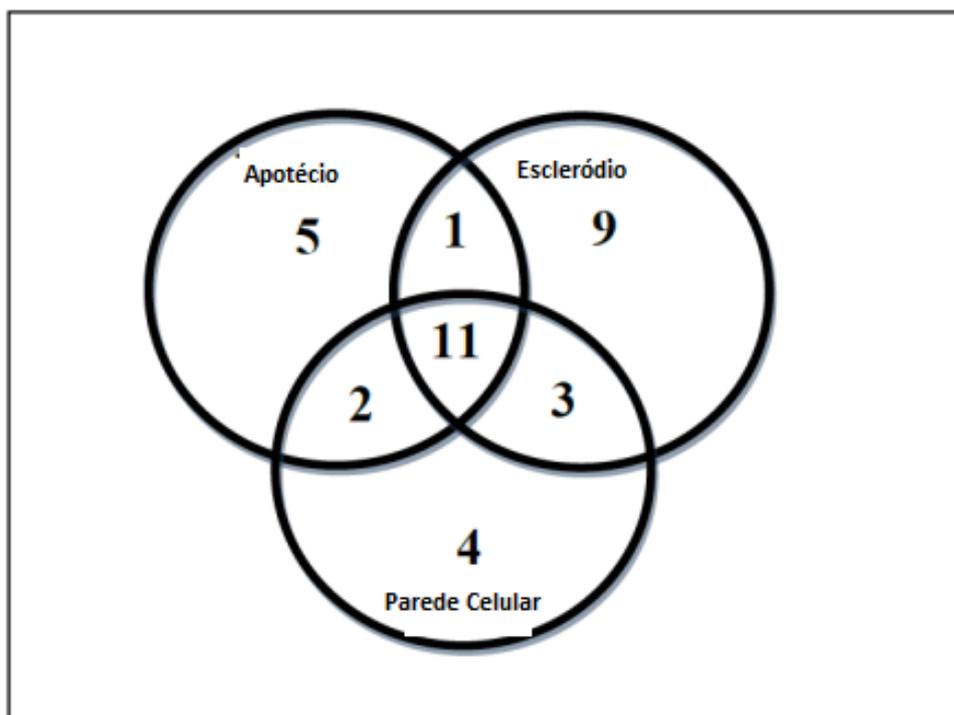


Figura 8: Diagrama de Venn totalizando os spots identificados e diferencialmente identificados das induções de *T. harzianum* com escleródio, parede celular e apotécio.

Após análise dos géis, os spots de interesse foram retiradas dos géis da interação entre *T. harzianum* e *S.sclerotiorum* das 3 induções totalizando 139 spots sendo 46 de apotécio, 43 de parede celular e 50 de escleródio, que foram submetidos à digestão tríplica e análise por espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF) (Tabela 5). Os peptídeos m/z foram selecionados e novamente analisados por meio de fragmentação LIFT. Um total de 320 espectros MS / MS foram obtidos e a sequência de aminoácidos primária de cada um foi interpretado manualmente usando PepSeq (Waters) e FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics). Preliminarmente foi analisada a condição de Apotécio, dos 46 spots analisados, 19 foram identificadas. Quanto à condição de parede celular foram analisadas 43 spots, sendo identificados 20, já em relação ao gel de escleródio, foram retiradas 50 spots, um total de 30 spots foram identificados, sendo que 25 dessas spots eram diferentes entre si. Das proteínas identificadas no secretoma, 5 foram exclusivamente secretadas em meio contendo apotécio, 9 em meio contendo escleródio, 4 em meio contendo parede celular, sendo 11 expressas nas três condições testadas.

As hidrofobinas, provavelmente as melhores SSCPs conhecidas, são caracterizados pela presença de oito resíduos de cisteína conservados posicionalmente dos quais quatro ocorrem em pares. Eles são encontrados nas superfícies exteriores das paredes das células de hifas e conídios, onde medeiam as interações entre o fungo e o meio ambiente. As hidrofobinas estão também envolvidas na ligação de *Trichoderma* hifas de raízes (VITERBO & CHET, 2006).

Entre as proteínas identificadas quando crescidas com apotécio, encontra-se a proteína Sm1, plântulas de algodão tratadas com a proteína Sm1 purificada de *T. virens* apresentaram expressão

sistêmica aumentada de quitinase (Classe I), β 1-3 glicanase, peroxidase (POD6), hidroximetilglutarilCoA redutase e lipo-oxigenase, todas proteínas relacionadas a defesa. Além disto, apresentaram resistência a infecção pelo fungo fitopatogênico *Coletotrichum SP* e acúmulo de peróxido de hidrogênio em folhas e cotilédones (DJONOVIC et al 2006).

Freitas e colaboradores (2014) analisaram a expressão do gene Sm1 de oito diferentes cepas de *Trichoderma spp.* cultivados em glicose, sementes ou raízes de feijão sendo que a linhagem T37 teve significativamente maior expressão de Sm1. A proteína EPL1 também foi encontrada em todas as condições. Atua como elicitor para desencadear reações de defesa em plantas sendo uma proteína que pertence ao segundo grupo de SSCP, a família de proteínas de cerato-platanina, associada com a indução de respostas de defesa de plantas (FRISCHMANN et al 2012). Outra proteína SSCP foi identificado em nosso estudo (cys). Esta proteína é de 143 resíduos de aminoácidos de comprimento e tem 18 resíduos de cisteína. Expressão gênica foi semelhante para as condições relacionadas com a micoparasitismo, e foi superexpressos quando glicose como controle (tabela 6). Aparentemente, esta proteína pertence ao quarto grupo de SSCPs, o grupo maior e mais exclusivo, mas sem função atribuída até agora.

Foram identificadas diversas hidrolases em todas as condições estudadas. CAZy (banco de dados enzimas) descreve as famílias de enzimas envolvidas com modificações de carboidratos e degradação. Hidrolases Glicosídicas (EC 3.2.1 -) são um grupo comum de enzimas que hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais hidratos de carbono ou entre um hidrato de carbono e uma porção de não-hidratos de carbono. Nove famílias foram identificadas neste trabalho: G2, G15, G18, G30, G55, G64, G71, G72 e G78.

Membros da família GH72 foram identificadas somente nas culturas suplementadas com escleródio e micélio (Tabela 6). Estas enzimas também conhecidas como glicanosiltransferases são proteínas GPI-ancoradas e localizadas no espaço extracelular da parede celular catalisando o alongamento linear do polímero de glicose β -(1-3) glicano, e promovendo a formação de ramificações nas hifas do fungo tendo assim um papel importante na biogênese da parede celular (MAZÁÑ, RAGNI et al., 2011).

Uma endo- β -1,3-glicanase (GH55) também foi identificada. Esta enzima desempenha papel importante no micoparasitismo e em processos morfogenéticos-morfolíticos durante o desenvolvimento e na mobilização de β -glucanas, sob condições de jejum de carbono e energia (DE LA CRUZ et al 1995). Identificamos também duas β -1,6-glicanases (GH30) produtos de um mesmo gene. De la Cruz et al (1995) observou que, pelo menos, duas endo- β -1,6-glicanase foram secretadas por *T. harzianum*, e uma enzima de 43 kDa (BGN16.2) foi purificada. Esta enzima atuou de forma sinérgica com β -1,3-glicanase e quitinase na degradação das paredes das células fúngicas. A presença de β -1,3-glicanases e β -1,6-glicanases era esperada devido a composição da parede celular da maioria dos fitopatógenos, e a atividade da primeira foi avaliada, estando presente nos meios contendo parede celular, apotécio e escleródio, nota-se que na presença de escleródio a atividade enzimática é consideravelmente maior em relação as outras condições, pode ser devido a estrutura do escleródio ser composta por um emaranhado de hifas, o que o torna uma estrutura rígida e melanizada (Tabela 3).

Também foi identificada uma α -1,3-glicanase quando induzido o *T. harzianum* com escleródio. Outras hidrolases de glicosídicas, como α -1,3-glicanase (GH71), α -1,2-manosidase (GH47) e α -L-arabinofuranosidase (GH54) também foram identificadas. Estas enzimas podem estar relacionadas com a degradação da fração amorfa da parede celular dos fungos, mas a α -manosidase pode também ser envolvido no desglicosilação de glicoproteínas presentes na parede celular dos fungos (SCHOFFELMEER & KLIS, 1999).

A identificação de uma glicoamilase produzida em grande quantidade, quando *T. harzianum* foi crescido em apotécio, um dado interessante, visto que não há relatos na literatura sobre a ação desta enzima no micoparasitismo. As glicoamilases (EC3.2.1.3) hidrolisam as ligações α -1,4 entre os resíduos de glicose pela extremidade não redutora. Uma possível explicação para a presença desta enzima durante a simulação do micoparasitismo é que alguns fungos, como *Aspergillus nidulans*, possuem em sua parede celular, polissacarídeos chamados de S-glicanas, que podem ser formadas apenas por ligações α -1,3 ou por polímeros alternando ligações α -1,3 e α -1,4 (PEBERDY, 1990).

Embora houvesse um número maior de spots de proteínas identificados como GHs, um grande conjunto de diferentes proteases também foi identificado em três condições diferentes. As proteases podem desempenhar papéis importantes na lise celular do hospedeiro atacando lípidios e proteínas, que são também uma parte da parede celular, e na inativação de enzimas segregadas por fitopatógenos, durante o processo de infecção em plantas (VITERBO et al 2002, SUÁREZ et al 2007). *Trichoderma* pode ter um dos maiores conjuntos de proteases entre fungos (RAWLINGS et al 2012). Cerca de 20% das proteases de *Trichoderma* preditos possuem um peptídeo sinal e, portanto, são destinados para a via secretora. Nos experimentos relacionados ao controle biológico de *T. harzianum*, foi feita uma análise proteômica das proteínas extracelulares, que avaliou as variações que ocorriam no fungo que crescia em presença de quitina e parede celulares de fungos fitopatogênicos como *R. solani*, *Botrytis cinérea* e *Phytium ultimum*, demonstrando diferenças significantes nos mapas bidimensionais das proteínas extracelulares e a presença de proteases como tripsina e uma nova aspartato protease (P6281), proteínas que possuem um papel fundamental na atividade parasítica de *Trichoderma* sp (SUÁREZ et al 2005).

Tabela 6. Proteínas identificadas do secretoma de *T. harzianum* 303/02 quando cultivado em diferentes condições.

Proteína ID/Gene ID ^a	Descrição (nome da proteína/especies) ^b	NCBI identificação	JGI Protein ID ^c	Observado PI / MW (kDa) ^d	PI Teórico / MW (kDa) ^e	Condição cultivada
1/cys	Predicted small secreted cysteine-rich protein (<i>Trichoderma virens</i>)	EHK19462.1	511478	4.66/18.53	5.82 / 15.33	All
25,26/gamy	Glycoside hydrolase family 15 protein - Glucoamylase (<i>T. virens</i>)	EHK25059.1	81392	4.73/48.98	5.33 / 67.22	A & CW
7/pra1	Trypsin like protease (<i>T. harzianum</i>)	CAC80694.2	526221	4.81/29.25	5.18 / 25.80	All
39/amid	Hypothetical protein - Amidase (<i>T. virens</i>)	EHK26859.1	512736	5.12/77.55	5.12 / 58.87	All
2/epl1	epl1 (<i>T. harzianum</i>)	AER09349.1	508110	6.00/16.93	6.23 / 14.32	All
9/duf1349	Hypothetical protein (<i>T. virens</i>)	EHK16811.1	4165	6.43/27.88	6.20 / 25.26	A & S
3/cdb13	Carbohydrate-binding module family 13 protein (<i>T. virens</i>)	EHK19601.1	511345	6.32/18.40	6.63 / 17.07	A
8/sprt	Serine protease - SprT (<i>T. koningii</i>)	ABN04079.1	511032	5.58/32.33	6.30/ 40.43	All
45/baclysin	Bacillolysin (<i>Bacillus cereus</i>)	WP_000730361.1	82169	5.46/34.41	5.92 / 60.65	A
19,40/cdb9	Hypothetical protein - CDB9-like domain - carbohydrate binding (<i>T. virens</i>)	EHK26772.1	511848	6.09/43.13	5.60 / 25.09	A & CW
16,17/m14	Hypothetical protein - Peptidase m14 (<i>T. virens</i>)	EHK25112.1	514267	6.92/43.34	7.60 / 46.98	All
34,35/glut	Hypothetical protein - glutaminase-like (<i>T. virens</i>)	EHK25695.1	84515	5.51/75.56	5.59 / 76.49	A
28/S9	Predicted protein - Peptidase S9 (<i>T. reesei</i>)	EGR51541.1	476987	4.79/73.62	5.91/76.83	A
44/ glyo	Hypothetical protein - putativa glyoxal oxidase protein (<i>T. virens</i>)	EHK15719.1	506446	4.71/74.58	4.74 / 117.47	A
12/chit37	Endochitinase 37 kDa (<i>T. harzianum</i>)	ABG46358.1	505895	4.65 / 38.91	8.45 / 36.62	All
18,21,22/chit42	Endochitinase 42 kDa (<i>T. harzianum</i>)	AAA98644.1	101028	5.67 / 42.98	5.43 / 46.02	All
13/chit33	Endochitinase 33 kDa (<i>T. harzianum</i>)	CAA56315.1	529621	5.28 / 34.81	5.07 / 34.34	All
24,46/gh96	Glycoside hydrolase family 47 protein - α -1,2-D-mannosidase (<i>T. virens</i>)	EHK21505.1	487999	4.75 / 51.85	5.29 / 56.17	All
6/npp1	Hypothetical protein - Necrosis inducing protein (NPP1) (<i>T. atroviride</i>)	EHK39942.1	507042	4.65 / 29.28	4.76 / 30.82	All
14,26/hypot	Hypothetical protein - β -1-6-glucan synthase (<i>T. virens</i>)	EHK17331.1	487382	4.71/41.01	5.58/ 37.69	S & CW
30,31,32/agluc75	Glycoside hydrolase family 71 protein - Alpha-1,3-glucanase (<i>T. harzianum</i>)	CAC80493.1	525334	5.46/91.14	5.92/ 67.72	S & CW

4/ rna132	Predicted protein - Ribonuclease T2-secreted RNase (<i>T. virens</i>)	EHK18016.1	520729	6.64/15.57	7.68/ 14.57	S
27/gel	Glycoside hydrolase family 72 protein - β -1,3-glucanosiltransferase (<i>T. virens</i>)	EHK19699.1	150179	4.34/4922	4.63/ 56.87	S & CW
23/abf	Alfa-L-arabinofuranosidase (<i>Trichoderma virens</i>)	EHK20391.1	503269	5.10/42.13	5.28/ 52.67	S
28/polygala	Glycoside hydrolase family 55 protein - Probable polygalacturonase (<i>T. virens</i>)	EHK19381.1	84648	4.91/78.31	4.71/108.16	S
47/gh64	Glycoside hydrolase family 64 protein - β -1,3-glucanase B-like (<i>T. virens</i>)	EHK20867.1	514104	4.59/41.68	5.81/ 46.98	S
33/fad	Predicted protein - FAD binding domain (<i>T. reesei</i>)	EGR53026.1	507229	5.83/63.31	6.49/ 62.56	S
48/gh18	Glycoside hydrolase family 18 protein - GH18 chitinase-like (<i>T. virens</i>)	EHK18477.1	2921	4.31/35.67	4.93/ 37.96	S
49/ghcore	Hypothetical protein - GH catalytic core (<i>T. virens</i>)	EHK22537.1	50757	5.31/29.60	5,74/ 31.77	S
36/b16gluc	Glycoside hydrolase family 30 protein - β -1,6-glucanase (<i>T. virens</i>)	EHK19451.1	485240	6.14/53.71	5.99/ 51.70	S
38/duf1996	Hypothetical protein (<i>T. virens</i>)	EHK24053.1	5064.46	6.32/34.40	6,48/ 35.89	S
5/agluc	glycoside hydrolase family 76 protein - Alpha-glucosidase (<i>T. virens</i>)	EHK22230.1	3063	4.62/28.02	5.44/ 43.97	CW
43/gh2	glycoside hydrolase family 2 protein - β -galactosidase/ β -glucuronidase (<i>T. virens</i>)	EHK25869.1	80759	4.76/106.98	4.75/ 103.33	CW
42/m6	Predicted protein - Peptidase M6 (<i>T. reesei</i>)	EGR46159.1	92805	4.64/75.03	4.85/ 71.66	CW
49/lip	Hypothetical protein - Esterase_lipase (<i>T. virens</i>)	EHK17489.1	105726	5.08/42.05	5.34/ 37.04	CW

^a A proteína ID refere-se ao número da Figura 7. Gene ID é o nome usado para identificar o gene para a análise de RT-qPCR. Identificação de proteínas é listada como GHS, proteases e outras funções

^b JGI Protein ID foi obtida a partir do *Trichoderma harzianum* CBS226.95 genome v1.0 (<http://genome.jgi.doe.gov/Triha1/Triha1.home.html>)

^c Sequências de peptídeos utilizados para a identificação são apresentados no anexo

^d PI observado e MM obtida do ImageMaster™ 2D Platinum v7.0

^e Teórico PI e MM (kDa) observada a partir da sequência obtida a partir de NCBI por Peptide Mass tool (http://web.expasy.org/peptide_mass)

A- Apotécio **S-** escleródio **CW** – Parede celular **All-** todas condições **S & CW** - escleródio + Parede celular **A & CW** - apotécio+ Parede celular **A & S-** apotécio + escleródio

Estudos relacionados ao *Trichoderma* e atuando como controle biológico têm aumentado bastante nos últimos anos. Elad & Kapat (1999) mostraram que enzimas hidrolíticas produzidas por *B. cinérea* foram parcialmente desativadas por ação das proteases produzidas por *T. harzianum* e que extratos de cultura de *Trichoderma* contendo proteases foram capazes de reduzir a germinação de fitopatógenos. *Trichoderma* possui um dos maiores conjuntos de proteases entre os fungos, os números totais de proteases são preditos 383 (4,2% de todos os genes que codificam proteínas preditas), 445 (3,75%), e 479 (3,85%) em *T. reesei*, o *T. atroviride* e *T. virens*, respectivamente (DRUZHININA et al., 2012). Este autor também sugere que os grupos dominantes foram aspartil proteases, proteases de serina, proteases subtilisina-like, e tripeptidil dipeptidil peptidases. Dessa forma, as proteases de *Trichoderma* podem ser importantes no processo de micoparasitismo pela degradação dos componentes da parede celular do hospedeiro.

Neste estudo foi identificado membros de metaloproteases, proteínas de serina e proteases subtilisin-like. Uma metaloprotease M14 foi encontrada em todas as condições e uma M6 quando crescido com micélio. Foi identificada também uma *bacilolisina*, quando crescido em apotécio classificada como uma metaloprotease e tem sido descrita como uma proteína que representa um papel importante no processo de virulência de diversos patógenos bacterianos (ALTINCICEK et al 2006). A bacilolisina é uma proteína encontrada em bactérias, principalmente do gênero *Bacillus*, ao fazer análise das sequências, ela apresenta homologia apenas com proteínas de bactérias, mas quando colocamos a sequência da proteína inteira, encontramos homólogos no genoma dos três trichodermas disponíveis e anotados.

A maioria das proteases extracelulares relacionadas com os processos de biocontrole em *Trichoderma spp.* foram caracterizadas como proteases de serina. Houve presença de protease de serina (sprT) em todas as condições estudadas sendo confirmada posteriormente sua expressão através de PCR em tempo real (Tabela 6). No entanto proteases de *Trichoderma* são não somente eficazes contra fungos, mas são também importantes para o controle de outros fitopatógenos. A protease *trypsin-like* identificado foi isolada a partir de *T. harzianum*, caracterizado, e exibida atividade nematocida (SUÁREZ et al 2004). A protease *trypsin-like* (PRA1), foi descrita como sendo a primeira proteína de espécies de *Trichoderma* que mostrou atividade contra nematóides, como *Meloidogyne javanica*, incluindo esse tipo de protease como novas proteínas nematotóxicas, fato que era atribuído apenas as serina proteases *subtilisin-like* (SUÁREZ et al., 2005).

A grande diversidade de proteases secretadas por *T. harzianum* nas condições relacionadas micoparasitismo pode refletir um sistema sinérgico para o uso eficiente de proteínas por este fungo micotrófico.

A análise de espectrometria de massas para identificação de proteínas crescidas com parede celular (micélio), mostrou-se bastante interessante, como o caso da proteína *Phytophthora protein 1* (NPP1), descrita em um fungo fitopatogênico *Verticillium dahliae*, e que está relacionada a um fator que

induz necrose em plantas, inclusive algodão (ZHOU *et al* 2012). Estruturas homólogas de NPP1 têm sido descritas em oomicetos, fungos e bactérias, mas não em plantas. Plantas de *Arabidopsis* infiltrados com NPP1 constituem um sistema experimental que é susceptível de transmitir abordagens genéticas que visam a dissecção das vias de sinalização envolvidas na ativação específica de defesa da planta (FELLBRICH *et al.*,2002).

A presença de glutaminase somente foi identificada no cultivo quando crescido com apotécio. Glutaminase é uma importante enzima que catalisa a desaminação da L-glutamina para ácidos e íons de amônio L-glutâmico, produzida através filtrados de culturas de *T. reesei*, e otimizado devido a sua crescente relevância para a indústria de alimentos fermentados e propriedades antileucêmica (BULBUL & KARAKUS, 2013).

Uma T₂ RNase, da família das endorribonucleases foi identificada em nosso trabalho tanto em parede celular quanto escleródio e confirmadas através de análises genômicas. Em todas as condições analisadas houve expressão dos genes T₂ RNase. Estas T₂ RNase podem ter uma função protetora, apresentando sua expressão elevada em resposta a ferimentos ou invasão do fitopatógeno. Macintosh *et al.*(2001) sugerem que essas T₂ RNases podem agir como reguladores da permeabilidade da membrana de *S. cerevisae*.

As mudanças observadas no secretoma de *T. harzianum* em função da fonte de carbono podem ser um indício de que a composição dos complexos multienzimáticos secretados pelo fungo estariam igualmente sob influência da fonte de carbono utilizada na cultura. Resultados semelhantes foram obtidos por (GONZALEZ-VOGEL, EYZAGUIRRE *et al.*, 2011) na detecção de complexos no secretoma do fungo aeróbico *Penicillium purpurogenum* no qual foram observadas diferenças nas enzimas dos complexos em função ao uso de polpa de beterraba, sabugo de milho ou xilana acetilada como fonte de carbono.

Expressão Gênica

Foram realizadas a análise de genes de todas as proteínas identificadas nos mapas proteomicos dos meios cultivados, foi feita PCR em tempo real usando RNA total de *T. harzianum* crescido na presença das três fases do ciclo de vida da *S. sclerotiorum* (micélio, escleródio e apotécio) e glicose como controle (Tabela 7). O RNA foi isolado após 48 h de crescimento nessas quatro condições: parede celular (micélio), escleródio, apotécio e glicose. A análise do perfil de proteínas secretadas de *T. harzianum*, bem como a expressão de seus genes nas diferentes fases do ciclo de vida de *S. sclerotiorum*. Primeiramente avaliamos em condições *in vitro* (tabela 7) genes que codificam proteínas identificadas nos géis por espectrometria MS/MS, dentre eles: hidrolases, proteínas de membrana e proteína envolvida na indução de defesa em plantas. Após análise de expressão gênica *in vitro*, foram escolhidos onze genes conhecidos por atuação no micoparasitismo e foi feita análise da expressão gênica *in vivo* (tabela 8). Como controle, foi utilizado glicose como fonte de carbono. Como gene normalizador

Tabela7. Análise da expressão gênica do micélio de *T.harzianum* cultivado em diferentes condições *in vitro*. Os dados são expressos em log₂

Genes	Apotécio Média ±DP	Escleródio Média ±DP	Parede celular Média ±DP
α- 1,2 mannosidase (<i>gh92</i>)	2.45 ±0.47	5.13±0.94	7.79±1.01
α-1,3glucanase (<i>a13gluc</i>)	7.01±0.16	13.56±0.13	8.34±0.09
β-1,6glucanase (<i>b16gluc</i>)	3.45±0.19	1.74±0.36	7.26±0.16
β-1,3glucanase (<i>b13gluc</i>)	4.84±0.2	1.78±0.23	4.4±0.16
α-glucosidase (<i>gh76</i>)	3.06±0.38	1.86±0.55	5.24±0.81
β-galactosidase (<i>gh2</i>)	6.98±0.47	6.41±0.88	7.51±0.88
β-1,3glucanase (<i>gh64</i>)	1.45±0.27	2.23±0.44	7.66±1.66
α-1,3glucanase (<i>gh71</i>)	-4.10±0.7	-1.21±0.25	-0.44±0.05
β-1,3 glucanosiltransferase (<i>geI</i>)	0.44±0.09	0.34±0.13	1.81±0.20
β-1,6-glucan sinthase (<i>b16gsyn</i>)	6.91±0.06	4.86±0.13	4.57±0.22
Endochitinase (<i>gh18</i>)	7.22±0.96	5.82±0.57	8.28±1.92
Endochitinase 33 (<i>chit33</i>)	4.16±0.34	9.31±0.33	5.49±0.37
Endochitinase 37 (<i>chit37</i>)	10.91±0.11	5.01±0.13	11.77±0.26
Endochitinase 42 (<i>chit42</i>)	11.17±0.05	8.78±0.1	11.78±0.27
Catalytic core (<i>ghcore</i>)	0.48±0.12	2.35±0.37	4.53±0.88
Glucoamylase (<i>gamy</i>)	6.10±0.65	4.64±0.08	8.83±0.13
α-glucosidase (<i>agluc</i>)	5.64±0.06	7.23±0.07	5.48±0.14
Peptidase (<i>m6</i>)	7.55±0.94	6.77±0.68	8.69±1.27
Peptidase (<i>m14</i>)	2.33±0.42	0.15±0.02	7.55±2.51
Serine protease (<i>sprt</i>)	9.18±0.12	7.83±0.1	7.19±0.15
Trypsin like protease (<i>PRA1</i>)	5.53±0.25	8.83±0.78	5.83±0.24
Bacillolysin (<i>bac</i>)	7.55±0.94	6.77±0.68	8.69±1.27
Peptidase S9 (<i>S9</i>)	-0.6±0.07	-0.25±0.04	1.36±0.24
Ribonuclease T2-	9.85±0.66	8.19±0.95	10.76±1.44

secreted RNase (<i>rnase132</i>)			
Ribonuclease T2- secreted RNase (<i>rnase235</i>)	-0.07±0.02	-0.26±0.04	5.98±1.27
Ribonuclease T2- secreted RNase (<i>rnase235'</i>)	3.78±1.45	0.96±0.16	8.05±2.03
Necrosis inducing protein (<i>NPP1</i>)	2.96±0.08	0.18±0.01	2.32±0.2
Cysteine-rich protein (<i>cys</i>)	18.27±1.05	14.15±1.09	21.5±2.13
Cysteine-rich protein (<i>Sm1</i>)	2.5±0.08	-3.66±0.11	0.58±0.02
Esterase_lipase (<i>lip</i>)	1.88±0.25	-0.09±0.00	1.59±0.37
N-acetil B-D glicosaminidase (<i>nag1</i>)	4.83±0.05	1.88±0.11	5.55±0.25
Amidase (<i>amid</i>)	1.71±0.07	-1.51±0.08	1.56±0.14
Duf1349	3.49±0.19	6.54±0.75	4.18±1.27
Duf1349'	5.61±0.15	6.3±1.33	5.46±0.59
Duf1996	4.99±0.78	7.75±0.54	6.96±1.37
FAD binding domain (<i>fad</i>)	-3.89±0.34	-0.05±0.00	-2.44±0.48

foi utilizado a α -tubulina por ser um gene constitutivo e já testado anteriormente em outros trabalhos realizados pelo Laboratório de Enzimologia. Este estudo demonstrou que os níveis de expressão variam de acordo com a fase do ciclo de vida de *S. sclerotiorum* utilizada como fonte de carbono e nitrogênio (Tabela 7 e 8).

Foram analisadas as expressões de sete genes que codificam para enzimas degradadoras de parede celular de fungos (EDPC): β -1,3(4)-glicanase, β -1,6-glicanase (P1), quatro quitinases (18 kDa, 33 kDa, 37 kDa e 42 kDa), β -1,4-N-acetilglicosaminidase (*nag1*), glicoamilase, α -glicosidase, α -1,3-glicanase, e uma amidase. A expressão de vários genes de EDPC durante o micoparasitismo é bem documentado na literatura (LORITO *et al*, 2010). Em concordância com estes estudos, encontramos vários transcritos que codificam para varias enzimas e estes foram altamente expressos em todas as condições quando comparadas com o controle, exceto a amidase que foi menos expressa em todas as condições quando comparada com glicose. Seu papel no biocontrole ainda não é conhecido.

Os genomas dos micoparasita *Trichoderma spp.* são ricos em genes que codificam enzimas como quitinases e glucanases (KUBICEK *et al* 2011). Durante a análise da expressão *in vivo*, foi encontrado uma alta expressão de *chit33* enquanto *chit 37* e *chit42* foram subexpressos. Este é um dado interessante, pois ao comparar com análises *in vitro*, todos os genes, *chit 33*, *chit37* e *chit 42* foram superexpressos. Druzhinina *et al* (2011) sugerem o envolvimento de quitinases no biocontrole, embora

os efeitos da supressão do *chit42/ech42* não foram muito drásticas. Possivelmente por causa de um grande reservatório de genes com um efeito de compensação. Glucanases são outro grupo de enzimas líticas de parede celular com papéis em micoparasitismo/biocontrole.

A β -1,6-glicanase está presente na parede celular da maioria dos fungos fitopatogênicos. Análises de β -1,6-glicanases (P1) mostraram que houve grande diferença de expressão quando comparada as condições (apotécio, escleródio e micélio) e em relação ao teste *in vitro* e *in vivo*. Na condição de apotécio, a expressão de β -1,6-glicanase foi 32 vezes maior quando realizado teste *in vivo*, já em relação ao escleródio, β -1,6-glicanase foi 1000 vezes mais expresso *in vivo* do que quando comparado aos testes *in vitro*. Provavelmente devido ao fato de os testes realizados *in vitro* terem sido cultivados em meio líquido e todas as estruturas como o apotécio, escleródio e a parede celular foram autoclavadas, maceradas, o que aumentaria a superfície de contato para a ação da enzima enquanto os testes realizados *in vivo* essas estruturas foram cultivadas em placa, num modelo que simula o micoparasitismo (Figura.9) Assim as estruturas da *S. sclerotiorum* se encontram na forma altamente compacta, para a degradação de escleródio, apotécio e parede celular pelo *T.harzianum*, provavelmente será necessária uma quantidade muito maior dessa enzima.

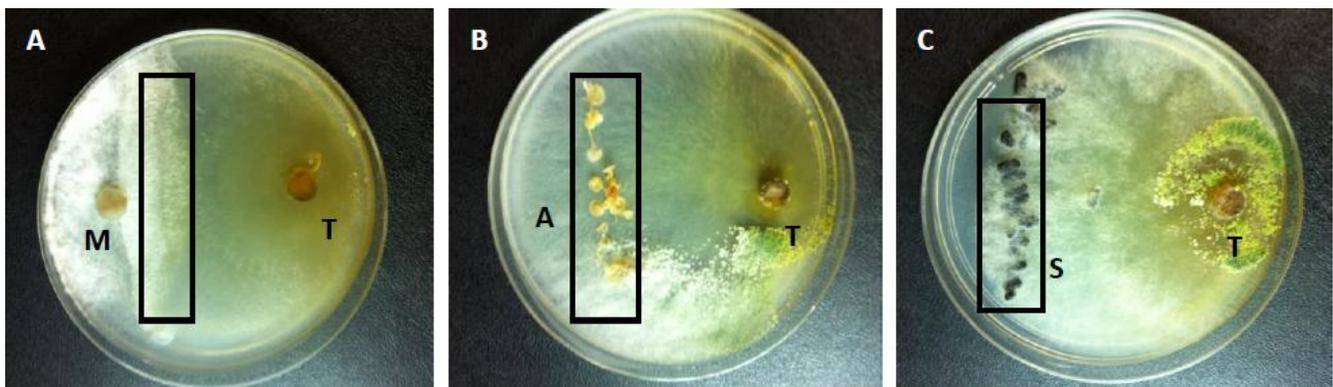


Figura 9 placas mostrando o micoparasitismo entre o *T. harzianum* e as estruturas do fitopatogeno

S.sclerotiorum. A área destacada é o local da coleta de material para a análise da expressão gênica *in vivo*. Legenda T- *T. harzianum*,M- micélio, A-apotécio, S- escleródio.

Tabela8. Análise da expressão gênica do micélio de *T.harzianum* cultivado em diferentes condições *in vivo*. Os dados são expressos em \log_2

Genes	Parede celular média \pm dp	Escleródio média \pm dp	Apotécio média \pm dp
endochitinase (<i>chit33</i>)	11.04 \pm 1.43	11.86 \pm 0.65	13.73 \pm 2.59
endochitinase (<i>chit37</i>)	-3.40 \pm 0.43	-7.25 \pm 1.24	-4.51 \pm 0.10
endochitinase (<i>chit42</i>)	-2.84 \pm 0.34	-6.12 \pm 0.28	-3.09 \pm 0.25
n-acetyl-b-d- glucosaminidase (<i>nag1</i>)	0.93 \pm 0.13	-2.71 \pm 0.64	-0.11 \pm 0.00
α -1,2-mannosidase (<i>gh92</i>)	5.40 \pm 0.52	4.56 \pm 0.64	4.16 \pm 1.17
α -1,3-glucanase (<i>a13gluc</i>)	7.51 \pm 0.46	7.76 \pm 1.02	10.55 \pm 0.31
β -1,6-glucanase (<i>b16gluc</i>)	13.72 \pm 3.33	14.07 \pm 2.73	17.16 \pm 5.04
β -1,3-glucanase (<i>b13gluc</i>)	2.49 \pm 0.18	-3.41 \pm 0.33	-0.18 \pm 0.02
peptidase s9 (<i>s9</i>)	-1.15 \pm 0.18	-3.66 \pm 0.41	-1.07 \pm 0.11
trypsin-like (<i>pra1</i>)	6.96 \pm 1.06	7.30 \pm 1.27	10.10 \pm 1.24
serine protease (<i>sprt</i>)	2.95 \pm 0.25	1.03 \pm 0.15	3.47 \pm 0.17

Djonovic et al (2006) clonaram o gene *tvbgn3* que codifica β -1,6-glucanase para *T.virens*, mostrando que supressão de *tvbgn3* (β -1,6-glucanase encoding) reduziu o potencial de micoparasitismo e biocontrole de *T. virens* contra *P. ultimum*. O padrão de regulação do gene *tvbgn3* sugere um papel de degradação em polímeros de glucana do fungo hospedeiro proporcionando ao *Trichoderma* uma fonte de carbono nutricional. Conforme descrito por outras enzimas hidrolíticas, β -1,6-glucanases podem também desempenhar um papel no desenvolvimento de fungos, incluindo hifas crescimento e ramificação, esporulação, ou autólise, após o esgotamento da fonte de carbono externa (PITSON et al 1993).

Três genes de proteases que codificam para serino endopeptidase, tripsina-like e bacilolisina foram identificados nos géis do secretoma de *T. harzianum* crescido em apotécio de *S. sclerotiorum*, e seus níveis de expressão foram investigados. Os resultados mostraram que estes genes têm padrões de expressão similares tanto nos testes *in vitro* quanto *in vivo* (tabela 7 e 8). Ambos transcritos foram expressos em altos níveis em todas as fontes utilizadas. Estas proteases podem participar do processo de quebra da parede celular ou agir como inativadores proteolíticos de enzimas patogênicas. Algumas proteases foram identificadas tendo funções no biocontrole (MONTEIRO *et al.*, 2010), incluindo aspartil protease (VITERBO *et al.*, 2004; LIU & YANG, 2007), serino protease (LIU *et al.*, 2009) e subtilisin-like protease (YAN & QIAN, 2009). É a primeira vez que se identifica uma bacilolisina em fungos filamentosos, este dado mostra que esse gene pode ter um papel importante na interação micoparasítica entre *T. harzianum* e *S. sclerotiorum*.

O transcrito SSCP (Cysteine-rich protein) foi altamente expresso em todas as condições. Esta classe de proteínas tem caracteristicamente menos que 300 aminoácidos e quatro ou mais resíduos de cisteína conservados (KUBICEK *et al.* 2011). A função das proteínas pertencentes à este grupo ainda não foram preditas ao certo. A conservação desses genes sugere que eles estão presentes na superfície da hifa e tem um papel importante na interação com outros organismos

(DRUZHININA *et al.* 2012). A SM1 é uma proteína pequena secretada com aproximadamente 17 kDa e que está intimamente envolvida com o processo de indução de defesa em plantas (DJONOVIC *et al.*, 2006). Esta proteína foi identificada no gel bidimensional quando utilizado apotécio como fonte indutora e sua expressão foi analisada. Somente quando utilizado apotécio como fonte de carbono, a expressão de *sm1* foi significativamente maior (tabela 7). Esse é um dado interessante e que posteriormente deve ser estudado.

Proteínas de síntese de parede celular (β -1,3-glicosil transferase e β -1,6-glucana sintase) foram encontradas no secretoma e a expressão dos seus transcritos foi analisada (tabela 7). A expressão de β -1,3-glicosil transferase foi menor quando comparada com o controle, exceto na interação com escleródio. Já a β -1,6-glucana sintase foi bastante expressa em todas as condições, com destaque para

a interação com apotécio. Estes dados sugerem que a expressão de polímeros de β -1,6-glucana é mais importante para a montagem da parede celular de *Trichoderma* que polímero de β -1,3-glucana.

Um dado interessante encontrado no secretoma foi a proteína NPP1, um fator que induz necrose em plantas. Esta proteína é produzida por várias bactérias e fungos e tem como função a indução de fatores de imunidade inata em plantas (QUTOB *et al*, 2006). O transcrito foi mais expresso nas condições de apotécio e parede celular, não houve diferença de expressão em escleródio. Este dado sugere uma maior indução de imunidade em plantas, por parte do *Trichoderma*, quando existe a presença do fitopatógeno. Com isto a eficiência do biocontrole pode ser maior. Este é um dado interessante e que deve ser investigado utilizando experimentos *in vivo* para confirmar esta hipótese.

A proteína identificada como NPP1 é uma proteína que pode atuar como um indutor da resistência das plantas. Infiltração de NPP1 de *Phytophthora sp.* em folhas de planta *Arabidopsis thaliana* resulta em acúmulo de transcrição de genes (PR) relacionadas à patogênese, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e etileno, calose e morte celular como resposta hipersensível (FELLBRICH *et al* 2002). O gene NPP1 pode ser induzido por algum elicitor do fitopatógeno ou por algum outro mecanismo que não a presença da planta, uma vez que NPP1 foi superexpresso, na presença de todas as condições estudadas

Foram identificadas três proteínas hipotéticas, sendo que a expressão destas (DUF1349, DUF1996, DUF1349') apresentava-se maior quando crescida na presença de escleródio como fonte de carbono, foi confirmada através da PCR em tempo real, porém com funções ainda desconhecidas necessitando assim uma investigação maior. Kim *et al* (2007) relataram um aumento da expressão de um domínio conservado marcado como DUF1349 durante a osmo Adaptação do mapeamento do proteoma do *Aspergillus nidulans*, sugerindo que a proteína XP_6807553.1 e o domínio DUF1349 possuem um importante papel na osmo Adaptação.

6. CONCLUSÕES

- Como mostrado através da microscopia eletrônica de varredura, o *T. harzianum* mostrou ser um bom antagonista de *S.sclerotiorum*, sendo eficaz na inibição desde o contato até a colonização das hifas, apotécios e escleródios.
- Mapas proteômicos das diferentes condições de crescimento foram construídos com sucesso, permitindo a visualização de diferenças de proteínas secretadas do isolado 303/02 quando crescido com *S.sclerotiorum* em todas as fases de seu ciclo de vida.
- Das proteínas identificadas no secretoma é possível concluir que o *T. harzianum* 303/02 é capaz de secretar diferentes proteínas de acordo com sua fonte de nitrogênio, sendo que 5 foram exclusivamente secretadas em meio contendo apotécio, 9 em meio contendo escleródio, 4 em meio contendo parede celular, sendo 11 expressas nas três condições testadas.
- Foi corroborada a capacidade do fungo de secretar proteínas envolvidas em processo de controle biológico de fitopatógenos como quitinases, glicanases e proteases, propriedade esta amplamente estudada na espécie.
- A análise proteômica do secretoma de *T. harzianum* revelou que as diferentes formas do ciclo de vida da *S.sclerotiorum* induzem a produção de proteínas e expressão gênica diferenciada pelo micoparasita, evidenciando o aparato genético que este fungo tem para poder obter energia de diversas fontes, inclusive fungos fitopatógenos.
- A avaliação desses genes confirmaram as proteínas identificadas nos mapas proteômicos de *T. harzianum* a serem utilizados como agentes para o controle biológico de micélio, escleródios e apotécio de *S. sclerotiorum*.
- Os dados obtidos podem fornecer um passo em direção ao entendimento ao processo de micoparasitismo *T. harzianum* durante a sua interação com *S.sclerotiorum*. No entanto, estudos futuros, são necessários para caracterização funcional de alguns genes e proteínas aqui relatados, ajudando a definir melhores caminhos envolvidos no processo de interação entre *T. harzianum* e *S.sclerotiorum*.

7. Referencias Bibliográficas

ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A.; GODOY, C.V.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C. Doenças de Soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. CAMARGO, L.E.A. (Ed.) Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2. p. 569-588.

ALMEIDA, F.B., CERQUEIRA, F.M., SILVA, R.N., ULHOA, C.J., LIMA, A.L., (2007). Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 29: 1189-1193.

ALTINCICEK B, LINDER M, LINDER D, PREISSNER KT, VILCINSKAS A. Microbial metalloproteinases mediate sensing of invading pathogens and activate innate immune responses in the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *Infect Immun*. 2007 Jan;75(1):175-83.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de Fitopatologia. Piracicaba: Agronômica Ceres. v. 1, 4. Ed, p. 383-387, 2011.

ASIF, A.R., OELLERICH, M., AMSTRONG .V,W., RIEMENSCHNEIDER, B., MONOD M., & REICHARD, U. 2007. Proteome of Conidial Surface Associated Proteins of *Aspergillus fumigatus* Reflecting Potential Vaccine Candidates and Allergens. *Journal of Proteome Research*. 4:954–962

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

BETTIOL. W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: Bergamin Filho, A.;Dimati, H.; Amorim, L. Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. Ceres. 3 ed. São Paulo. Cap. 36, p. 717-727, 1995.

BHADAURIA, V., POPESCU, L., ZHAO, W., & PENG, Y. 2007. Fungal Transcriptomics. *Microbiological Research*. 162: 285-298

BOLTON, M.D.; THOMMA, B.P.H.J.; NELSON, b.d. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*, v.7, n.1, p.1-16, 2006.

BOUWS, H., WATTENBERG, A., & ZORN, H. 2008. Fungal secretomes Nature's Toolbox for White Biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80: 381-388

BRADFORD, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

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

BRUNEAU, J.M., MAGNIN, T., TAGAT, E., LEGRAND, R., BERNARD, M., DIAQUIN, M., FUDALI, C., & LATGE, J.P. 2001. Proteome Analysis of *Aspergillus fumigatus* Identifies Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins Associated to the Cell Wall Biosynthesis. *Electrophoresis*. 13:2812–2823

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

CARBERRY, S., NEVILLE, C.M., KAVANAGH, K.A., & DOYLE, S. 2006. Analysis of Major Intracellular proteins of *Aspergillus fumigatus* by MALDI Mass Spectrometry: Identification and Characterization of an Elongation Factor 1B Protein With Glutathione Transferase Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 341: 1096-1104

CARBERRY, S., & DOYLE, E. 2007. Proteomic Studies in Biomedically and Industrially Relevant Fungi. *Cytotechnology*. 53: 95-10

CARLILE, M.J. et al. (2001) *The Fungi*, Academic Press
CARREGAL, L.H.; CAMPOS, H.D.; SILVA, J.R.C. Saiba mais sobre Mofo Branco. Disponível: <http://www.ihara.com.br/index/ezsite.asp?ID=2065>. Acesso em: 20 mar. 2010.

CHAVERRI, P., SAMUELS, G.J. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. *Studies in Mycology*. 48: 1-116, 2003.

CHAVES, D.F.S. Análise proteômica das estirpes selvagens, *ntrC* e *nifA* de *Herbaspirillum seropedicae*. 2004. 95p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

CHET, I.; BENHAMOU, N.; HARAN, S. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: *Trichoderma and Gliocladium – enzymes, biological control and commercial applications* (Harman, G.E.; Kubicek, C.P., eds). London, Taylor & Francis, v. 2, p. 153-72, 1998.

COHEN-KUPIEC, R. et al. Molecular characterization of a novel β -1,3 exoglucanase related to mycoparasitism of *Trichoderma harzianum* Gene. v. 226, n. 2, p.147-154, 1999.

COLEY-SMITH, J. R. & R. C. COOKE. 1971. Survival and germination of fungal sclerotia. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto. California. 9: 65-92.

COSTA, G. R.; COSTA, J. L. S. Influência do solo e de substratos para produção de escleródio na germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. Pesquisa Agropecuária Tropical, v. 36, n. 2, maio/ago. p. 83-87, 2006.

DE LA CRUZ J. et al. Novel endo- β -1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. J. Bacteriol v.177, n.23, p.6937–6945, 1995

DE LA CRUZ, J.; PINTOR-TORO, J.A.; BENÍTEZ, T.; LLOBELL, A. Purification and characterization of an endo- β -1;6-glucanase from *Trichoderma harzianum* related to its mycoparasitism. *J. Bacteriol.* 177, 1864–1987. 1995

DELGADO-JARANA J¹, RINCÓN AM, BENÍTEZ T. Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization. *Microbiology.* 2002 May;148(Pt 5):1305-15.

DESHPANDE, N., WILKINS, M.R., PACKER, N., & NEVALAINEN, H. 2008. Protein Glycosylation Pathways in Filamentous Fungi. *Glycobiology.* 18(8): 626- 637.

DIENER, S.E., DUNN-COLEMAN, N., FOREMAN, P., HOUFEK, T.D., TEUNISSEN, P.J.M., VAN SOLINGEN, P., DANKMEYER, L., MITCHELL, T.K., WARD, M., & DI PIERO, R. M. E GARDA, M. V.. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. *Pesq. agropec. bras.*, vol. 43, n. 9, p. 1121- 1128, 2008.

DJONOVIĆ S, POZO MJ, DANGOTT LJ, HOWELL CR, KENERLEY CM Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Mol Plant Microbe Interact.* 2006 Aug;19(8):838-53.

DJONOVIĆ S, POZO MJ, KENERLEY CM. Tvbg3, a beta-1,6-glucanase from the biocontrol fungus *Trichoderma virens*, is involved in mycoparasitism and control of *Pythium ultimum*. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Dec;72(12):7661-70.

DUBEY SC, BHAVANI R, SINGH B (2011) Integration of soil application and seed treatment formulations of *Trichoderma* species for management of wet root rot of mungbean caused by *Rhizoctonia solani*. *Pest Manag* 67(9):1163-1168.

DUBOURDIEU, D. et al. Investigations of an industrial β -D-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Carb Res* v.144, p.277–287, 1985.

DRUZHININA, I.S., KOMON-ZELAZOWSKA, M., KREDICS, L., HATVANI, L., ANTAL, Z., BELAYNEH, T., KUBICEK, C.P. Alternative reproductive strategies of *Hypocrea orientalis* and genetically close but clonal *Trichoderma longibrachiatum*, both capable of causing invasive mycoses of humans. *Microbiology*. 154: 3447–3459, 2008.

DRUZHININA IS, SEIDL-SEIBOTHV, HERRERA-ESTRELLA A, HORWITZ BA, KENERLEYCM, et al. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat. Rev. Microbiol.* 9:749–59

DRUZHININA, I.S., SHELEST, E., KUBICEK, C.P. (2012) Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. *FEMS Microbiology Letters* doi:10.1111/j.1574-6968.2012.02665.x

EILENBERG H, PNINI-COHEN S, SCHUSTER S, MOVITCHAN A, ZILBERSTEIN A. Isolation and characterization of chitinase genes from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *J Exp Bot.* 2006;57(11):2775-84

ESPOSITO, E. & SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Critic Rev Microbiol*, v. 24, p. 89-98, 1998.

ETHUR, LUCIANA Z.; BLUME, ELENA; MUNIZ, MARLOVE; SILVA, ANTÔNIO CARLOS F.; STEFANELO, DANIELA R. E ROCHA, EDILEUSA K. da. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. *Fitopatologia brasileira*, Brasília, v. 30, n. 2, Abril, 2005.

ETHUR, L.Z.; CEMBRANEL, C.Z.; SILVA, A.C.Fda. Seleção de *Trichoderma* spp. Visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. *Ciência Rural*, v.31, n.5, 2001.

FELLBRICH, G.; ROMANSKI, A.; VARET, A.; BLUME, B.; BRUNNER, F.; ENGELHARDT, S.; FELIX, G.; KEMMERLING, B.; KRZYMOWSKA, M.; NÜRNBERGER, T. NPP1; a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. *Plant J.* **2002**, 32, 375-390.

FERNÁNDEZ-ACERO, F.J. 2007. Proteomic Analysis of Phytopathogenic Fungus *Botrytis cinerea* as a Potential Tool for Identifying Pathogenicity Factors, Therapeutic Targets and for Basic Research. *Arch. Microbiol.* 187: 207–215.

FONTAINE, T. et al. Molecular organization of the alkali insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J. Biol. Chem.* n. 275, p. 27594–27607. 2000

FRANCESCHINI, M.; GUIMARÃES, P, A.; CAMASSOLA, M.; FRAZZON, P, A.; BARATTO, M, C.; KOGLER, V.; SILVA, V, M.; DUTRA, V.; NAKAZOTO, L.; CASTRO, L.; SANTI, L.; VAINSTEIN, H, M.; SCHRANK, A. 2001. Biotecnologia aplicada ao controle biológico. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, nº 23.

FRAVEL, D.R., (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. Annual Review of Phytopathology. 43, 337–359.

FRISCHMANN, A.; NEUDL, S.; GADERER, R.; BONAZZA, K.; ZACH, S.; GRUBER, S.; SPADIUT, O.; FRIEDBACHER, G.; GROTHE, H.; SEIDL-SEIBOTH, V. Self-assembly at Air/Water Interfaces and Carbohydrate Binding Properties of the Small Secreted Protein EPL1 from the fungus *Trichoderma atroviride*. *J. Biol. Chem.* **2012**, 288, 4278-4287.

FRIGHETTO, R. T. S.. Influência do manejo de agrotóxicos no meio ambiente. Fitopatologia brasileira, v. 25, n. suplemento, p. 271-274, 2000.

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

GIRARD, V.; DIERYCKX, C.; JOB, C.; JOB, D. Secretomes: The fungal strike force. *Proteomics* **2013**, 13, 597-608.

GONZALEZ-FERNANDEZ R, PRATS E, JORRIN-NOVO JV (2010) Proteomics of Plant Pathogenic Fungi. *J Biomed Biotechnol* 2010: 932527.

GONZALEZ-VOGEL, A. et al. Proteomic analysis in non-denaturing condition of the secretome reveals the presence of multienzyme complexes in *Penicillium purpurogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 89, n. 1, p. 145-55, Jan 2011.

GRINYER, J. et al. Fungal proteomics: initial mapping of biological control strain *Trichoderma harzianum* *Curr Genet* n. 45, p. 163–169. 2004a

GRINYER, J. et al. Fungal proteomics: mapping the mitochondrial proteins of a *Trichoderma harzianum* strain applied for biological control. *Curr Genet*. n. 45, p.170–175. 2004b.

GRINYER, J. et al. Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics*. v.47, p. 381-388, Jun. 2005.

GRUBER, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology*, v. 158, n. Pt 1, p. 26-34, Jan 2012. ISSN 1465-2080 HALL, R. & NASSER, L.C.B. (1996).

Practice and precept in cultural management of bean diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18:176-185.

HARMAN, G.E. Myths and Dogmas of Biocontrol. *Plant Disease* 84 (4): 377 –393, 2000.

HARMAN,G.E. et al., *Trichoderma* species- Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*. V. 02, p.43-56, Jan, 2004.

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

HERMOSA, M. R. GRONDONA, I., ITURRIAGA, E. A., DI' AZ-MI' NGUEZ, J. M., CASTRO, C., MONTE, E.;GARCIA-ACHA, I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied Environmental Microbiology*, v. 66, p. 1890-1898. 2000.

HERNÁNDEZ-MACEDO, M.L. 2002. Iron-Regulated Proteins in *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinula edodes*: Differential Analysis by Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis Profiles. *Electrophoresis*. 23: 655–661

HAGEDORN DJ, Inglis DA (1986) Handbook of bean diseases. A3374. In: , <http://learningstore.uwex.edu/assets/pdfs/A3374.PDF..>

HORSFALL, J. G. & COWLING, E. B. *Plant Disease: An Advanced Treatise. How Diseases Develop in Populations*. Academic Press, New York, v. 2, 1980.

HUINTER, J.E.; G.S. ABAWI & D.C. CROISER. 1978. Effects of timing, coverage, and spray oil control of white mold of snap bean with benomyl. *Plant DiseaseReport*, 62 (7): 633-637.

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

KAEWCHAI, S. & SOYTONG,K. (2010). Application of biofungicides against *Rigidoporus microporus* causing white root disease of rubber trees *Journal of Agricultural Technology*. 6(2): 349-363. Available online <http://www.ijat-rmutto.com> ISSN 1686-9141.

KIMY¹, NANDAKUMARMP, MARTENMR. Proteome map of *Aspergillus nidulans* during osmoadaptation. *Fungal Genet Biol*. 2007 Sep;44(9):886-95. Epub 2007 Jan 26.

KITAMOTO, Y. et al. Purification and some properties of an exo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Agric. Biol Chem* v. 51, n. 12, p.3385–3386. 1987.

KIRK, P. Index Fungorum. CABI Bioscience, CBS and Landcare Research, available online, ed. 2012. Disponível em www.indexfungorum.org, Acesso em: 17/02/2012.

KRUSZEWSKA, J.S., PERLIŃSKA-LENART, U., GÓRKA-NIEĆ, W., ORŁOWSKI, J., ZEMBEK, P., & PALAMARCZYK, G. 2008. Alterations in Protein Secretion Caused by Metabolic Engineering of Glycosylation Pathways in Fungi. *Acta Biochimica Polonica*. 55(3): 1-10

KUBICEK, C. P et al. *Trichoderma*: From genes to biocontrol. *J. Plant Pathol.* V.83 n.2, p. 11-23. 2001.

KIM, Y.; NANDAKUMAR, M. P.; MARTEN, M. R. Proteomics of filamentous fungi. *Trends in Biotechnology*. v.25 n.9, p. 395-400, Sept. 2007.

KULLNING, C. et al, Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T.harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a Prerequisite for Triggering of *Trichoderma ech42* Gene Expression before mycoparasitic contact. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 66 n.05. p. 2232-2234, May, 2000.

LATGÉ, J. P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Mol Microbiol**, v. 66, n. 2, p. 279-90, Oct 2007.

LEITÃO VO¹, DE MELO LIMA RC, VAINSTEIN MH, ULHOA CJ. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*. *Biotechnol Lett*. Aug;32-2010.

LEITE, R.M.V .B.C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. EMBRAPA – Comunicado técnico n. 76, Embrapa Soja, Londrina, PR., mar. 2005.

LI, G.Q., Huang, H.C., Acharya, S.N., 2003. Antagonism and biocontrol potential of *Ulocladium atrum* on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biol. Control* 28, 11–18.

LIN, W.Y., CHANG J.Y., HISH, C.H., & PAN, T.M. Profiling the *Monascus pilosus* Proteome during Nitrogen Limitation. 2008. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 433-441.

LIU, P. G.; YANG, Q. Identification of genes with a biocontrol function in *Trichoderma harzianum* mycelium using the expressed sequence tag approach. *Res Microbiol*, v. 156, n. 3,p. 416-23, Apr 2005.

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

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

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

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

LUMSDEN, R.D. Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, St. Paul, v. 69, n. 8, p.890-896, 1979.

LUMSDEN, R. D. & LOCKE, J. C. Biological control of damping-off caused by *Phytophthora ultimum* and *Rhizoctonia solani* in soilless mix. *Phytopathology*, v. 79, p. 361-66, 1989.

MADDI, A.; FREE, S. J. α -1,6-Mannosylation of N-linked oligosaccharide present on cell wall proteins is required for their incorporation into the cell wall in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Eukaryot Cell**, v. 9, n. 11, p. 1766-75, Nov 2010.

MARRA R. · P. AMBROSINO · F. VINALE · S. L. WOO · R. CILIENTO · S. LANZUISE · S. FERRAIOLI · I. SORIENTE · S. GIGANTE · D. TURRÀ · F. SCALA · M. LORITO Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach *Current Genetics* V.50 N.5 (2006).

MARTIN, K. et al., Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal β -(1-3) - and β - (1-6)-glucanases. *FEMS Microbiol. Rev.* n. 31. p. 168-192. Jan 2007.

MAZÁÑ, M. et al. Catalytic properties of the Gas family β -(1,3)-glucanosyltransferases active in fungal cell-wall biogenesis as determined by a novel fluorescent assay. **Biochem J**, v. 438, n. 2, p. 275-82, Sep 2011.

MEDINA, M. L.; KIERNAN U. A.; FRANCISCO W. A. Proteomic analysis of rutin-induced secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Fungal Genetics and Biology*. v.41, n.3, p.327-335, March 2004.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo, I. S. & Azevedo, J. L. (Ed.) Controle biológico. Jaguariúna: Embrapa, 1998.

MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. Controle biológico. Jaguariúna: EMBRAPA, Cap. 8. v. 2, p. 263-304 In: (Ed) 2000.

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

MONTEIRO, V. N; ULHOA, C. J. Biochemical Characterization of a β -1,3 Glucanase from *Trichoderma koningii* Induced by Cell Wall of *Rhizoctonia solani*. *Current Microbiology*. v.52, p. 92–96. 2006.

MONTEIRO, V. N. et al. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. *Curr Microbiol*, v. 61, n. 4, p. 298-305, Oct 2010.

MONTERO-BARRIENTOS M, HERMOSA R, CARDOZA RE, GUTIE´RREZ S, MONTE E (2011)Functional analysis of the *Trichoderma harzianum* nox1 gene, encoding an NADPHoxidase, relates production of reactive oxygen species to specific biocontrolactivity against *Pythium ultimum*. *Appl Environ Microbiol* 77: 3009–3016.

MUKHERJEE M, MUKHERJEE PK, HOEWITZ BA, ZACHOV C, BERG G, ZEILINGER S (2012) *Trichoderma*-plant-pathogen interactions: advances in genetics of biological control. *Indian J Microbiol* 54:522–529

MURAD, A.M., LAUMANN, R.A., LIMA, T., SARMENTO, S., NORONHA, E.F., ROCHA, T.L., VALADARES-INGLIS. M.C., FRANCO, O.L. 2006. Screening of Entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* Isolates and Proteomic Analysis of Secretion synthesized in Response to Cowpea Weevil (*Callosobruchus maculatus*) Exoskeleton. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 142: 365-370

NAPOLEÃO, R.; FILHO,A.C.C.; LOPES,C.A.;NASSER, L.C.B.; MAROVELLI, W.A.. Efeito da freqüência da rega e da umidade do solo sobre a germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Summa phytopatol*. Botucatu, v.33, n.1, 2007.

NORONHA E. F, ULHOA C.J. Characterization of a 29-KDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiol Lett. 183:119–123. 2000.

NORONHA E. F, ULHOA C.J. Characterization of a 29-KDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiol Lett. 183:119–123. 2000.

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

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

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

PEBERDY, J. F. Protein secretion in filamentous fungi--trying to understand a highly productive black box. Trends Biotechnol, v. 12, n. 2, p. 50-7, Feb 1994.

PEREIRA, J.L. et al. Novel insights in the use of hydrolytic enzymes secreted by fungi with biotechnological potential. *Letters in Applied Microbiology*. v.44 p. 573-581. 2007.

PHALIP, V., DELALANDE, F., CARAPITO, C., GOUBET, F., HATSCH., D., LEIZE- WAGNER, E., DUPREE, P., VAN DORSSELAER, A., & JELTSCH, J. 2005. Diversity of the Exoproteome of *Fusarium graminearum* Grown on Plant Cell Wall. Current. Genetics. 48: 366-379

PITSON, S. M., R. J. SEVIOUR, AND B. M. MCDUGALL. 1993. Noncellulolytic fungal β -glucanases—their physiology and regulation. Enzyme Microb. Technol. **15**:178–192.

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

POMELLA, A.W.V; RIBEIRO, R.T.S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas – uma visão empresarial. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Eds.). Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas. 1 ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. cap. 15, p. 239-244.

PUNJA, Z. K. AND UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. Trends Biotechnol. 21 (9): 400-407, 2003.

- PURDY, L.H., 1979. Sclerotinia sclerotiorum: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. *Phytopathology* 69, 875–880.
- QUALHATO TF, LOPES FA, STEINDORFF AS, BRANDÃO RS, JESUINO RS, ULHOA CJ (2013) Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnol Lett.* 35(9): 1461-8.
- RAMADA, M.H.S, 2010. Análise do secretoma do fungo *trichoderma harzianum* crescido em presença de glicose ou parede celular de *fusarium solani*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás.
- RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes; their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 2012, 40, D343–D350.
- RICARD J. L. Commercialization of *Trichoderma* based mycofungicide, some problems and solutions. *Biocontrol News Inform*, v. 2, p. 95-98, 1981.
- ROCHA, T.L. et al Eletroforese Bidimensional e Análise de proteomas. *Comunicado Técnico da Embrapa*. Brasília. Outubro, 2005.
- ROMEIRO R. S. Indução de resistência em plantas a patógenos. Viçosa: Ed. UFV, 45 p. (Caderno Didático nº 56), 1999.
- SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 30, n. 5, p. 279-91, May 2003.
- SALLAM NASHWA A.; ABO-ELYOUSR, K. A. and HASSAN, M. A.. Evaluation of *Trichoderma* Species as Biocontrol Agents for Damping-Off and Wilt Diseases of *Phaseolus vulgaris* L. and Efficacy of Suggested Formula. *Egypt. J. Phytopathol.*, vol. 36, n.1-2, p. 81- 93, 2008
- SAMUELS, G.J. *Trichoderma*, a review of biology and sistematics of the genus. *Mycol Res*, v.100, p. 923-35, 1996.
- SANTOS, J. B.; FERREIRA, E. A.; SANTOS, E. A.; SILVAL, A. A.; SILVA A, F. M.; FERREIRA, L. R. Qualidade de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) após aplicação do carfentrazone-ethyl em pré-colheita. *Planta Daninha*, vol.22 no.4, 2004.
- SATO, S., LIU, F., KOC, H., & TIEN, M. 2007. Expression Analysis of Extracellular Proteins from *Phanerochaete chrysosporium* Grown on Different Liquid and Solid Substrates. *Microbiology*. 153: 3023-3033.

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

SCHWARTZ, H.F., STEADMAN, J.R., 1978. Factors affecting *Sclerotium* populations of, and Apothecium production by, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 68, 383–388.

SCHMITT, S., PROKISCH, H., SCHLUNCK, T. 2006. Proteome Analysis of Mitochondrial Outer Membrane from *Neurospora crassa*. *Proteomics*. 6:72–80.

SEIDL, V. et al. A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS J*, v. 272, n. 22, p. 5923-39, Nov 2005

SEIDL, V. et al. Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. *FEBS Journal* v. 273, p. 4346–4359. 2006.

SILVA, OF (2011) Dados de conjuntura da produção de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil (1985–2010). Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. In: <http://www.cnpaf.embrapa.br/apps/socioeconomia/index.htm>.

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

SCHOFFELMEER, E.A.M.; KLIS, F.M.J.; Sietsma, H.; Cornelissen, B.J.C. The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet. Biol.* **1999**, 27, 275-282.

SHORESH M, HARMAN GE (2010) Differential expression of maize chitinases in the presence or absence of *Trichoderma harzianum* strain T22 and indications of a novel exo- endo-heterodimeric chitinase activity. *BMC Plant Biol* 10: 136.

SUÁREZ, M. B. et al. Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*. Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. *Fungal Genet Biol*, v. 42, n. 11, p. 924-34, Nov 2005.

SUÁREZ MB, VIZCAÍNO JA, LLOBELL A, MONTE E. Characterization of genes encoding novel peptidases in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413 using the TrichoEST functional genomics approach. *Curr Genet*. 2007 May;51(5):331-42.

SUN, P., YANG, X.B., 2000. Light, temperature, and moisture effects on Apothecium production of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis.* 84, 1287–1293.

TJALSMA, H., BOLHUIS, JONGBLOED, J.D.H., BRON, S., & VAN DIJL, J. 2000. Signal Peptide-Dependent Protein Transport in *Bacillus subtilis*: a Genome-Based Survey of the Secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 64(3):515-547.

TSENG, SHIH-CHI et al.. Proteomic Study of Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in Response to *Rhizoctonia solani*. *J. Agric.Food Chem.* v. 56, n.16, p. 6914-6922, 2008.

VINALE, F. et al. Application of *Trichoderma harzianum* (T22) and *Trichoderma atroviride* (P1) as plant growth promoters, and their compatibility with copper oxychloride. *Journal of Zhejiang University Science* p. 30, 2–8. 2004.

VITERBO, A. et al. Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Curr Genet*, v. 42, n. 2, p. 114-22, Nov 2002.

WILLETS, H.J. & J.A.L. WONG 1980. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. *Botanical Review*,46 (2): 102-165.

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

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

YADAV BK¹, TARAFDAR JC Ability of *Emericella rugulosa* to mobilize unavailable P compounds during Pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] crop under arid condition. *Indian J Microbiol.* 2007 Mar;47(1):57-63

YANG, H. H. et al. Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. *Mycol Res*, v. 113, n. Pt 9, p. 924-32, Sep 2009.

YANGUI, T.; RHOUMA, A.; TRIKI, M.A.; GARGOURI, K. and BOUZID, J.. Control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* using olive mill waste water and some of its indigenous bacterial strains, *Crop Protection*, v.27 , p. 189–197, 2008

ZEILINGER S, REITHNER B, SCALA V, PEISSL I, LORITO M, MACH RL. Signal transduction by Tga3, a novel G protein alpha subunit of *Trichoderma atroviride* *Appl Environ Microbiol.* 2005 Mar;71(3):1591-7.

ZHOU, Q. et al. Differential involvement of β -glucosidases from *Hypocrea jecorina* in rapid induction of cellulase genes by cellulose and cellobiose. *Eukaryot Cell*, v. 11, n. 11, p. 1371-81, Nov 2012.

8. Anexos

Primers dos genes usados para PCR em Tempo Real

Gene identity	Primers for qPCR (5' to 3')	
	Forward	Reverse
duf1349	TCATAAAGGCCGGCATCGAGTTCA	CTCCAACACATATACCCACGCATC
gh76	TGGAGGCATTTACTGGAGCAAGGA	AGCCTTGGCAATCTGAAGGTAGGT
duf1349'	ACCGATGCGTGGGTGTATGTTGTA	ACCATCATCTTCGTTGAACGCCCA
m4	ACCTTGGATGTTCTCAGGAGCGTT	TTTGATGCCCAAAGGGTGGGTTTC
NPP1	TGTGGTTCTTCGGTCAGGCTATGA	AGGTAGGGAATGAAGGAGATGGGT
gh2	TGAAGGGAAGACCATTGCCTCTGT	TTGAGACAGCTCCAAGTCTCGTAT
m6	AGCAAGTCAAAGACCAGCAACAGC	GCATGGAATAGCGCATCAGCCAAT
Lip	TGCTCAACAACGTCTACTTCGGCT	ACGATGAGCAGAGTCTTGGAGACA
Rna235	ACCAACTATCAGCCAACCCAGGAA	AGCCTGGATAGCAGCCAAAGTGTA
Rna235'	AGCACTCTTGAACCCAGGTGCTAT	TGCAGCCAGAGTGTACGTAGTTGT
gh18	ACTTTGGCCCAGACTTCCTCATCA	TACCAGTCAATGTTGGAGGCCTGT
Ghcore	CAACGCAGCAGTTCTTCAACACCA	CCGCATTGTTCAAGAAGGTTCGCAT
s9	TTCATCCATGGTGGTCTCAAGGT	TTGTTCTGGATGGCGTCGGTATGA
duf1996	TTGCCTTCCCTGCTATTGGTACT	TGGCGTAGACGAATCGGTTGAAGT
sm1	TTGGCAACTTCCGATCCCAGACTA	TGTGGAACCAGTAAGCCGGGAAAT
gh92	TCCGAACTCGCGTTCTAAGCTGAA	AAGTGCCATTTAGGTACCGAGGCT
rnase132	GAAATGGCGCTCTCCAACACAAA	ACCGTCCAAATAAGCGGAAATCCC
Fad	ACTGCTGATGGTAGCCACCTGATT	AATACCGTCTTGTGAACTCGGCT
gh64	ATGCGTACATTTCCGGCCTAGACA	CTTGAGCAGGCAGTGCAATGTTGA
gh71	TGCCAACTACATCCAGACCGAGAA	TACCCTCAAAGTAGTTGCCGCTGT
chit33	CCTCCCATGACCAACTTTGCCAAT	TGGCAAGTCTTGATATCGGCCTCA
chit37	AGGCACCACAATCAAGGTTCCCTA	TTGGACCCATCCCAGTTGATTGAC
chit42	TCAACACCAAGGTTGCCTACCTCA	TCAGCAGGTTCTGAGTTGTGTCCA
a12mam	TTTGCAAACACTACAAGGACCGCTGG	AATGCCTCCCAAGATGAAGTTGCC
b16gsyn	GAAGGATTTCCGGTGCCAGCATTGT	TGGACAATCAGGCCCATGTTGTTG
PRA1	ACCCTGGTTGGTGTGTTTCTTGG	TGATGAAGCTGACGTAGTTGCCCA
Sprt	AATGACCTCCACCGTCGTTCTCTT	ATGTAGTCTGGCTCAACGGAAGCA
P1	CCCCTGAACAACAAGGACGATATG	CAACCAGGATGTGTACTCTTACCC
Gamy	TTCTTTACCGTTGCCAACCAGCAC	CATCTTTTCCAGTCCTGCCTTCGT
agluc75	GTCTGGATGTAATGCGTTGCGCT	TCCATCATTATCCCAGGCCATCCA
nag1	AATGGACAGGTCAACATCAGTGCC	CATGATGCCACGGTGGGGATATTT
Amid	GTGGGCTGATATGCGAAGCAACAA	AATGACATTGGCTCCAACACCGAC
Crich	ACTGCGGCATGGCATGTGATATTC	AACAAATACCACCGCAGTCTGCAC
Bac	GCSTATGACAATGTCCGAACCGTT	CGYTCTTCCGAGTCCCAAAAAGCA
b13gtrans	TTGTTCGACGAGATGCAGCAGTACT	TGGACTTGATGTAGGCCTTGGTGT
a13glu	TGCCGAGAGCTGTATTTGCACACT	GTCGTGTGTATTGAGCGCAAAAGC

Spot/ Gene ID	Description(protein name/species)	NCBI Identity	JGI Protein ID	Precursor ion	Sequences	e-value (NCBI Protein Blast)	Observed IP / MW (kDa)	Theoretical IP / MW (kDa)	Condition
1/cys	Predicted small secreted cysteine-rich protein (<i>Trichoderma virens</i>)	EHK19462.1	511478	1247.57	QAQVGRPCGFK	0.99	4.66/18.53	5.82 / 15.33	apothecium
				1717.66	AAEFCGGFAGFACPAGK	0.16			
				1326.59	FTQQYDAGLQR	0.32			
25,26/gamy	Glycoside hydrolase family 15 protein - Glucoamylase (<i>T. virens</i>)	EHK25059.1	81392	1567.68	YVPADGSLAEQFDR	3.00E-04	4.73/48.98	5.33 / 67.22	apothecium
				1068.54	GIPAGSAVAIGR	0.054			
				1440.95	LGNYVSFINSNGR	0.029			
7/pra1	Trypsin like protease (<i>T. harzianum</i>)	CAC80694.2	526221	1457.90	TVVTAGHCTIDQR	2.00E-04	4.81/29.25	5.18 / 25.80	apothecium
				1526.05	NSPVGLKPTVGLTSR	0.003			
				1657.96	DATYALDAIYGIDTR	6.00E-04			
39/amid	Hypothetical protein - Amidase (<i>T. virens</i>)	EHK26859.1	512736	1777.95	TYEWALEFCQSSTR	0.018	5.12/77.55	5.12 / 58.87	apothecium
				1930.07	DTPAPESEHQDSVGTFR	6.00E-05			
				1372.71	YHWSTQGQIPR	0.001			
				1550.66	DTVSYDTGYDDGSR	2.00E-04			
2/epl1	ep1 (<i>T. harzianum</i>)	AER09349.1	508110	1804.88	SLNVVSCSDGNPGLETR	5.00E-08	6.00/16.93	6.23 / 14.32	apothecium
				1679.96	TLYDQGGLVVTFNPR	0.019			
9/duf1349	Hypothetical protein (<i>T. virens</i>)	EHK16811.1	4165	2229.19	EIEGVIYGAKPTEESGEGHAR	8.00E-08	6.43/27.88	6.20 / 25.26	apothecium
				1671.80	FDQWNTNPAYPYR	0.004			
3/cdb13	Carbohydrate-binding module family 13 protein (<i>T. virens</i>)	EHK19601.1	511345	3612.25	GSTTYVYDSDSAGAGTCSYIIDTGVDATHPEFEGR	3.00E-14	6.32/18.40	6.63 / 17.07	apothecium
				2179.07	NTSPASEPTVCTVGASTSADAR	3.00E-11			
8/sprt	Serine protease - SprT (<i>T. koningii</i>)	ABN04079.1	511032	2387.87	TFVSGENTDGDGHGTHVSGTIGSR	2.00E-11	5.58/32.33	6.30/ 40.43	apothecium
				2771.02	VLDNSGSGTFANVIAGMDFVADDAQTR	6.00E-11			
				1850.75	ANTQYFTQSTTFSQAR	2.00E-07			
45/baclysin	Bacillolysin (<i>Bacillus cereus</i>)	WP_000730361.1	82169	2019.85	SLNTTSLGSSYYLQDNTR	6.00E-09	5.46/34.41	5.92 / 60.65	apothecium
				2283.19	QVAPLDTAPDSVFFHPEQER	3.00E-165			
19,40/cdb9	Hypothetical protein - CDB9-like domain - carbohydrate binding (<i>T. virens</i>)	EHK26772.1	511848	3272.86	TTPSILYPNQLTGGWSPPDQASFHITK	6.00E-12	6.09/43.13	5.60 / 25.09	apothecium
				2128.97	GYGEYLPEADSQTQIAVAKR	8.00E-08			
16,17/m14	Hypothetical protein - Peptidase m14 (<i>T. virens</i>)	EHK25112.1	514267	2652.25	YSTSFAGSADLYPTSGASDDYAYSR	5.00E-08	6.92/43.34	7.60 / 46.98	apothecium
				2198.07	GQFLSNGTLTGHDIDYR	2.00E-09			
				936.52	YVGLLDTR	15			
34,35/glut	Hypothetical protein - glutaminase-like (<i>T. virens</i>)	EHK25695.1	84515	1737.88	QAFGALQYGTDPNVR	4.00E-07	5.51/75.56	5.59 / 76.49	apothecium

28/S9	Predicted protein - Peptidase S9 (<i>T. reesei</i>)	EGR51541.1	476987	1951.05	DSIAAGGQDYLTITSLAVR	3.00E-09	4.79/73.62	5.91/76.83	apothecium
				998.57	IYTSLFVR	15			
				1678.83	SLPTPIHEDGSVAEAR	1.00E-06			
				2666.26	SLDNGASSNVAQHVLDPESNTIQR	4.00E-06			
44/ glyo	Hypothetical protein - putativa glyoxal oxidase protein (<i>T. virens</i>)	EHK15719.1	506446	1487.80	LYHSEAITLLDGR	3.00E-04	4.71/74.58	4.74 / 117.47	apothecium
				1606.87	TLPNIPGSVNDPLGGR	1.00E-06			
				1682.82	QLTVGGWSGDSTYGVR	5.00E-07			

Spot/Gene ID	Description(protein name/species)	NCBI Identity	JGI Protein ID	Precursor ion	Sequences	e-value (NCBI Protein Blast)	Observed IP / MW (kDa)	Theoretical IP / MW (kDa)	Condition
36/b16gluc	Glycoside hydrolase family 30 protein - β -1,6-glucanase (<i>T. virens</i>)	EHK19451.1	485240	1492.68	LATESESQTWNAR	2.00E-04	6.14/53.71	5.99/ 51.70	sclerotia
				1521.67	EIDYYMLGQFSR	1.00E-04			
				1830.84	LNHAYENAYAQYFVK	2.00E-07			
27/gel	Glycoside hydrolase family 72 protein - β -1,3-glucanosyltransferase (<i>T. virens</i>)	EHK19699.1	150179	3117.43	GAVVVDGTGSWLFDPN TGVESVATVNP DGTR	2.00E-11	4.31/35.67	4.93/ 37.96	sclerotia
				1579.82	DIPLLQQLGTNVIR	2.00E-05			
				1679.17	WQGVGYAANDD VDIR	4.00E-07			
48/gh18	Glycoside hydrolase family 18 protein - GH18 chitinase-like (<i>T. virens</i>)	EHK18477.1	2921	2393.26	LLNDAGIYVFS DLGEP SLSINR	3.00E-13	4.31/35.67	4.93/ 37.96	sclerotia
				2892.25	DVITNFQLEGMDLDVEQPMSLAGITR	4.00E-15			
				3283.21	TAQGSPIDWYNTQFYSGFGSMSTTSDYDR	1.00E-15			
49/ghcore	Hypothetical protein - GH catalytic core (<i>T. virens</i>)	EHK22537.1	150757	3500.54	ADFGVLFLITLAPVASALENSSNLSGFNYSRLR	6.00E-10	5.31/29.60	5,74/ 31.77	sclerotia
				1010.55	YSYFGAFR	7.6			
8/sprt	Serine protease - SprT (<i>T. koningii</i>)	ABN04079.1	511032	2035.09	SNVSNVGP NATFLNNAGR	1.00E-8	5.65/32.78	6.30/ 40.43	sclerotia
				1446.72	AFVSQTGAPWGLGR	0.034			
7/pra1	Trypsin like protease (<i>T. harzianum</i>)	CAC80694.2	526221	2179.07	NTSPASEPTVCTV GASTSADAR	3.00E-11	5.12/28.96	5.18/ 25.80	sclerotia
				1440.95	LGNYVSFINSNGR	0.029			
38/duf1996	Hypothetical protein (<i>T. virens</i>)	EHK24053.1	5064.46	1457.90	TVVTAGHCTIDQR	2.00E-04	6.32/34.40	6,48/ 35.89	sclerotia
				1229.69	ILDNSNYWQPQLYHQR	2.00E-9			
1/cys2	Predicted small secreted cysteine-rich protein (<i>T. virens</i>)	EHK48087.1	518220	1315.60	AIQHVCLDTQPVPD TDGFPTR	2.00E-9	5.10/13.69	5.52/ 15.67	sclerotia
				1404.73	SQTIFPSGLADIR	5.00E-04			
				1494.68	ADFPAYWFHNAR	8.00E-05			
4/ rnase132	Predicted protein - Ribonuclease T2-secreted RNAse (<i>T. virens</i>)	EHK18016.1	520729	1622.77	KADFPAYWFHNAR	9.00E-06	6.64/15.57	7.68/ 14.57	sclerotia
				1695.85	SLFTFVNEGENLVAR	1.1			
33/fad	Predicted protein - FAD binding domain (<i>T. reesei</i>)	EGR53026.1	507229	1349.59	YSSSYNGPALK	0.27	5.83/63.31	6.49/ 62.56	sclerotia
				2147.00	DVEGVNALMKPFLDDL TNR	4.00E-07			
30,31,32/agluc75	Glycoside hydrolase family 71 protein - Alpha-1,3-glucanase (<i>T. harzianum</i>)	CAC80493.1	525334	1532.89	NWVFPGGPLLYNR	1.00E-04	5.46/91.14	5.92/ 67.72	sclerotia
				1660.91	YVQNEQLVYWYR	2.00E-05			
47/gh64	Glycoside hydrolase family 64 protein - β -1,3-glucanase B-like (<i>T. virens</i>)	EHK20867.1	514104	1213.58	LVHQFELDGR	2.7	4.59/41.68	5.81/ 46.98	sclerotia
				3168.41	STLLIAGGNVEPGLGQSSYYTVSPTNHYSR	6.00E-15			
14,26/hypot	Hypothetical protein -	EHK17331.1	487382	3270.46	TPAGHNPLQLVDNFSGGQVNAYISGLD TDNR	1.00E-07	4.71/41.01	5.58/ 37.69	sclerotia
				1103.47	TQYTNWYWK	1.1			

	β -1-6-glucan sinthase (<i>T. virens</i>)			1279.49	TFDNNCAYFK	0.02			
39/amid	Hypothetical protein - Amidase (<i>T. virens</i>)	EHK26859.1	512736	2101.93	DNLETCSGSWALLGNLVPR	1.00E-07	6.63/72.17	5.85/ 59.83	sclerotia
21/rnase235	Predicted protein - Ribonuclease T2- secreted RNase (<i>T. reesei</i>)	EGR51298.1	5876	1896.76	DNTGVDESFWHEHEFGK	0.003			
				2182.97	GYGEYNPQADSDTKIAVAKR	8.00E-08	6.46/53.02	5.04/ 26.40	sclerotia
16,17/ m14	Hypothetical protein - Peptidase m14 (<i>T. virens</i>)	EHK25112.1	514267	2529.15	ELLSGLQLANTYGIETFNTPYK	8.00E-12	6.10/42.13	7.60/ 46.98	sclerotia
				2652.01	SYTSFQSADLYPTSGASDDYAYSR	1.00E-14			
23/abf	Alfa-L- arabinofuranosidase (<i>Trichoderma virens</i>)	EHK20391.1	503269	896.49	AYGVFIAPSATYR	6.6			
				1387.82	ALYGAYSGSLYQVSR	8,00E-05	5.10/42.13	5.28/ 52.67	sclerotia
				1070.61	GEPNQWAIR	0.49			
30,31,32/gh71	Glycoside hydrolase family 71 protein - Alpha-1,3-glucanase (<i>T. harzianum</i>)	EHK24030.1	532417	1451.77	NFVFPGGALLFNR	0.017			
				1663.84	LVFCHFMIGIVGDR	2.00E-06	5.07/65.28	5.43/ 64.16	sclerotia
				1756.83	VFASSFAGDGLDVNAMR	4.00E-6			
				2170.12	VGQLNAQYANQPAQLQVDGR	2.00E-08			
28/polygala	Glycoside hydrolase family 55 protein - Probable polygalacturonase (<i>T. virens</i>)	EHK19381.1	84648	1626.78		6.00E-05	4.91/78.31	4.71/108.16	sclerotia
					QGLAPFAPSGYTVYR				
				1679.82	TLYDQGGLVVTFPNR	3.00E-04			
9/duf1349	Hypothetical protein (<i>T. virens</i>)	EHK16811.1	4165	1957.93	WHWLNNPGVEPVSPIGR	6.00E-10	6.45/27.40	6.20/ 25.26	sclerotia
				2137.09	SITIQVPPDTDIWRPALS	5.00E-11			
				2229.01	EIEVGIYGAKPTEESGEGHAR	4.00E-11			
6/NPP1	Hypothetical protein - Necrosis inducing protein (NPP1) (<i>T. atroviride</i>)	EHK39942.1	507042	1916.87	SQDWWYFPVAADYLR	1.00E-07	4.79/29.81	4.76/ 30.82	sclerotia

Spot/Gene ID	Description(protein name/species)	NCBI Identity	JGI Protein ID	Precursor ion	Sequences	e-value (NCBI Protein Blast)	Observed IP / MW (kDa)	Theoretical IP / MW (kDa)	Condition
6/NPP1	Hypothetical protein - Necrosis inducing protein (NPP1) (<i>T. atroviride</i>)	EHK3994 2.1	507042	1916.87	SQDWWYFPVAADYLR	1.00E-07	4.79/29.81	4.76/ 30.82	mycelium
				1190.62	IQYSLFYEK	0.47			
5/agluc	glycoside hydrolase family 76 protein - Alpha-glucosidase (<i>T. virens</i>)	EHK2223 0.1	3063	1217.62	NAQSIWNNDR	0.041	4.62/28.02	5.44/ 43.97	mycelium
				1355.74	YLNDLAPSSTFK	3.3			
27/gel	Glycoside hydrolase family 72 protein - β -1,3-glucanosiltransferase (<i>T. virens</i>)	EHK1969 9.1	150179	1679.17	WQGVGYAANDDVIDR	4.00E-07	4.53/48.60	4.63/ 56.87	mycelium
				2100.08	NFPVPIFLSETGCIVPGPR	6.00E-11			
43/gh2	Glycoside hydrolase family 2 protein - β -galactosidase/ β -glucuronidase (<i>T. virens</i>)	EHK2586 9.1	80759	1515.74	GSNFVPPDPFWPR	2.00E-05	4.76/106.98	4.75/ 103.33	mycelium
				2308.08	NHHYPPGSLTTNNTADPLR	1.00E-10			
				1515.73	GSNFVPPDPFWPR	2.00E-05			
42/m6	Predicted protein - Peptidase M6 (<i>T. reesei</i>)	EGR4615 9.1	92805	1058.60	SVVSDLIGLR	1.5	4.64/75.03	4.85/ 71.66	mycelium
				1358.65	YGVDLTAFGYPR	1.3			
				1326.62	FTQQYDAGLQR	0.46			
25,26/gamy	Glycoside hydrolase family 15 protein - Glucoamylase (<i>T. virens</i>)	EHK2505 9.1	81342	1567.71	YVPADGSLAEQFDR	4.00E-04	4.92/46.03	5.37/ 78.81	mycelium
				2828.24	SAGAVIASPSTTDPDYYSNWTR	1.00E-07			
				1326.64	FTQQYDAGLQR	0.46			
8/sprt	Serine protease - SprT (<i>T. koningii</i>)	ABN0407 9.1	5561	2771.29	VLDNSGSGTFANVIAGMDFVADDAQTR	5.00E-11	5.68/33.38	6.30/ 40.43	mycelium
				2179.07	NTSPASEPTVCTVGASTSADAR	3.00E-11			
				1645.89	STVTVPLGIFNVDVGK	1.00E-05			
19,40/cdb9	Hypothetical protein - CDB9-like domain - carbohydrate binding (<i>T. virens</i>)	EHK2677 2.1	511848	1646.03	SLSTVPLGIFNVGVS	1.2	5.58/34.68	5.60/ 25.09	mycelium
				3272.86	TTPSILYPNQTLGGWSPPDQASFHITK	6.00E-12			
				1310.71	FALQYPSTIDR	0.087			
49/lip	Hypothetical protein - Esterase_lipase (<i>T. virens</i>)	EHK1748 9.1	105726	1687.95	LVLVDPVGLLEDYVEK	3.00E-06	5.08/42.05	5.34/ 37.04	mycelium
				2269.12	SSKPDNYQFSINQLANWTR	4.00E-04			
				2408.19	GVPYVSVDDDIAAEAAQNFSSPR	7.00E-06			
				2529.15	ELLSGLQGLANTYGIETFNTPYK	8.00E-12			
16,17/m14	Hypothetical protein - Peptidase m14 (<i>T. virens</i>)	EHK2340 9.1	105686	2652.01	SYTSFQSADLYPTSGASDDYAYS	1.00E-14	5.89/44.17	7.60/ 46.98	mycelium
				2182.97	GYGEYNPQADSDTKIAVAKR	8.00E-08			
				2357.14	YGFVLPANQIVPSGEEAYAGFK	3.00E-12			

18/rnase235	Predicted protein - Ribonuclease T2-secreted RNase (<i>T. reesei</i>)	EGR5129 8.1	5876	1896.74	DLSGNDESFWEHEFGK	3.00E-05	6.35/44.66	5.04/ 26.40	mycelium
				1657.77	DATYALDAIYGIDTR	6.00E-04			
				1777.74	TYWEALEFCQSSTR	2.00E-05			
				1929.86	DGVIPSEHQDSVGTFR	6.00E-08			
14,26/hypot	Hypothetical protein - β -1-6- glucan synthase (<i>T. virens</i>)	EHK1733 1.1	8924	1279.52	TFDNNCAYFK	0.029	5.49/34.45	5.58/ 37.96	mycelium
				1486.82	AFPVGWFLHAWR	0.096			

A proteína ID refere-se ao número da Figura 7. Gene ID é o nome usado para identificar o gene para a análise de RT-qPCR. Identificação de proteínas é listada como GHS, proteases e outras funções

JGI Protein ID foi obtida a partir do *Trichoderma harzianum* CBS226.95 genome v1.0 (<http://genome.jgi.doe.gov/Triha1/Triha1.home.html>)

PI observado e MM obtida do ImageMaster™ 2D Platinum v7.0

Teórico PI e MM (kDa) observada a partir da sequência obtida a partir de NCBI por Peptide Mass tool (http://web.expasy.org/peptide_mass)