



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Identificação, expressão e análise de genes de
Trichoderma harzianum com potencial biotecnológico**

Tese de Doutorado apresentada à banca examinadora
do programa de pós-graduação em Biologia Molecular
da Universidade de Brasília.

Pabline Marinho Vieira

Orientador: Cirano José Ulhoa, PhD

Co-orientador: Francisco José Lima de Aragão, PhD

Brasília - 2014

Desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

Ao Professor Cirano José Ulhoa, meu orientador, pelo acompanhamento, incentivo e apoio durante esses anos de trabalho.

Ao Dr. Francisco Aragão, meu co-orientador, pela competência científica, disponibilidade e generosidade nos experimentos em seu laboratório.

I would like to express my gratitude to my advisor, Dra. Susanne Zeilinger, for the given support during my work at Vienna University of Technology (TU Wien).

Aos Professores Alexandre Coelho e Roberto Silva, pelas críticas, correções e sugestões relevantes durante a elaboração do artigo.

Aos colegas da Universidade Federal de Goiás, em especial, do Laboratório de Enzimologia e Biologia Molecular : Andrei, Marcelo, Marcela, Saulo, Valdirene, Rogério, Renata, Vanessa, Fabiano, AmandaS, João Paulo, pelas contribuições acadêmicas e momentos especiais.

Aos colegas da EMBRAPA-CENARGEN: Ana Zotta, Júlio, Luciano Paulino, Nicolau e, em especial, aos colegas do Laboratório de Engenharia Genética: Elsa, Cristiane, Cristiana, Pedro, Lidia, Mirella, Abdul, Nayanne, Leonardo, Maria Laine, Gláucia, Angélica, Heitor, Franciele, Lílian, Taís e Tomas, pelo apoio, paciência, cafés e carinho.

Aos meus amigos e familiares, especialmente: Cleber Vieira e Pâmella Resende, por me receberem com tanta atenção e amor.

À Universidade Federal de Goiás, Universidade de Brasília, Vienna University of Technology (TU), CAPES e CNPq, pelos auxílios prestados.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Robert Neil Gerard Miller

Instituto de Biologia, Universidade de Brasília

Dr. Josias Correa de Faria

Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Profa. Dra. Eliane Ferreira Noronha

Instituto de Biologia, Universidade de Brasília

Dr. Cristiano Lacorte

Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

SUPLENTE

Dr. Julio Carlyle Macedo Rodrigues

Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Profa. Dra. Raphaela Georg

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. IMPORTÂNCIA DE <i>Trichoderma</i> NA AGRICULTURA	1
1.2. PREJUÍZOS ECONÔMICOS CAUSADOS POR FUNGOS FITOPATOGÊNICOS NA AGRICULTURA	2
1.3. O ESTUDO DO BIOCONTROLE REALIZADO POR <i>Trichoderma</i>	3
1.3.1. Análise de transcriptomas de <i>Trichoderma</i>	3
1.3.2. Análise de bibliotecas subtrativas de <i>Trichoderma</i>	4
1.3.3. Transformação genética de <i>Trichoderma</i> para o estudo do biocontrole	6
1.4. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS UTILIZANDO GENES DE <i>Trichoderma</i>	7
2. JUSTIFICATIVA	9
3. OBJETIVOS	10
3.1. OBJETIVOS GERAIS	10
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
CAPÍTULO I: Identificação de genes diferencialmente expressos em <i>Trichoderma harzianum</i> durante a interação com parede celular de <i>Fusarium solani</i> como estratégia de aplicação biotecnológica	11
1. Artigo publicado: Identification of differentially expressed genes from <i>Trichoderma harzianum</i> during exposure to <i>Fusarium solani</i> cell wall as a tool for biotechnological application	11
CAPÍTULO II. Validação <i>in vivo</i> de uma aquaporina identificada no agente de biocontrole <i>Trichoderma harzianum</i>	23
1. INTRODUÇÃO	23
2. METODOLOGIA	24
2.1. METODOLOGIA PARA A TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Trichoderma harzianum</i> E BIOENSAIOS	24
2.1.1 Manutenção dos fungos	24

2.1.2. Construção do vetor e transformação de <i>Trichoderma harzianum</i> via biobalística	25
2.1.3. Bioensaios com transformantes de <i>Trichoderma harzianum</i>	26
2.2. METODOLOGIA PARA A TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Nicotiana tabacum</i> E BIOENSAIOS.....	27
2.2.1. Construção do vetor e transformação genética de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>) via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	27
2.2.2. Avaliação das plantas transgênicas quanto a tolerância a estresses bióticos e abióticos	28
3. RESULTADOS.....	28
3.1. RESULTADOS DA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Trichoderma harzianum</i>	28
3.1.1. Bioensaios com <i>Trichoderma harzianum</i> geneticamente modificado.....	28
3.2. RESULTADOS DA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Nicotiana tabacum</i>	35
3.2.1 Transformação genética de <i>Nicotiana tabacum</i> e seleção das progênies	35
3.2.2. Avaliação de tolerância a estresses abióticos em linhagens de tabaco transgênico	37
3.2.3. Avaliação de tolerância a fitopatógeno em <i>Nicotiana tabacum</i> geneticamente modificado	40
4. DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÃO	45
PERSPECTIVAS/TRABALHOS EM DESENVOLVIMENTO	46
REFERÊNCIAS	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estratégia para a construção do vetor de superexpressão de aquaporina em *Trichoderma harzianum*.

FIGURA 2: Vetor de superexpressão de aquaporina de *Trichoderma* em plantas de *Nicotiana tabacum*.

FIGURA 3: PCR de transformantes de *Trichoderma harzianum* em gel de agarose.

FIGURA 4. Análise fenotípica dos transformantes de *T. harzianum* no tempo de 24 horas.

FIGURA 5. Análise fenotípica dos transformantes de *T. harzianum* no tempo de 48 horas.

FIGURA 6. Análise fenotípica dos transformantes de *T. harzianum* no tempo de 72 horas.

FIGURA 7. Análise fenotípica dos transformantes de *T. harzianum* no tempo de 9 dias.

FIGURA 8. Bioensaios de micoparasitismo com transformantes de *T. harzianum*.

FIGURA 9: Transformação de explantes foliares de *Nicotiana tabacum* com vetor contendo aquaporina de *Trichoderma* e etapas de desenvolvimento e florescimento.

FIGURA 10: Bioensaios de germinação de sementes de *Nicotiana tabacum* superexpressando aquaporina.

FIGURA 11: Bioensaios de crescimento de linhagens de tabaco transformadas e não transformada sob condições de estresse salino em cultivo hidropônico.

FIGURA 12: Bioensaios de resistência a fitopatógeno em plantas de tabaco geneticamente modificadas.

RESUMO

Trichoderma harzianum é um microorganismo de controle biológico eficaz contra várias espécies de patógenos de plantas. Dentre estes, *Fusarium solani* é um importante causador de prejuízos econômicos na agricultura. Nesse trabalho, através de bibliotecas subtrativas (SSH) e RT-PCR tempo real, foram identificados genes de *T. harzianum* que estão envolvidos no controle biológico deste fitopatógeno. A análise comparativa de respostas transcricionais em *Trichoderma harzianum* permitiu uma interpretação abrangente do micoparasitismo, identificou genes marcadores para o biocontrole, e principalmente, de interesse biotecnológico na agricultura. Como os desafios em biotecnologia agrícola incluem identificar genes para estratégias de resistência a estresses bióticos e abióticos em plantas, uma aquaporina identificada nesta biblioteca foi utilizada para a transformação genética de *Trichoderma harzianum* e *Nicotiana tabacum* (tabaco). Organismos geneticamente modificados com o gene codificador de uma aquaporina foram avaliados em diferentes condições de estresses abióticos (etanol, peróxido de hidrogênio, polietileno-glicol, sorbitol e cloreto de sódio) e biótico (*Fusarium solani*). Em condições ótimas de crescimento, não foram observadas alterações na germinação ou crescimento em *T. harzianum* e tabaco. Em ensaios de tolerância a *Fusarium solani*, linhagens de plantas geneticamente modificadas não apresentaram resistência ao fitopatógeno. Entretanto, nas condições de estresse abióticos avaliadas, aquaporina aumentou a tolerância a estresse salino em ambos os organismos transformados. Sendo assim, nossos resultados confirmam o elevado potencial de *T. harzianum* como fonte de genes com aplicações promissoras em plantas transgênicas resistentes a estresses abióticos sem alteração fenotípica.

PALAVRAS-CHAVES: biocontrole, transformação genética, *Nicotiana tabacum*, fitopatógenos, *Fusarium solani*

ABSTRACT

Trichoderma harzianum, a filamentous soil fungus, is an effective biocontrol agent against many plant-pathogen species. Despite its relevance in plant protection, there is a lack of studies concerning its use as a biological control agent against *Fusarium solani*, which is involved in several crop diseases. In order to provide information about the genes from *T. harzianum* that are involved in the biocontrol of this pathogen, we have used subtractive library hybridization (SSH) and RT-PCR techniques. Transcriptional responses in *Trichoderma harzianum* allowed a comprehensive interpretation of mycoparasitism, identified biocontrol-related genes, and also genes of biotechnological value. Following its identification in our library, a gene encoding an aquaporin has been used to enhance tolerance to biotic and abiotic stresses in both *Trichoderma harzianum* and *Nicotiana tabacum* plants. Transformants were selected and evaluated under different abiotic (ethanol, hydrogen peroxide, polyethylene glycol, sorbitol and sodium chloride) and biotic (*Fusarium solani*) stresses. Analysis under stress-free condition showed that both *Trichoderma harzianum* and tobacco plants transformed with aquaporin did not present differences in growth and germination rates when compared with wild type. Furthermore, potential tolerance against *Fusarium solani* was assessed in plants by challenging leaves with the pathogen and no tolerance was observed in all lines tested. However, evaluations under abiotic stresses revealed that both organisms presented tolerance to salt stresses. Our results underscore the high potential of *T. harzianum* as a source of genes with promising applications in transgenic plants resistant to abiotic stresses without phenotypic alteration.

KEYWORDS: biocontrol, genetic transformation, *Nicotiana tabacum*, phytopathogen, *Fusarium solani*

1. INTRODUÇÃO

1.1. IMPORTÂNCIA DE *Trichoderma* NA AGRICULTURA

A importância da agricultura no país abrange tanto o setor social de produção de alimentos, quanto sua função econômica, que contribui expressivamente para a geração de riqueza. E, com o desafio de reduzir as doenças que prejudicam a produtividade agrícola, faz-se o uso excessivo de defensivos químicos e fertilizantes. Entretanto, estes métodos podem causar danos ao ambiente e à saúde da população, além de reduzir a fertilidade do solo (GULLINO & KUIJPERS, 1994; LORITO *et al.*, 2010).

Há uma diversidade de estudos que objetivam amenizar esses impactos, destacando se o uso de microorganismos como agentes de controle biológico (VERMA *et al.*, 2007, VITERBO *et al.*, 2002). Inclusive, diversos gêneros de bactérias e fungos já são utilizados comercialmente com essa finalidade, especialmente o gênero *Trichoderma*, que possui elevada capacidade antagonista de fitopatógenos (BENÍTEZ *et al.*, 2004; BROTMAN *et al.*, 2012; VINALE *et al.*, 2008).

O gênero *Trichoderma* compreende espécies de fungos filamentosos que vivem no solo e são encontrados em uma grande variedade de ecossistemas, sendo capazes de crescer em inúmeros substratos, tais como: madeira, troncos e, inclusive, sobre outros fungos. Esses fungos podem ser isolados do solo ou das próprias culturas, além de serem facilmente cultivados *in vitro*, o que mostra seu alto potencial de adaptabilidade a diversas condições ecológicas (KUBICEK *et al.*, 2008; MARTINEZ *et al.*, 2008). A colonização dos diferentes habitats deve-se a sua capacidade de secretar antibióticos e enzimas, permitindo eficiente utilização do substrato (SCHUSTER & SCHMOLL, 2010).

Estudos demonstram que o biocontrole de fitopatógenos pelas espécies de *Trichoderma* é feito por diferentes mecanismos, como competição, antibiose e micoparasitismo, sendo que algumas espécies realizam mais de um mecanismo simultaneamente (LORITO *et al.*, 2010). A competição deve-se à capacidade de *Trichoderma* obter nutrientes com maior eficiência que os patógenos, bem como, sua alta taxa de reprodução e crescimento. Já na antibiose, sua produção de metabólitos secundários interfere no crescimento de outros fungos através da acidificação do solo, além desses compostos atuarem como fungistáticos, ou mesmo, degradarem as células dos patógenos. No micoparasitismo, considerado o método mais característico de controle de patógenos realizado por *Trichoderma*, estão envolvidos o crescimento em direção à hifa hospedeira e reconhecimento, secreção de enzimas que degradam a parede celular do fungo alvo e a introdução da hifa do parasita (BENÍTEZ *et al.*, 2004). Além disso, existe um método de controle de fitopatógenos que ocorre de forma indireta, conhecido como indução de resistência em plantas, no qual compostos produzidos por *Trichoderma*, como a proteína sm1, induzem os mecanismos de defesa das plantas (FRISCHMANN *et al.*, 2013; HERMOSA *et al.*,

2012). Sendo assim, este microorganismo é considerado de grande impacto na economia agrícola.

Dentre as espécies de *Trichoderma* que são bons agentes de biocontrole, *Trichoderma harzianum* representa a linhagem de maior distribuição mundial e com elevado potencial de micoparasitismo (ALMEIDA et al., 2007; STEINDORFF et al., 2012). No intuito de controlar doenças causadas por fungos como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium spp.*, dentre outros, estes são os principais componentes em biofungicidas comerciais usados para aplicações em folhas, sementes e solo (GRIGORIEV et al., 2012). Com isso, seus mecanismos moleculares de micoparasitismo e interação com fitopatógenos e/ou com as plantas têm sido intensamente investigados. Recentemente, com o intuito de fornecer uma plataforma de identificação de genes de interesse biotecnológico para o controle de pragas, desenvolvimento de biofungicidas e melhoramento genético de plantas, foi disponibilizado o genoma dessa espécie (GRIGORIEV et al., 2012).

1.2. PREJUÍZOS ECONÔMICOS CAUSADOS POR FUNGOS FITOPATOGÊNICOS NA AGRICULTURA

O Brasil encontra-se entre os maiores produtores e consumidores mundiais de feijão, que está presente na dieta alimentar de significativa parcela da população. Apesar de apresentar destaque, a produtividade média brasileira é baixa devido as doenças fúngicas que acarretam perdas nas plantações. Estas podem resultar em diminuição da qualidade e da oferta do produto no mercado, e conseqüentemente, em prejuízos econômicos (PIMENTEL et al., 2005).

Dentre os principais fungos fitopatogênicos que causam doenças e interferem prejudicialmente na produtividade agrícola de feijão destacam-se: *Sclerotinia sclerotium*, *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*. Na realidade, esses têm expressiva importância em várias culturas de interesse econômico, tais como milho, trigo, tomate e soja, causando danos expressivos à cultura e grandes prejuízos aos produtores (TOURNAS, 2005). O fungo *F.solani*, apesar de disseminado em praticamente todo o território nacional, tem importância nas culturas de feijão do Centro-Oeste, principalmente em áreas onde esta leguminosa é cultivada sob condições de pivô central (SILVA et al., 2008).

Trabalhos visando o controle destes fitopatógenos na agricultura relatam que muitos utilizam o controle químico através de fungicidas. Entretanto, os danos causados por defensivos químicos ao ambiente, a possibilidade de serem selecionados patógenos resistentes aos fungicidas disponíveis no mercado, bem como, a possibilidade da presença de resíduos carcinogênicos nos alimentos (GULLINO & KUIJPERS, 1994; LORITO et al., 2010), despertam a preocupação mundial.

Nesse sentido, o método de controle biológico dessas espécies tem sido intensivamente explorado e desenvolvido por utilizar as interações entre microrganismos já existentes na natureza, e

consequentemente, não causar maiores impactos ambientais (SILVA & MELLO, 2007; VERMA *et al.*, 2007, VITERBO *et al.*, 2002). Dentre os microorganismos utilizados com essa finalidade, os fungos do gênero *Trichoderma* correspondem a 90% das aplicações para biocontrole de fungos fitopatogênicos na agricultura (BROTMAN, KAPUGANTI & VITERBO; 2010; VINALE *et al.*, 2008; MONTE; 2001).

1.3. O ESTUDO DO BIOCONTROLE REALIZADO POR *Trichoderma*

Espécies do gênero *Trichoderma* são capazes de produzir metabolitos economicamente importantes, tais como enzimas industriais (celulases e hemicelulases), antifúngicos e antibióticos. E alguns destes são utilizados no controle biológico de doenças de plantas, tanto como indutores de resistência no vegetal quanto como antagonistas de fungos fitopatogênicos (LORITO *et al.*, 2010). No entanto, um dos requisitos para aprimorar a aplicação prática destes agentes de biocontrole na agricultura é entender os mecanismos envolvidos no processo de antagonismo de fitopatógenos (MASSART & JIJAKLI, 2007). Nesse sentido, diversas técnicas têm sido usadas nos campos da microbiologia, microscopia, bioquímica e, mais recentemente, da biologia molecular.

Estudos moleculares com espécies de *Trichoderma* utilizadas na agricultura demonstram que as enzimas mais frequentemente produzidas durante o micoparasitismo são glucanases, quitinases e proteases, sendo que estas são relacionadas à composição da parede celular do hospedeiro, constituída preferencialmente de um complexo glucana-quitina ligado a outros polissacarídeos, além de proteínas (ALMEIDA *et al.*, 2007, LATGÉ 2010). Sabe-se ainda que sua capacidade antagonista varia com o patógeno a ser combatido, o cultivar a ser protegido e sofre interferência de fatores como: o tipo de solo, temperatura, pH e de outros componentes da microbiota local (HOWELL, 2003; TRUSHINA *et al.*, 2013).

Dessa maneira, os estudos demonstram que diversas moléculas estão envolvidas durante o processo de micoparasitismo, e consequentemente, do biocontrole realizado por *Trichoderma*: enzimas hidrolíticas, antibióticos, metabólitos voláteis, moléculas de resistência ao estresse e de indução de resistência em plantas. Essa variedade de moléculas ilustra a complexidade da base genética do biocontrole (MASSART & JIJAKLI, 2007). Sendo assim, é preciso uma melhor compreensão dos aspectos moleculares do processo de biocontrole realizado por *Trichoderma* para a utilização desse organismo, seus genes ou suas proteínas (KUBICEK *et al.*, 2011, LORITO *et al.*, 2010, VINALE *et al.*, 2008).

1.3.1. Análise de transcriptomas de *Trichoderma*

A análise de ESTs (expressed *sequence tags*-etiquetas de sequências expressas) tem sido utilizada em diversos trabalhos para explorar genes de *Trichoderma* expressos em diferentes condições de cultivo, interação com fitopatógenos e plantas (LIU & YANG, 2005; STEINDORFF *et al.*, 2012). Essa

técnica representa uma ferramenta para a identificação de genes de interesse biotecnológico e estudo da expressão gênica na condição testada (LIU *et al.*, 2010).

O primeiro estudo de ESTs de uma espécie de *Trichoderma harzianum* usada em biocontrole foi feito por LIU e YANG (2005). Foram geradas 3298 ESTs contidas em 1740 transcritos únicos. Os genes mais representados foram uma proteína de parede celular QID3, uma oxidoredutase, uma proteína componente dos corpúsculos de Woronin e uma proteína de resposta aos danos no DNA. Dos demais genes identificados, a maioria já era conhecidamente relacionada ao processo de micoparasitismo.

Um consórcio de genômica funcional internacional, chamado TrichoEST, teve como objetivo identificar genes e seus produtos com valor biotecnológico a partir de diferentes linhagens de *Trichoderma*. Foram sequenciados mais de 25.000 ESTs, com 13.814 transcritos descritos para 8 espécies diferentes de fungos: *T. harzianum*, *T. virens*, *T. atroviride*, *T. viride*, *T. longibrachiatum*, *T. stromaticum*, *T. aggressivum*, e *T. asperellum* (LORITO *et al.*, 2010). Em um dos trabalhos do TrichoEST, foram construídas 8 diferentes bibliotecas de *T. harzianum* crescido em diferentes condições de nutrientes e estresse (VIZCAÍNO *et al.*, 2006). Foram gerados 8.710 ESTs e um total de 3.478 sequências únicas, incluindo 6 quitinases, 30 glucanases e 54 proteases que seriam potencialmente envolvidas no micoparasitismo. Dentre os genes mais representados nas condições de estresse estavam uma hidrofobina, que possivelmente está envolvida com adesão, esporulação e interação com a planta, e uma ciclofilina, que desempenha papel em dobramento e transporte de proteínas, *splicing* de RNA e como determinante de virulência em fungos fitopatogênicos (Lorito *et al.*, 2010). Nesses trabalhos com bibliotecas de cDNA, a validação dos resultados é realizada utilizando northern blot, ou mais recentemente, PCR em tempo real (CARPENTER *et al.*, 2005; SCHERM *et al.*, 2009).

1.3.2. Análise de bibliotecas subtrativas de *Trichoderma*

A hibridização subtrativa é um método usado para isolar e clonar genes diferencialmente expressos entre duas populações de cDNA, sintetizados a partir de mRNAs obtidos de condições distintas. Essa técnica permite o enriquecimento dos transcritos diferencialmente expressos, facilita a clonagem de genes que estão relacionados a um processo específico, e apresenta a vantagem de ser bastante eficiente para a obtenção de transcritos pouco abundantes (HUANG *et al.*, 2007).

A hibridização subtrativa por supressão (*suppression subtractive hybridization* – SSH), utiliza o princípio da hibridização de ácidos nucleicos para eliminar fragmentos que existem em comum nas duas populações de cDNA. Em resumo, os cDNAs da condição na qual se pretende isolar as sequências diferencialmente expressas (condição teste) é misturada a uma grande quantidade (pelo menos 10 vezes mais) de cDNA da condição chamada controle. O cDNA da condição teste é digerido e separado em dois grupos para serem ligados, cada um, a adaptadores distintos, que possuem regiões de anelamento para iniciadores para uma futura reação de PCR. Na primeira etapa de hibridização, os dois conjuntos do cDNA teste são misturados ao cDNA controle separadamente, enquanto na segunda etapa,

as duas hibridizações são misturadas e novamente hibridizadas. Isso permite aos genes diferencialmente expressos formar híbridos contendo, em cada fita, cada um dos dois adaptadores. Em seguida, por PCR, fragmentos de genes diferencialmente expressos são preferencialmente amplificados e podem ser clonados (DIATCHENKO *et al.*, 1996; SAGERSTRÖM *et al.*, 1997).

A técnica foi usada por CARPENTER e colaboradores (2005) para identificar genes envolvidos na interação entre *T. hamatum* e *S. sclerotiorum*. O RNA da condição controle foi extraído em situação de confronto em placa entre os fungos, sendo que o RNA da condição controle foi uma mistura de RNAs dos fungos crescidos em placas separadas. Foram obtidos 25 genes, dentre os quais foram identificados sequências de 3 monooxigenases (envolvidas na síntese de metabólitos secundários), uma metalopeptidase, uma gluconato desidrogenase (envolvido em síntese de toxinas em bactérias) e uma próton ATPase, além do gene *hex1* de *T. reesei*, que codifica para uma proteína relacionada aos septos das hifas. Dos 25 genes obtidos pela técnica, 19 apresentaram maior expressão durante a condição de micoparasitismo, quando comparado com a situação controle, mostrando que a técnica é capaz de detectar genes relacionados ao processo de interesse.

Dois trabalhos fizeram uso da técnica de SSH para identificar genes diferencialmente expressos entre mutantes de *T. virens* e a linhagem selvagem. Em um mutante para o gene *tvk1*, que codifica para uma MAP kinase, quatro genes que codificam para hidrofobinas e um gene de uma proteína envolvida em controle circadiano, foram mais expressos que no mutante na mesma condição de crescimento, enquanto que um gene que codifica para uma proteína de parede celular (*qid74*) e uma outra hidrofobina foram negativamente regulados (MENDOZA-MENDOZA *et al.*, 2007). No mutante para o gene *tac1* (que codifica para uma adenilato ciclase), foram detectados 11 genes que sofreram regulação negativa, sendo que 9 deles foram homólogos a genes relacionados ao metabolismo secundário (MUKHERJEE *et al.*, 2007). Esses trabalhos demonstram que essa técnica pode detectar diferenças entre situações com sutil variação de expressão gênica.

A submissão das sequências de *Trichoderma harzianum* obtidas por subtração em bancos de dados públicos retorna numerosos dados de proteínas de organismos de outros reinos (bactérias, plantas e até mamíferos), indicando que estes podem se tratar de genes ainda não descritos em fungos (SCHERM *et al.*, 2009). O genoma de *T. harzianum* CBS 226,95, que foi recentemente lançado pelo Joint Genome Institute (JGI) (<http://genome.jgi.doe.gov/Triha1/Triha1.home.html>), permitirá novas abordagens, como sequenciamento de RNA (RNA – Seq), contribuindo para a identificação de novos genes relacionados com o biocontrole, bem como, os mecanismos moleculares pelos quais este fungo é capaz de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos.

1.3.3. Transformação genética de *Trichoderma* para o estudo do biocontrole

Ao longo dos últimos anos, a transformação genética têm sido uma ferramenta indispensável para a análise funcional de genes de interesse biotecnológico. Nesse sentido, as propostas úteis são a deleção (*knock out*) ou a superexpressão da transcrição do gene alvo. A deleção de genes específicos é feita utilizando-se um cassete de expressão ou fragmentos de DNA contendo a região promotora e terminadora do gene alvo flanqueando uma marca de seleção, que pode ser auxotrófica ou de resistência a antibióticos (MASSART & JIJAKLI, 2007). Por recombinação homóloga, o cassete/DNA pode interromper ou substituir a sequência do gene alvo e gerar um transformante. Em casos de superexpressão, são construídos vetores nos quais a sequência do gene de interesse é flanqueada por promotor e terminador de um gene expresso constitutivamente ou altamente expresso em uma condição controlada. As técnicas de transformação utilizadas são a biolística, transformação de protoplastos e transformação mediada por *Agrobacterium* (HYNES, 1996; MASSART & JIJAKLI, 2007; ZEILINGER, 2004).

Nesse sentido, a biologia molecular da interação entre os transformantes de *Trichoderma* e patógenos tem sido estudada em detalhe. Para tanto, a crescente disponibilização de genomas de espécies *Trichoderma* tem permitido a análise funcional de genes envolvidos no controle biológico e elicitores de defesa em plantas em maior escala (SCHUSTER & SCHMOLL, 2010b). É possível comparar as propriedades de biocontrole dos mutantes com as do fungo selvagem, observar resultados diretos confrontando o organismo transformado e o patógeno, detectar alterações morfológicas e também medir atividades enzimáticas em caldos de cultura (GRUBER et al., 2012; HYNES, 1996; LORITO et al., 1993).

Diversos genes identificados durante o biocontrole de fitopatógenos foram deletados, silenciados e superexpressos em *Trichoderma*. Dentre estes, genes responsáveis pela sinalização celular (GRUBER et al., 2012; KUMAR et al., 2010; MENDOZA-MENDOZA et al., 2003; ZEILINGER, 2004) e transporte (LIU et al., 2012) durante o micoparasitismo, além de diversas enzimas hidrolíticas (MONTERO-BARRIENTOS et al., 2008; POZO et al., 2004; ROMÃO-DUMARESQ et al., 2012; ROSADO et al., 2007). Em muitos desses estudos, as atividades de biocontrole dos transformantes foram reprimidas quando o gene é deletado e/ou intensificadas em casos de superexpressão desses genes. Em conjunto, estes demonstram que o mecanismo de controle biológico não é controlado por um gene único, mas por uma complexa interação entre vias metabólicas.

A transformação genética também foi utilizada como alternativa para a análise funcional de genes de *Trichoderma* envolvidos em estresses abióticos (HERMOSA et al., 2011a; MONTERO-BARRIENTOS et al., 2008; ROSADO et al., 2007) e elicitores de defesa em plantas. Alguns resultados indicaram que a deleção ou silenciamento desses genes não altera o crescimento, desenvolvimento ou a capacidade de biocontrole deste fungo (FRISCHMANN et al., 2013). Entretanto, a superexpressão de genes

relacionados ao biocontrole aponta *Trichoderma* como uma valiosa fonte de genes de interesse biotecnológico para a transformação de plantas resistentes a estresses abióticos, como temperatura (HERMOSA et al., 2011a; MONTERO-BARRIENTOS et al., 2008).

Apesar da análise funcional de genes envolvidos no biocontrole de *Trichoderma* representar uma excelente alternativa biotecnológica para aprimorar sua utilização na agricultura (SEIDL et al., 2009), ainda são escassos os trabalhos de deleção e superexpressão de genes na espécie *T. harzianum*. As maiores dificuldades em realizar deleção gênica nessa espécie situam-se em romper e substituir o gene alvo, essencial para a análise funcional de genes candidatos (MACH & ZEILINGER, 1998; RUIZ-DÍEZ, 2002). Além disso, apenas recentemente foi disponibilizado o genoma deste fungo, e esta constitui uma informação promissora tanto para identificação de genes de interesse biológico quanto para o avanço nos estudos moleculares do processo de biocontrole.

1.4. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS UTILIZANDO GENES DE *Trichoderma*

Plantas geneticamente modificadas são propostas úteis para reduzir as pragas que interferem na produção agrícola e aumentar a tolerância destas a estresses ambientais (ARAGÃO & FARIA, 2009; CUNHA et al., 2010; MONTERO-BARRIENTOS et al., 2010). A metodologia baseia-se na transferência de material genético (DNA) para uma célula vegetal-alvo, de tal forma que este é incorporado e expresso de forma estável no seu genoma. A posterior regeneração *in vitro* dessa célula inicialmente transformada irá gerar uma planta transgênica, na qual é possível detectar alterações morfológicas e fisiológicas, ou mesmo, observar a resistência ao confrontar a planta com o patógeno (ARAGÃO & BRASILEIRO, 2002; ARAGÃO et al., 2002). Assim, a transformação é uma técnica que pode auxiliar em programas de melhoramento genético pela introdução de uma nova característica ou a alteração de uma preexistente (STUDART-GUIMARÃES et al., 2010). Além disso, plantas transgênicas são importantes ferramentas para estudos moleculares de função e expressão de genes, de processos fisiológicos e de desenvolvimento vegetal (HANSEN & WRIGHT, 1999).

Os desafios para o desenvolvimento da biotecnologia agrícola incluem a identificação de genes relacionados com a resistência a estresses bióticos e abióticos para a introdução no genoma de plantas (SAIPRASAD; MYTHILI; ANAND, 2009). Com o intuito de superá-los, pesquisadores têm direcionado seus esforços no sentido de aumentar o conhecimento sobre fungos de controle biológico para identificar genes com potencial biotecnológico para a transformação genética de plantas (DANA et al., 2006; HERMOSA et al., 2011a; MONTERO-BARRIENTOS et al., 2010). Adotando essa abordagem, estudos com genes relacionados ao controle biológico de *Trichoderma* destacam descobertas intrigantes, bem como aplicações promissoras.

Diversos trabalhos que identificaram transgenes de *Trichoderma* potencialmente úteis para a transformação de plantas incluem enzimas que degradam parede celular, tais como: quitinases, proteases, glucanases e mananase (DANA; PINTOR-TORO; CUBERO, 2006; DIXIT et al., 2011; KUMAR et al., 2009; SAIPRASAD; MYTHILI; ANAND, 2009). Estes genes são altamente expressos em *Trichoderma* durante o confronto com a parede celular de fitopatógenos, substâncias secretadas por estes, bem como, pelo hospedeiro vivo (ALMEIDA et al., 2007; POLTRONIERI; TRINDADE; SILVA, 1994; REITHNER et al., 2011) E, a expressão múltipla desses genes em plantas, confere maior nível de resistência a fungos patogênicos (DANA et al., 2006; LORITO et al., 1998). Em conjunto, os estudos que produzem plantas transgênicas utilizando genes de biocontrole identificados em *Trichoderma* demonstraram que esta representa uma estratégia em potencial para aumentar a defesa de plantas contra diferentes fitopatógenos (BOLAR et al., 2000; DANA et al., 2006; KUMAR et al., 2009).

Apesar da relevância de genes de *Trichoderma* como ferramentas biotecnológicas para a produção de plantas geneticamente modificadas resistentes a doenças fúngicas, há uma carência de estudos sobre sua expressão em plantas. Até recentemente, a inserção de genes que codificam as enzimas de degradação de parede celular foi a principal estratégia empregada por esses estudos. Dentre estes, ensaios com plantas expressando quitinases e glucanases de *Trichoderma* fornecem uma valiosa demonstração do aumento de resistência a agentes patogênicos de folhas e solo (BOLAR et al., 2000; LORITO et al., 1998). Alguns sugerem que a resistência é decorrente da proteção fornecida pelas enzimas expressas, a rápida resposta de defesa e, especialmente, porque as plantas transgênicas desencadeiam elevada atividade de vários genes relacionados à defesa (DANA et al., 2006; EMANI et al., 2003; KUMAR et al., 2009; LORITO et al., 1998; SHIBUYA & MINAMI, 2001).

A indução de resistência a estresses abióticos também foi proposta em trabalhos com plantas geneticamente modificadas utilizando genes de *Trichoderma*. A proteína de choque térmico (HSP70) e o gene *Thkel1* de *T. harzianum* foram superexpressos em *Arabidopsis*. Como resultado, estas linhagens foram mais resistentes ao calor e a stresses osmótico, salino e oxidativo (HERMOSA et al., 2011a; MONTERO-BARRIENTOS et al., 2010). À luz destes resultados, genes de *Trichoderma* que não estão diretamente relacionadas com o biocontrole também indicam novas perspectivas para melhorar a resistência de plantas sem alterar o fenótipo (HERMOSA et al., 2011a).

Desta maneira, a transformação genética de plantas utilizando genes de *Trichoderma* constitui uma ferramenta de grande potencial para a produção de plantas resistentes a estresses bióticos e abióticos. E isto é evidenciado nos trabalhos que exploraram esses genes em diferentes modelos de plantas e bioensaios (HERMOSA et al., 2011a; KUMAR et al., 2009; MONTERO-BARRIENTOS et al., 2010). Além disso, o conhecimento adquirido com a expressão e validação desses genes em plantas modelo surge como excelente alternativa para o estudo de aplicabilidade desses genes em cultivares de interesse econômico, como o feijão.

2. JUSTIFICATIVA

A população humana e sua demanda por alimentos continua a crescer, sendo que o nível de produtividade exigida não parece ser possível sem o uso de agroquímicos. Entretanto, há grande interesse na diminuição do uso de pesticidas na agricultura devido ao impacto causado pelos mesmos ao ambiente e à saúde humana (POLTRONIERI; TRINDADE; SILVA, 1994; SILVA et al., 2008).

As significativas perdas na produção e desvalorização dos produtos agrícolas brasileiros ocorrem devido a patógenos de solo, tais como: *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporium*, *Sclerotinia sclerotium* e *Rhizoctonia solani*. Dentre os microorganismos que representam uma alternativa eficiente no biocontrole destes fitopatógenos, e que sejam menos prejudiciais ao ambiente e à saúde humana, destacam-se os fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* (LORITO et al., 2010). Estes possuem proteínas de reconhecido interesse biotecnológico, com diversas aplicações agrícolas e industriais. Além disso, alguns dos genes relacionados ao micoparasitismo são utilizados em plantas transgênicas para melhorar a resistência a fitopatógenos e estresse salino (BOLAR et al., 2000; HERMOSA et al., 2011b; KUMAR et al., 2009; MONTERO-BARRIENTOS et al., 2008).

Nesse sentido, entender os mecanismos moleculares envolvidos no biocontrole é fundamental para a aplicação efetiva de *Trichoderma*, selecionar de linhagens promissoras, identificar proteínas de interesse biotecnológico, e ainda facilita procedimentos de registro de patentes. Além disso, desenvolver plantas transgênicas resistentes a fungos patogênicos utilizando genes de *Trichoderma* representa uma excelente estratégia a ser utilizada. Em conjunto, essas possibilidades representam aumento da competitividade agrícola, da segurança alimentar e, ainda, o ganho ambiental pela menor aplicação de agroquímicos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais desse trabalho foram a identificação e análise de genes de *Trichoderma harzianum* com potencial biotecnológico para aplicação em agricultura.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter bibliotecas subtrativas de cDNAs de *Trichoderma harzianum* em antagonismo com *Fusarium solani* e em meio contendo glicose;
- Sequenciar as ESTs e identificar os genes com expressão diferencial;
- Avaliar a expressão dos genes identificados nas bibliotecas através da PCR em tempo real;
- Construir vetor de superexpressão de aquaporina para transformação de *T. harzianum*;
- Transformar *T. harzianum* com o vetor de superexpressão e selecionar os transformantes;
- Avaliar se os transformantes de *T. harzianum* aumentaram a eficiência no processo de biocontrole de fitopatógenos, bem como, a tolerância a estresses abióticos;
- Construir vetor de superexpressão de aquaporina para transformação genética de *Nicotiana tabacum*;
- Transformar *N. tabacum* com o vetor de superexpressão e selecionar as plantas transgênicas;
- Avaliar se plantas de tabaco transformadas com aquaporina de fungo representam uma alternativa para produzir cultivares com tolerância a estresses abióticos e fitopatógenos.

CAPÍTULO I: Identificação de genes diferencialmente expressos em *Trichoderma harzianum* durante a interação com parede celular de *Fusarium solani* como estratégia de aplicação biotecnológica

1. Artigo publicado: Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma harzianum* during exposure to *Fusarium solani* cell wall as a tool for biotechnological application

(BMC Genomics 2013, 14:177)

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma harzianum* during growth on cell wall of *Fusarium solani* as a tool for biotechnological application

Pabline Marinho Vieira¹, Alexandre Siqueira Guedes Coelho², Andrei Stecca Steindorff¹, Saulo José Linhares de Siqueira¹, Roberto do Nascimento Silva³ and Cirano José Ulhoa^{1*}

Abstract

Background: The species of *T. harzianum* are well known for their biocontrol activity against many plant pathogens. However, there is a lack of studies concerning its use as a biological control agent against *F. solani*, a pathogen involved in several crop diseases. In this study, we have used subtractive library hybridization (SSH) and quantitative real-time PCR (RT-qPCR) techniques in order to explore changes in *T. harzianum* genes expression during growth on cell wall of *F. solani* (FSCW) or glucose. RT-qPCR was also used to examine the regulation of 18 genes, potentially involved in biocontrol, during confrontation between *T. harzianum* and *F. solani*.

Results: Data obtained from two subtractive libraries were compared after annotation using the Blast2GO suite. A total of 417 and 78 readable EST sequence were annotated in the FSCW and glucose libraries, respectively. Functional annotation of these genes identified diverse biological processes and molecular functions required during *T. harzianum* growth on FSCW or glucose. We identified various genes of biotechnological value encoding to proteins which function such as transporters, hydrolytic activity, adherence, appressorium development and pathogenesis. Fifteen genes were up-regulated and sixteen were down-regulated at least at one-time point during growth of *T. harzianum* in FSCW. During the confrontation assay most of the genes were up-regulated, mainly after contact, when the interaction has been established.

Conclusions: This study demonstrates that *T. harzianum* expressed different genes when grown on FSCW compared to glucose. It provides insights into the mechanisms of gene expression involved in mycoparasitism of *T. harzianum* against *F. solani*. The identification and evaluation of these genes may contribute to the development of an efficient biological control agent.

Keywords: *T. harzianum*, *F. solani*, Subtractive library hybridization, Gene expression, Mycoparasitism

Background

Trichoderma harzianum is a soil-borne filamentous fungus that protects crop plants from attack by a range of pathogenic fungi [1]. Species of the genus *Trichoderma* are widely known for their biotechnological interest, however their use as biocontrol agents requires a comprehensive analysis of the biological principles of their action. Their

antagonistic abilities are described as a combination of several mechanisms, including nutrient competition and direct mycoparasitism, which involves the production of antifungal metabolites and cell wall-degrading enzymes [2-5]. The use of these species as biocontrol agents represents an environmentally friendly alternative to chemical fungicides, and furthermore, some of their genes have been used to improve plant resistance to pathogens and salt stress [6]. Recently, biologically important proteins from *Trichoderma* have been successfully produced for agricultural and industrial applications [1].

* Correspondence: ulhoa@icb.ufg.br

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, P.O. Box 131, Goiânia, GO CEP 74001-970, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

The genus *Fusarium* comprises a wide and heterogeneous group of fungi that causes economically harmful diseases in many crops, such as soybean (*Glycine max*), tobacco (*Nicotiana tabacum*) and common beans (*Phaseolus vulgaris*), reducing both the quality and the quantity of their products [7]. *Fusarium solani* occurs in practically all of the common bean-producing regions in Brazil, and has been controlled through the use of chemical fungicides [8]. Studies on the antagonistic capacity of *T. harzianum* have revealed that it represents an important alternative to the use of chemical fungicides [9]. Comprehensive analysis of the molecular mechanisms used by *T. harzianum* during interaction with *F. solani* is required in order to identify the molecular determinants of its role as a biological control agent [10,11]. The identification of the *Trichoderma* genes involved in these mechanisms and analysis of their expression profiles can provide researchers with biotechnological tools that exhibit anti-fungal activity and that could potentially be used as transgenes capable of inducing resistance to pathogens in economically valuable plants.

The aim of the present study was to provide helpful insights into the mechanism of *T. harzianum* in its action against *F. solani*. We used a suppression subtractive hybridization (SSH) approach to obtain genes that are differentially expressed during *T. harzianum* growth on *F. solani* cell wall or glucose. We analyzed the differentially-expressed genes for homology and classified them into functional categories. Finally, we discuss the possible functional roles of the genes identified in the interaction between *T. harzianum* and *F. solani* by using quantitative real-time RT-PCR.

Results and discussion

Identification of differentially expressed genes during growth of *T. harzianum* in FSCW or glucose

In this study, a suppression subtractive hybridization (SSH) approach, which is an efficient method for the isolation of differentially expressed genes, was used to isolate and identify genes that are differentially expressed during *T. harzianum* growth on FSCW or glucose. Samples of mRNA from four incubation times (24, 36 and 48 h) were used to construct a unique cDNA library. In order to obtain a cDNA library enriched for sequences representative of those genes up-regulated in the presence of FSCW-library, cDNA from *T. harzianum* grown in FSCW was used as the tester and cDNA from *T. harzianum* grown in glucose medium as the driver (Glc-library). The Glc-library was enriched with possible genes down-regulated during *T. harzianum* growth on FSCW, a mycoparasitism-related condition. The approach based on the construction of cDNA libraries from a mixture of conditions was previously used successfully in *T. harzianum* [10,12].

In the FSCW-library, 417 reads were generated, which were grouped into 77 Unigene clusters (representing 39 contigs and 38 singletons), with an overall EST redundancy of 91%. The inspection of these Unigene clusters detected matches for 64% using blastx. Seventy eight reads were generated from the Glc-library, which represented 47 Unigene clusters, including 19 contigs and 28 singletons, with an overall EST redundancy of 64%. Among these clusters, 57% presented sequence similarity with GenBank entries using the blastx algorithm. The comparison between the sequences from both libraries indicated that there was no overlap between them, suggesting that the subtraction approach was successful and that the two libraries were in fact enriched for sequences from genes differentially expressed under each condition. All ESTs were submitted to GenBank (accession numbers from JK840901 to JK841024).

Functional annotation of the differentially expressed genes

ESTs were annotated according to Gene Ontology (GO) guidelines (Ashburner et al. 2000) with Blast2GO, a universal web-based annotation application [13]. Genes from both libraries were allocated to the main GO categories and the distribution of ESTs in these categories was taken as a measure of gene concurrence across the two libraries (Figure 1). For this purpose, the total number of unique sequences from the two libraries that possessed an assigned GO term within each of the three organizing principles of GO (Biological Process, Molecular Function and Cellular Component) was taken as 100%. Functional annotation of the genes from the FSCW-library indicated that the highest percentage of GO terms was seen in the categories from Biological Processes: localization (40%), cellular process (40%), and metabolic process (64%), as well as the categories related to Molecular Functions: binding (51%), transporter activity (26%), catalytic activity (62%), and hydrolase activity (29%). The GO terms related to regulation: biological regulation (4%), enzyme regulator activity (4%), and transcription regulator activity (4%) as well as proliferation: cell proliferation (4%), demonstrated the lowest percentage values. Genes involved in sphingolipid metabolism, N-glycan biosynthesis, glycosaminoglycan degradation, glycosphingolipid biosynthesis, other glycan degradation, oxidative phosphorylation, amino sugar and nucleotide sugar metabolism, amino acid and water transport, hydrolytic activity and energy related processes were identified during *T. harzianum* growth in FSCW. Moreover, proteins found to be associated with the response of *T. harzianum* to the presence of phytopathogens included: MAP kinases (serine-threonine protein kinase and *chk1*), enzymes that are essential for maintenance of the cell wall integrity, hyperosmotic stress tolerance proteins, pathogenicity factors, a serine protease



and a QID 74 protein considered to be involved in the mycoparasitism [14-16]. Annotation and KEGG analysis of the identified sequences demonstrated a clear relationship with the biological processes and molecular functions required during mechanism of biocontrol [1,5].

Functional annotation of the sequences from the Glc-library identified genes belonging to the following categories of Biological Processes: cellular process (94%), cellular metabolic process (63%), metabolic process (69%), catabolic process (31%), biosynthetic process (56%), and also to the following categories from Molecular Functions: catalytic activity (65%) and lyase activity (35%). KEGG analysis showed that the major metabolism pathways corresponded to biosynthetic pathways: glycerophospholipid metabolism, and glycolysis/gluconeogenesis. This fact is consistent with the extensive metabolic activity expected for a filamentous fungus growing on a rich medium with an easily assimilable substrate [17].

Expression analysis of genes from *T. harzianum* during growth in FSCW

Amongst the differentially expressed genes identified in the SSH analysis, twenty-eight genes were selected based on their predicted function or involvement in *Trichoderma* development, metabolism and biocontrol activity (Table 1). All of these genes were further analyzed by quantitative real-time RT-PCR (RT-qPCR) in order either to validate the results obtained by the SSH method or to understand the kinetics of their expression in the evaluated conditions. We then extended the studies on the expression of these genes by evaluating samples obtained at 24, 36 and 48 hours during growth of *T. harzianum* on FSCW (Table 2 and Additional file 1). The RT-qPCR results suggest that the genes identified as altered in the FSCW-library and annotated as hydrolases (acid sphingomyelinase (*asm*), β -1,3-endoglucanase (*bgn*), chitinase 33 (*chit*), endochitinase 42 (*endo*), exo-rhamnogalacturonase (*exo*) and glycosyl hydrolase (*glyc*)) were up-regulated with the highest expression values at 24 hours with a statistically significant decrease on these values at 36 and 48 hours of growth. Two other genes identified in the FSCW-library which were annotated in the catalytic activity category (amine oxidase (*aox*) and phospholipase d (*pld*)), were down-regulated in all times of growth ($p < 0.01$). Genes associated with binding activity such as checkpoint-like protein (*chk1*), serine threonine-protein kinase (*sck1*) and senescence-associated protein (*sag*) presented the highest expression values at 24 hours and a decrease on these values at 36 and 48 hours of growth (Table 2 and Additional file 1). The observed expression of mannose-binding lectin (*mbl2*) increases over time (Table 2 and Additional file 1).

A serine protease (*ser*) transcript was also identified in the FSCW-library and RT-qPCR analysis indicated that,

differently from hydrolases, the highest expression value was detected after 36 hours of growth (Table 2 and Additional file 1). Moreover, similar to serine protease expression, three genes annotated in the transport GO category (peptide transporter (*ptr2*), aquaporin (*aqp*) and a DUF895 domain membrane protein (*duf*)), showed the highest expression values after 36 hours of growth (Table 2 and Additional file 1). Finally, RT-qPCR expression analyses were performed with *qid74* and *cfem* (eight cysteine-containing domain), genes that correspond to receptor activity on GO. Their highest expression values were detected at 36 hours and 24 hours of growth on FSCW, respectively.

RT-qPCR expression analyses with 10 genes identified on the Glc-library were also conducted to observe their expression profile during the growth of *T. harzianum* in FSCW. Our data showed that all genes analyzed were down-regulated ($p < 0.01$) (Table 2 and Additional file 1). Enolase (*eno*), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*gapd*) and pyruvate decarboxylase (*pdx*), enzymes that are involved in glycolysis and/or gluconeogenesis pathways, showed similar expression profiles at 24 and 36 hours of growth (Table 2 and Additional file 1). Also, the genes with binding activity, *hsp98* and a *c2h2* (zinc finger domain protein), showed the lowest expression values after 24 hours of growth in FSCW. Moreover, the results obtained with genes corresponding to transporter activity on GO (hexose transporter-like protein (*ht*) and zinc-regulated transporter (*zt*)) demonstrated the same time-course expression profiles as the genes that present binding activity (Table 2 and Additional file 1). RT-qPCR expression analysis of norsolorinic acid reductase (*norA*), phosphatidylserine decarboxylase (*psd*) and coproporphyrinogen oxidase (*cpox*) demonstrated that these genes are down-regulated during growth of *T. harzianum* in FSCW (Table 2 and Additional file 1). These enzymes are essential in some filamentous fungi in the biosynthetic pathways of aflatoxins, glycerophospholipid metabolism and heme groups [18,19].

Expression analysis of genes from *T. harzianum* during interaction with *F. solani*

In order to identify genes potentially involved in biocontrol, RT-qPCR was performed using total RNA from dual cultures of *T. harzianum* and *F. solani* in three different interaction stages: before contact, during contact and after contact (Table 3 and Additional file 2). Only the genes identified in the FSCW library were analyzed by RT-qPCR. As a control, a confrontation assay was conducted where *T. harzianum* was challenged with itself. RT-qPCR analysis showed that the genes studied were not expressed when *T. harzianum* was challenged with itself. We have previously reported that direct confrontation assays are a powerful tool to study the phenomenon of mycoparasitism by *T. asperellum* and *T. harzianum* [10,20].

Table 1 List of genes selected for differential expression analysis and the oligonucleotides used in this study

Putative function	Accessionnumber	E-Value	Protein ID*	qPCR forward (F) and reverse (R) primers (5' to 3')
acid sphingomyelinase (<i>asm</i>)	JK840922	1.39E-136	548323	Forward: GCGAAGCATCTCGGCTATTGTAGT Reverse: TCAAGTTGTGAACCGCTACTCGTC
β -1,3-endoglucanase (<i>bgn</i>)	JK840920	8.92E-21	241696	Forward: TCAACATCGCCAACGTC AACGAC Reverse: TGCCAATACGGGAACCAAGTATC
chitinase 33 (<i>chit</i>)	JK840912	3e-51	387920	Forward: TGGAGCTCAACAGGCGCTGC Reverse: ACGACGGCACTGCCAAAGGG
endochitinase 42 (<i>endo</i>)	JK840909	3.0E-46	364419	Forward: AAGGGTTACTACAGCTACAACGCC Reverse: ACTTGAGGTAGGCAACCTTGGTGT
exo-rhamnogalacturonase (<i>exo</i>)	JK840947	2.12E-65	463001	Forward: TTACCTGAAGACATGGCGGGGAAT Reverse: GCCTTCCGCCAATCAGCTTAAACAT
glycosyl hydrolase (<i>glyc</i>)	JK840945	1.51E-09	199282	Forward: GAAATGTTGTCGTCACCAGACGGT Reverse: GGCCGCGATTGCTGTTTCATAGT
amine oxidase (<i>aoc</i>)	JK840953	9.50E-15	538657	Forward: ATACACCCGAAGGAACCTTGTGG Reverse: TAGCGTGCCTCAATCTCCTTAGCA
phospholipase d (<i>pld</i>)	JK840907	3.58E-56	537712	Forward: TGGGAAGACGTTGCACACAAAAC Reverse: AAATTGTCGTAGTCGCCAGGTG
checkpoint-like protein (<i>chk1</i>)	JK840936	2.48E-14	NA	Forward: TGCTGCCCTTCCTGGATGTAGTAG Reverse: AAACATGGTGGAACGGGTAACG
serine threonine-protein kinase (<i>sck1</i>)	JK840919	1.15E-80	480202	Forward: ATGCTGAAGAGCTTAAACGCCACC Reverse: ACTTTGGCTTGAAGGGTGGAGAG
senescence-associated protein (<i>sag</i>)	JK840934	5.02E-30	547464	Forward: AGCTCACGTTCCCTATTAGTGGGT Reverse: ATCCTTCGATGTCGGCTCTTCCTA
mb12-like secreted (<i>mb12</i>)	JK840948	2.05E-41	257052	Forward: TTGCTACGAGGAGTTTGTTCCTG Reverse: TGGAGTTGCACTGGTCTGAAGT
serine protease (<i>ser</i>)	JK840930	1.54E-12	366985	Forward: TGGAAAGGAGTGACCAAGCCTG Reverse: GGAAAGGTCAGGAGTGCTATCGGG
aquaporin (<i>aqp</i>)	JK840978	1.47E-60	476226	Forward: GTTGATGGCATAACCAAGTCTCCCA Reverse: CAACAACATTGGAGCCGGAACCT
duf895 domain membrane protein (<i>duf</i>)	JK8409133	1.67E-92	396055	Forward: TCCAATCCTTGCCGACGTAGTTGA Reverse: TGCCAAGATCACATGGGTCGTTCT
peptide transporter (<i>ptr2</i>)	JK840963	8.11e-74	533699	Forward: AGTCATCTGTTGTAGGCCAGGAA Reverse: AAATTGTCGTAGTCTCCAGGTG
QID74 protein (<i>qid</i>)	JK840906	6.31E-113	456637	Forward: CAGAAGAAGTGCCTGTGCAACAAG Reverse: AGCTAGCATCTTGGCCGAGTTTG
eight cysteine-containing domain (<i>cfem</i>)	JK840940	1.09E-17	245062	Forward: GCCTCCGCAAAGAAACACCTTCT Reverse: AGAGAGCGGTGTTGTAGCGATGA
Enolase (<i>eno</i>)	JK841017	3.54E-12	315824	Forward: ACTTTGACCGAGTCTATCCAGGCT Reverse: ATACCGACGGAGATGTCAGCAATG
glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase (<i>gapd</i>)	JK840981	1.32E-32	281265	Forward: CAGGTCGCCAAGAAGGTCAATCATT Reverse: AAGCGTTGGAGATGACATTGGCAC
pyruvate decarboxylase (<i>pdx</i>)	JK840980	2.60E-31	277935	Forward: GCAGGTGTTGGTCAATCTCCTCAG Reverse: AACGCCAGATGGAACTTGGTATC

Table 1 List of genes selected for differential expression analysis and the oligonucleotides used in this study
 (Continued)

heat shock protein (<i>hsp98</i>)	JK841007	9.91E-13	225475	Forward: TTGAGCGTCGTTTCCAACAGGTC Reverse: TGTCGAGAATGCTGACCTTGGGT
zinc finger domain protein (<i>c2h2</i>)	JK841004	1.67E-15	543717	Forward: CAGACCTTGCACTTGCTTCTT Reverse: AATGTTGTCGACCTCACTGCCT
hexose transporter-like protein (<i>ht</i>)	JK840987	1.20E-35	360713	Forward: GGAGTCCCATTGTCGAAGTGAT Reverse: CGTGCTCATCGTCTTCTT CTCGT
zinc-regulated transporter (<i>zt</i>)	JK840990	3.84E-15	295941	Forward: GGCCAAGAAATCCAGCAGGAAGAT Reverse: TTGACTAGTGGCTGGCTGAATAC
norsolorinic acid reductase (<i>norA</i>)	JK841015	6.41E-37	373869	Forward: ACCGTCTCGTCAACATGAGCTACT Reverse: AAGTTCATGGAAACCAAGCACAGC
phosphatidylserine decarboxylase family protein (<i>psd</i>)	JK840982	4.91E-23	363281	Forward: TCTTTGAAGCGTAGGTGATCCGA Reverse: GCAGATCCGTAGAGGCAAGTATGT
coproporphyrinogen oxidase (<i>cpox</i>)	JK841003	4.88E-24	364552	Forward: TGATCCAGCGTGTTCAGTCCAAA Reverse: GCAGATCCGTAGAGGCAAGTATGT
α -tubulin	HS574101			Forward: TATCTGCTACCAAGGCTCCCGAGAA Reverse: TGGTGTGGACAGCATGCAGACAG

* BLASTX at <http://genome.jgi.doe.gov/> using *Trichoderma harzianum* CBS 226.95 as a reference model.

During the confrontation assay most of the genes studied were down-regulated before contact, and the expression of these genes occurs only after contact with the host. However, three genes (*asm*, *mb12* and *aqp*) presented high expression values before contact. Previously works showed that *Trichoderma* species are able to sense the presence of its host and specific genes are expressed already before contact [21]. Interestingly, with the exception of serine protease (*ser*) all genes are up-regulated after-contact, when the interaction has been established (Table 3 and Additional file 2).

We analyzed the expression of three genes encoding cell wall degrading enzymes (CWDE): β -1,3-endoglucanase (*bgn*), chitinase 33 (*chit*) and endochitinase 42 (*endo*). In agreement with previous studies, transcripts encoding these enzymes were highly expressed mainly after contact indicating intense cell wall degradation in this stage [6,10]. The expression of the genes encoding these enzymes was induced by FSCW (Table 2 and Additional file 2). These enzymes could be also induced by metabolites secreted by the host, and is strongly repressed by glucose [22,23]. These genes play a major role in the mycoparasitic activity against the pathogens especially *R. solani*, *F. oxysporum* and *S. sclerotiorum* [5].

Exo-rhamnogalacturonase (*exo*) and glycosyl hydrolase (*glyc*) annotated as hydrolases were also up-regulated after contact (Table 3 and Additional file 2). Exo-rhamnogalacturonases belong to the group of pectin-degrading enzymes (PDE) and could be involved in cell degradation of *F. solani*. For instance, an endopolygalacturonase (PDE) produced by *T. harzianum* are known to be involved in the

cell wall degradation of *Rhizoctonia solani* and *Pythium* [24]. Glycosyl hydrolases are a widespread group of enzymes that hydrolyse the glycosidic bond between two or more carbohydrates, or between a carbohydrate and a non-carbohydrate moiety. A classification system for glycosyl hydrolases has led to the definition of 85 different families, including amylases, cellulases, β -glucanases and chitinases [25]. Thus, the characterization of the glycosyl hydrolase identified in this work needs to be made to show its role in mycoparasitism.

The expression of genes related with amino acids metabolism (*ser*, *aoc* and *ptr2*) was also analyzed. Serine protease (*ser*) was up-regulated before and during contact, but down-regulated after contact (Table 3 and Additional file 2). These data show that these enzymes play an important role in the early stages of the interaction between *T. harzianum* and *F. solani*. On the other hand, the expression of amino oxidases (*aoc*) and a peptide transporter (*ptr2*) are up-regulated after-contact when the expression of serine protease decreased. Some proteases from *Trichoderma* species have been identified as having biocontrol functions, including aspartyl protease, serine protease and subtilisin-like protease [5,26]. These proteases can take part in the host cell wall breakdown process or act as proteolytic inactivators of pathogen enzymes. Amine oxidases (AO) are a large group of enzymes catalyzing oxidative deamination of amines to form the corresponding aldehydes, hydrogen peroxide and ammonia. AO in filamentous fungi are involved in amino acid metabolism and are described in many fungi such as *Aspergillus oryzae*, *Penicillium chrysogenum* and *Fusarium oxysporum* [27].

Table 2 Expression values of genes identified in *Trichoderma harzianum* (FSCW and Glc libraries) during growth on cell wall of *Fusarium solani*

Putative function	Times of induction (Mean ± SE)		
	24 hours	36 hours	48 hours
Genes identified in the FSCW library			
<i>acid sphingomyelinase (asm)</i>	129 ± 24	12.52 ± 4.67	0.67 ± 0.46
<i>β-1,3-endoglucanase (bgn)</i>	1578 ± 201	958 ± 15.2	140 ± 65
<i>chitinase 33 (chit)</i>	1039 ± 152	567 ± 414	258 ± 212
<i>endochitinase 42 (endo)</i>	1134 ± 903	222 ± 173	259 ± 210
<i>exo-rhamnogalacturonase (exo)</i>	20 ± 8.07	1.06 ± 0.17	0.66 ± 0.57
<i>glycosyl hydrolase (glyc)</i>	273 ± 38.8	3.64 ± 0.40	2.30 ± 1.75
<i>amine oxidase (aoc)</i>	0.31 ± 0.077	0.58 ± 0.33	0.13 ± 0.12
<i>phospholipase d (pld)</i>	0.23 ± 0.15	0.29 ± 0.17	0.28 ± 0.18
<i>checkpoint-like protein (chk1)</i>	7.9 ± 2.49	0.73 ± 0.61	1.73 ± 0.06
<i>serine threonine-protein kinase (sck1)</i>	1.47 ± 0.39	0.59 ± 0.13	0.36 ± 0.35
<i>senescence-associated protein (sag)</i>	44 ± 13.1	6.13 ± 2.95	1.93 ± 1.23
<i>mb12-like secreted (mb12)</i>	15.78 ± 7.08	59 ± 49	81 ± 72
<i>serine protease (ser)</i>	180 ± 116	269 ± 247	117 ± 76
<i>peptide transporter (ptr2)</i>	140 ± 111	229 ± 195	57 ± 37
<i>aquaporin (aqp)</i>	102 ± 37	185 ± 27	58 ± 16
<i>duf895 domain membrane protein (duf)</i>	7.86 ± 1.5	80 ± 40	55 ± 28
<i>QID74 protein (qid)</i>	8.36 ± 2.31	76 ± 48	12 ± 5.2
eight cysteine-containing domain (<i>cfem</i>)	182 ± 13.4	118 ± 10	11 ± 0.9
Genes identified in Glc library			
<i>Enolase (eno)</i>	0.01 ± 0.001	0.06 ± 0.02	0.065 ± 0.0008
<i>glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase (gapd)</i>	0.0009 ± 0.0008	0.005 ± 0.003	0.001 ± 0.0005
<i>pyruvate decarboxylase (pdc)</i>	0.01 ± 0.008	0.047 ± 0.004	0.007 ± 0.007
<i>heat shock protein (hsp98)</i>	0.05 ± 0.022	0.83 ± 0.44	0.13 ± 0.03
<i>zinc finger domain protein (czh2)</i>	0.17 ± 0.0001	0.42 ± 0.05	0.52 ± 0.26
<i>hexose transporter-like protein (ht)</i>	0.002 ± 0.001	0.005 ± 0.0006	0.0009 ± 0.0001
<i>zinc-regulated transporter (zt)</i>	0.0002 ± 0.0002	0.01 ± 0.01	0.008 ± 0.007
<i>norsolorinic acid reductase (norA)</i>	0.07 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.02
<i>phosphatidylserine decarboxylase family protein (psd)</i>	0.04 ± 0.01	0.15 ± 0.05	0.21 ± 0.2
<i>coproporphyrinogen oxidase (cpor)</i>	0.12 ± 0.10	0.12 ± 0.11	0.01 ± 0.002

All results were compared to the respective control group (*T. harzianum* grown in glucose media) at the respective time. (±) Represent standard deviation. The data were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Peptide transport is a universally observed physiological phenomenon in both prokaryotes and eukaryotes cells [28]. This process is characterized by the ability of cells to transport peptides across membranes in an energy-dependent manner. Internalized peptides are rapidly hydrolyzed by peptidases and the resulting amino acids are used for protein synthesis or as alternative sources of nitrogen and carbon. Vizcaino et al., reported the cloning and characterization of *ThPTR2*, di/tri-peptide transporter gene from *T. harzianum* related to the mycoparasitic process. This hypothesis was supported by the fact that

expression of *ThPTR2* was triggered when *Trichoderma* directly interacted with *B. cinerea* [12].

The transcript *asm*, encoding an acid sphingomyelinase (ASM), showed the lowest expression value after contact to the phytopathogen (Table 3 and Additional file 2). ASM are a group of hydrolases that cleave sphingolipids, a common component of plasma membranes, and their products can regulate a variety of cellular functions such as proliferation and differentiation [29]. This enzyme could be involved in providing nutrition for *T. harzianum* from *F. solani* cell components.

Table 3 Expression values of genes identified in *Trichoderma harzianum* at different stages of confrontation to *Fusarium solani*

Putative function	Interaction stages (Mean ± SE)		
	Before contact	Contact	After contact
<i>acid sphingomyelinase (asm)</i>	3.22 ± 0.13	2.36 ± 0.14	1.02 ± 0.04
<i>β-1,3-endoglucanase (bgn)</i>	0.18 ± 0.01	0.60 ± 0.03	163 ± 11
<i>chitinase 33 (chit)</i>	0.28 ± 0.01	0.97 ± 0.03	1105 ± 101
<i>endochitinase 42 (endo)</i>	4.01 ± 0.12	1.78 ± 0.10	226 ± 26
<i>exo-rhamnogalacturonase (exo)</i>	0.60 ± 0.06	1.14 ± 0.12	7.39 ± 1.19
<i>glycosyl hydrolase (glyc)</i>	0.88 ± 0.09	0.95 ± 0.00	3.18 ± 0.30
<i>amine oxidase (aoc)</i>	0.87 ± 0.09	0.88 ± 0.05	1.46 ± 0.13
<i>phospholipase d (pld)</i>	0.99 ± 0.16	0.95 ± 0.07	1.53 ± 0.14
<i>checkpoint-like protein (chk1)</i>	1.01 ± 0.03	1.75 ± 0.13	6.01 ± 0.70
<i>serine threonine-protein kinase (sck1)</i>	0.70 ± 0.10	1.01 ± 0.09	3.17 ± 0.26
<i>senescence-associated protein (sag)</i>	0.88 ± 0.08	1.49 ± 0.08	6.89 ± 0.71
<i>mb12-like secreted (mb12)</i>	7.88 ± 0.24	2.52 ± 0.19	5.25 ± 0.49
<i>serine protease (ser)</i>	1.41 ± 0.06	2.64 ± 0.09	0.20 ± 0.03
<i>aquaporin (aqp)</i>	0.33 ± 0.04	0.64 ± 0.14	1.90 ± 0.19
<i>duf895 domain membrane protein (duf)</i>	2.97 ± 0.38	3.17 ± 0.18	3.19 ± 0.29
<i>peptide transporter (ptr2)</i>	0.44 ± 0.07	0.89 ± 0.14	11.57 ± 1.17
<i>QID74 protein (qid)</i>	5.97 ± 0.28	0.85 ± 0.03	1567 ± 157
eight cysteine-containing domain (<i>cfem</i>)	0.86 ± 0.04	0.74 ± 0.05	12.22 ± 1.68

All results were compared to the respective control group (*T. harzianum* challenged with itself) at the respective stage. (±) Represent standard deviation. The data were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

The transcripts *duf* (DUF895 domain membrane protein), *mb12* (mb12-like protein) and *cfem* (eight cysteine-containing domain) identified in the cDNA library were used in order to learn whether proteins located in membrane or outer surfaces of the cell walls are expressed during the interaction between *T. harzianum* and *F. solani*. These proteins are described as involved in recognition, attachment, adhesion and appressorium development key events mycoparasitism [30]. The transcript *duf* and *cfem* are down-regulated before contact and increased their expression values after-contact (Table 3 and Additional file 2). However, the transcript *mb12*, encoding for a mannose binding lectin, is expressed in the three stages of interaction. This may be due the fact that these proteins are important in coiling and appressorium formation a key step in the mechanism of mycoparasitism.

The transcript *qid74*, encoding the QID74 cell wall protein, is also up-regulated and was strongly expressed after contact. Studies of QID74 in *T. harzianum* CETC 2413 showed that this protein is involved in resistance of hyphae to lytic enzymes and the ability to adhere to hydrophobic surfaces [31]. High expression values of genes of CWDE (*bgn*, *chit* and *endo*) were seen after contact, suggesting that QID74 was produced with the purpose of protecting the cell wall of *T. harzianum*. These proteins could be also

be involved in recognition, attachment and formation of specialized structures such as appressoria.

Among all studied genes only one encoding for aquaporin (*aqp*) was highly expressed in the three stages of interaction to *F. solani* (Table 3 and Additional file 2). These proteins mediate rapid and selective flux of water across biological membranes and hence play important roles in the osmoregulation of cells and organisms. These proteins also facilitate transmembrane transport of small uncharged molecules like polyols, urea, arsenite and many more, thereby playing roles in nutrient uptake [32].

Interestingly, we found a significant expression of the gene *sag* encoding for senescence-associated protein after contact between *T. harzianum* and *F. solani* (Table 3 and Additional file 2). Senescence is the progressive loss of growth potential of mycelium culminating in total cessation of growth when the culture is considered as dead [33]. Some naturally occurring strains of fungi cease growing through successive subculturing [33]. However, this biological mechanism has to be studied in detail to offer an interpretation about the senescence in *Trichoderma* species and its role in mycoparasitism.

Finally, three genes encoding for phospholipase d (*pld*), serine threonine-protein kinase (*sck1*) and checkpoint-like protein (*chk1*) involved in transduction cascades, protein modification and fungal morphogenesis were studied [34].

The transcript *chk1* showed the greatest level of expression followed by *sck1* and *pld*, mainly after contact (Table 3 and Additional file 2). The role of these proteins in mycoparasitism must be studied in more detail, because it involves the participation of a wide range of other genes not described in this work.

Conclusion

Our results provided a step toward the understanding of the mycoparasitic process of *T. harzianum* during its interaction with *F. solani*. However, future studies, aimed at the functional characterization of genes reported here, will help to better define pathways involved in *T. harzianum* interaction with *F. solani*. A better understanding of the expression profiles of these genes could improve *T. harzianum* performance, either by predicting the regulation of the genes involved in the mycoparasitism or by improving their use in biotechnology processes such as transgenic expression in plants.

Methods

Fungal strains and culture conditions

T. harzianum ALL42 (Enzymology group collection, UFG-ICB) and *F. solani* (EMBRAPA-CNPAF collection) were used in this study. Both fungi were grown on MYG medium containing 0.5% malt extract, 0.25% yeast extract, 1% glucose and 2% agar. Spores from *T. harzianum* were collected in sterile water, centrifuged at 2,000 g, washed twice and used as inoculum (10^7 spores mL⁻¹) in minimal medium, containing KH₂PO₄ (2 gL⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (1.4 gL⁻¹), MgSO₄·7 H₂O (0.3 gL⁻¹), CaCl₂·2H₂O (0.3 gL⁻¹), supplemented with 0.5% *F. solani* inactivated cell wall (*F. solani* autoclaved at 120°C for 20 min, washed with distilled water and lyophilized) or glucose. The cultures were grown in conical flasks with constant shaking (180 rpm) at 28°C for 12, 24 and 48 h. Mycelia were harvested, washed twice with sterile water, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA isolation.

Isolation of RNA, cDNA synthesis and construction of the suppression subtractive hybridization (SSH) libraries

Total RNA from *T. harzianum* mycelia was extracted using the TRIZOL reagent (Invitrogen), and the resulting quality and concentration were checked by formaldehyde/agarose gel electrophoresis and a spectrophotometer. To obtain the “driver” and “tester” cDNA populations, 0.6 µg of mRNA purified at 24 h, 36 h and 48 h periods were pooled for each set of conditions (FSCW and glucose). The PCR-Select cDNA Subtraction Kit (BD Biosciences Clontech, Mountain View, CA) was used to generate two subtracted cDNA libraries enriched for genes up- and down-regulated in *T. harzianum* grown in FSCW, referred to hereafter as the forward and reverse subtracted libraries. The first subtracted library (forward) was

produced by the subtraction of the cDNA population from *T. harzianum* grown in FSCW, used as “tester”, from the cDNA population from *T. harzianum* grown in glucose, used as “driver”. The second library (reverse) was obtained by the subtraction of the cDNA population from *T. harzianum* grown in glucose, used as “tester”, from cDNAs obtained from *T. harzianum* grown in FSCW, used as “driver”. The final PCR products obtained corresponded to genes differently expressed during *T. harzianum* grown in FSCW. PCR products were cloned using the pGEM-T Easy vector system (Promega). Positive colonies were picked out and grown in microtiter plates. Plasmids DNAs were prepared from clones using standard protocols.

DNA sequencing, processing and EST database construction

T. harzianum expressed sequence tags (ESTs) were obtained by single-pass 5'-end sequencing of the cDNA inserts using cycle-sequencing and dye-terminator standard protocols. The automated capillary electrophoresis sequencing runs were performed on an ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). EST sequences were pre-processed using Phred [35]. Only sequences with at least 100 nucleotides and with a Phred quality value greater than or equal to 20 were kept for further analysis. ESTs were screened for vector sequences using the CrossMatch program (www.phrap.org). The resulting sequences were assembled into contigs using the CAP3 assembly program [36]. The filtered sequences were compared against the GenBank non-redundant (nr) database using the BLASTX algorithm from the National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Database sequence matches were considered significant at E values $\leq 10^{-14}$. Transcripts were annotated using Gene Ontology (GO) terms and hierarchical structure (http://www.geneontology.org). Redundancy of the collections of ESTs was calculated as $[1 - (\text{number of singletons} / \text{total number of ESTs})] \times 100$ [20].

Quantitative real-time RT-PCR analysis (RT-qPCR)

In this study, RT-qPCR experiments were carried out to check the SSH results and the reliability of our approaches. New independent RNA samples were obtained from the same two conditions: *T. harzianum* grown in FSCW, and *T. harzianum* grown in glucose medium. Both conditions were sampled at three different time points (24, 36 and 48 hours). Statistical tests (Student-*t* test, ANOVA and linear regression analysis) were performed when appropriate. Eighteen genes potentially involved in biocontrol were selected from the FSCW-library and 10 genes from Glc-library (Table 1).

Additional expression analyses were performed by using the dual confrontation plate assay [10]. Circular plaques of 5 mm diameter were cut from mycelium of 7-day-old cultures of *T. harzianum* and of *F. solani* grown on MYG

plates. *T. harzianum* was inoculated in a distance of 7 cm against *F. solani* mycelium in fresh minimal medium supplemented with 0.2% of glucose plates and overlaid with cellophane. As a control, confrontation assays were conducted following the same procedure, except that *T. harzianum* was challenged against itself. The confrontation plates were incubated in the dark at 28°C and the mycelia were harvested before contact, in the contact, and after contact of the two fungi.

Primers used in RT-qPCR (Table 1) were designed using the PerlPrimer v1.1.20 software. Total RNA was isolated from the mycelia and treated with DNase I (Invitrogen). Total RNA (5 µg) from each sample was reverse transcribed into cDNA in the presence of oligo(dT) primer in a volume of 20 µL using the Revertaid™ First Strand cDNA synthesis kit (Fermentas). The synthesized cDNA was diluted with 80 µL of water and used as a template for RT-qPCR. Reactions were performed in the iQ5 real-time PCR system (Bio-Rad). Each reaction (20 µL) contained 10 µL of MAXIMA® SYBR-green PCR Master mix (Fermentas), forward and reverse primers (500 nM each), cDNA template (5 µg), and nuclease free water. PCR cycling conditions were 10 min at 95°C (1 cycle), 15 s at 95°C followed by 1 min at 60°C (40 cycles), and a melting curve of 1 min at 95°C followed by 30 s at 55°C and a final ramp to 95°C with continuous data collection (1 cycle) to test for primer dimers and nonspecific amplification. The α-tubulin transcripts were used as internal references to normalize gene expression [37].

The expression levels of 28 genes were estimated from the threshold cycle using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [38]. In order to evaluate the kinetics of the genes at 24, 36 and 48 hours, the samples were analyzed in three independent experiments with three replicates in each run. Determination of the PCR efficiency was performed using triplicate reactions from a dilution series of cDNA (1, 0.1, 10^{-2} and 10^{-3}). Amplification efficiency was then calculated from the given slopes in the IQ5 Optical system Software v2.0 [39]. All calculated efficiencies showed values between 98% and 117%.

Additional files

Additional file 1: Relative expression profiles of genes identified in *Trichoderma harzianum* (FSCW and Glc libraries) at different times of exposure to *Fusarium solani* cell wall. The data is presented with log scale for better visualization.

Additional file 2: Relative expression profiles of genes identified *T. harzianum* during interaction with *F. solani*. The data is presented with log scale for better visualization.

Abbreviations

asm: acid sphingomyelinase; aoc: amine oxidase; aqp: aquaporin; cfem: eight cysteine-containing domain; chk1: checkpoint-like protein; chit: chitinase 33; cpox: coproporphyrinogen oxidase; CWDE: Cell Wall Degrading Enzymes; Duf: duf895 domain membrane protein; Endo: Endochitinase 42;

Eno: Enolase; Exo: Exo-rhamnogalacturonase; Gapd: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; Glyc: Glycosyl hydrolase; hsp98: heat shock protein; ht: hexose transporter-like protein; mbl2: mbl2-like secreted; norA: norsolorinic acid reductase; ptr2: peptide transporter; psd: phosphatidylserine decarboxylase family protein; pld: phospholipase d; pdc: pyruvate decarboxylase; qid: QID74 protein; sag: senescence-associated protein; ser: serine protease; sck1: serine threonine-protein kinase; c2h2: zinc finger domain protein; zt: zinc-regulated transporter; bgn: β-1,3-endoglucanase; FSCW-library: *F. solani* cell wall library; Glc-library: Glucose library.

Competing interests

No competing financial interests exist.

Authors' contributions

PMV, ASS and SJS performed the construction of the cDNA gene libraries and sequenced the ESTs. PMV and ASGC designed the bioinformatics analysis. PMV and RNS performed the RT-PCR analyses and evaluation of the data. PMV drafted the manuscript. ASGC and CJU were responsible for the experimental design and revised the manuscript. All authors approved the final version of the paper.

Acknowledgements

This work was funded by Research and Projects Financing (FINEP) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG). CJU is supported by a biotechnology research grant (FAPEGO and CNPq). PMV has benefited awarded with a scholarship from Capes.

Author details

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, P.O. Box 131, Goiânia, GO CEP 74001-970, Brazil. ²Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, P.O. Box 131, Goiânia, GO CEP 74001-970, Brazil. ³Departamento de Bioquímica e Imunologia, Escola de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil.

Received: 26 May 2012 Accepted: 6 March 2013

Published: 15 March 2013

References

- Lorito M, Woo SL, Harman GE, Monte E: **Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field.** *Annu Rev Phytopathol* 2010, **48**:395–417.
- Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC: **Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains.** *Int Microbiol* 2004, **7**(4):249–260.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL, Lorito M: ***Trichoderma*–plant–pathogen interactions.** *Soil Biol Biochem* 2008, **40**:1–10.
- Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E: **Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes.** *Microbiology* 2012, **158**:17–25.
- Sharma P, Vignesh KP, Ramesh R, Saravanan K, Deep S, Sharma M, Mahesh S, Dinesh S: **Biocontrol genes from *Trichoderma* species: a review.** *African J Biotech* 2011, **10**(86):19898–19907.
- Lorito M, Woo SL, Fernandes IG, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toro JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, Tuzun A, Scala F: **Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens.** *Proc Natl Acad Sci* 1998, **95**(21):12734–12734.
- Matarese F, Sarrocco S, Gruber S, Seidl-Seiboth V, Vannacci G: **Biocontrol of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*.** *Microbiology* 2012, **158**:98–106.
- Tolêdo-Souza ED, Lobo-Júnior M, Silveira PM, Café-Filho AC: **Interações entre *F. solani* f. sp. Phaseoli e *Rhizoctonia solani* na severidade da podridão radicular do feijoeiro.** *Pesq Agropec Bras* 2009, **39**(1):13–17.
- Páez ME, Albarracín NS: **Evaluation of the antagonistic capacity of *Trichoderma koningii* above *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*.** *Rev Fac Agron* 2007, **24**(1):27–31.
- Steindorff AS, Silva RN, Coelho ASG, Noronha EF, Ulhoa CJ: ***Trichoderma harzianum* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in mycoparasitism against *F. solani*.** *Biol Control* 2012, **61**(2):134–140.

11. Seidl V, Song L, Lindquist E, Gruber S, Koptchinskiy A, Zeillinger S, Schmol M, Martínez M, Sun J, Grigoriev I, Herrera-Estrella A, Baker SE, Kubicek CP: **Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey.** *BMC Genomics* 2009, **10**:567. doi:10.1186/1471-2164-10-567.
12. Vizcaino JA, Cardoza RE, Hauser M, Hermosa R, Rey M, Llobell A, Becker JM, Gutiérrez S, Monte E: **ThPTR2, A di/tri-peptide transporter gene from *Trichoderma harzianum*.** *Fungal Gen Biol* 2006, **43**:234–246.
13. Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nueda MJ, Robles M, Talón M, Dopazo M, Conesa A: **High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**(10):3420–3435.
14. Delgado-Jarana J, Sousa S, Gonzalez F, Rey M, Llobell A: **ThHog1 Controls the hyperosmotic stress response in *Trichoderma harzianum*.** *Microbiology-SGM* 2006, **152**:1687–1700.
15. Kumar A, Scher K, Mukherjee M, Pardovitz-Kedmi E, Sible GV, Singh US, Kale SP, Mukherjee PK, Horwitz BA: **Overlapping and distinct functions of two *Trichoderma virescens*.**
16. Pozo MJ, Baek JM, García JM, Kenerley CM: **Functional analysis of *tvsp1*, a serine protease encoding gene in the biocontrol agent *Trichoderma virescens*.** *Fungal Genet Biol* 2004, **41**(3):336–348.
17. Samolski I, de Luis A, Vizcaino JA, Monte E, Suárez MB: **Gene expression analysis of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in the presence of tomato plants, chitin, or glucose using a high-density oligonucleotide microarray.** *BMC Microbiol* 2009, **9**:217. doi:10.1186/1471-2180-9-217.
18. Anderson JA: **Enzymes in aflatoxin biosynthesis.** *World J Microb Biotech* 1992, **8**(1):96–98.
19. Record E, Moukha S, Asther M: **Characterization and expression of the cDNA encoding a new kind of phospholipid transfer protein, the phosphatidylglycerol/phosphatidylinositol transfer protein from *Aspergillus oryzae*: evidence of a putative membrane targeted phospholipid transfer protein in fungi.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1444**(2):276–282.
20. Suárez MB, Walsh K, Boonham N, O'Neill T, Pearson S, Barker I: **Development of real-time PCR (TaqMan) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in plant.** *Plant Physiol Biochem* 2005, **43**(9):890–899.
21. Lorito M, Woo SL, D'ambrosio M, Harman GE, Hayes CK, Kubicek CP, Scala F: **Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds.** *Mol Plant Microbe Interact* 1996, **9**(3):206–213.
22. De la Cruz J, Pintor-Toro JA, Benítez T, Llobell A, Romero LC: **A novel endo-beta-1,3-glucanase, BGN13.1, Involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*.** *J Bacteriol* 1995, **177**(23):6937–6945.
23. Harman GE: **Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22.** *Plant Dis* 2000, **84**:377–393.
24. Suykerbuyk MEG, Schaap PJ, Stam H, Musters W, Visser J: **Cloning, sequence and expression of the gene coding for rhamnogalacturonase of *Aspergillus aculeatus*: a novel pectinolytic enzyme.** *Appl Microbiol Biotechnol* 1995, **43**:861–870.
25. Henrissat B, Bairoch A: **Updating the sequence based classification of glycosyl hydrolases.** *Biochem J* 1996, **316**:695–696. 12.
26. Liu Y, Yang Q, Song J: **A new serine protease gene from *Trichoderma harzianum* is expressed in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Appl Biochem Microbiol* 2009, **45**(1):22–26.
27. Yagodina OV, Nikol'skaya EB, Khovanskikh AE, Kormilitsyn BN: **Amine oxidases of microorganisms.** *J Evol Biochem Physiol* 2002, **38**(3):251–258.
28. Stacey G, Koh S, Granger C, Becker JM: **Peptide transport in plants.** *Trends Plant Sci* 2002, **7**:257–263.
29. Dickson RC: **Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison to mammals.** *Annu Rev Biochem* 1998, **67**:27–4830.
30. Kulkarni RD, Kelkar HS, Dean RA: **3 An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins.** *Trends Biochem Sci* 2003, **28**(3):118–121.
31. Rosado IV, Rey M, Codón AC, Govantes J, Moreno-Mateos MA, Benítez T: **QID74 cell wall protein of *Trichoderma harzianum* is involved in cell protection and adherence to hydrophobic surfaces.** *Fungal Genet Biol* 2007, **44**(10):950–964.
32. Pettersson N, Filipsson C, Becit E, Brive L, Hohmann S: **Aquaporins in yeasts and filamentous fungi.** *Biol Cell* 2005, **97**:487–500.
33. Maheshwari R, Navaraj A: **Senescence in fungi: the view from neurospora.** *FEMS Microbiol Lett* 2008, **280**(2):135–143.
34. Dickman MB, Yarden O: **Serine/threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi.** *Fungal Gen Biol* 1999, **26**:99–117. 1999.
35. Ewing B, Green P: **Base-calling of automated sequencer traces using phred II. Error probabilities.** *Genome Res* 1998, **8**:186–194.
36. Huang X, Madan A: **CAP3: A DNA sequence assembly program.** *Genome Res* 1999, **9**:868–877.
37. Liu Z, Yang X, Sun D, Song J, Chen G, Juba Q, Yang Q: **Expressed sequence tags-based identification of genes in a biocontrol strain *Trichoderma asperellum*.** *Mol Biol Rep* 2010, **37**(8):3673–3681.
38. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method.** *Methods* 2001, **25**(4):402–408.
39. Rutledge R, Stewart D: **Critical evaluation of methods used to determine amplification efficiency refutes the exponential character of real-time PCR.** *BMC Mol Biol* 2008, **9**:96. doi:10.1186/1471-2199-9-96.

doi:10.1186/1471-2164-14-177

Cite this article as: Vieira et al.: Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma harzianum* during growth on cell wall of *Fusarium solani* as a tool for biotechnological application. *BMC Genomics* 2013 **14**:177.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



CAPÍTULO II. Validação *in vivo* de uma aquaporina identificada no agente de biocontrole *Trichoderma harzianum*

1. INTRODUÇÃO

Os desafios para o desenvolvimento da biotecnologia agrícola incluem a identificação de genes relacionados com a resistência a estresses ambientais e a sua subsequente introdução no genoma de plantas (LIU *et al.*, 2013). Com o intuito de superá-los, pesquisadores têm direcionado seus esforços no sentido de aumentar o conhecimento sobre fungos utilizados na agricultura para o controle biológico de pragas (DANA *et al.*, 2006; LORITO *et al.*, 1998). Adotando essa abordagem, estudos moleculares com o agentes de biocontrole do gênero *Trichoderma* destacam descobertas intrigantes, bem como, aplicações promissoras.

Apesar de estudos apontarem a relevância dos genes de *Trichoderma* como ferramentas biotecnológicas para a produção de plantas geneticamente modificadas resistentes a doenças fúngicas, há uma carência de trabalhos com a expressão destes genes em plantas. Dentre os existentes , a inserção de genes que codificam as enzimas de degradação de parede celular, tais como quitinases e glucanases, foi a principal estratégia empregada (DANA *et al.*, 2006; LORITO *et al.*, 1998; MORÁN-DIEZ *et al.*, 2009; SAIPRASAD *et al.*, 2009; SELA-BUURLAGE *et al.*, 1993). Mais recentemente, a indução de resistência a estresses abióticos também foi proposta em trabalhos com plantas expressando genes de *Trichoderma* (HERMOSA *et al.*, 2011a; MONTERO-BARRIENTOS *et al.*, 2010). Em conjunto, estes trabalhos indicam que genes identificados em *Trichoderma* representam potencial biotecnológico para aumentar a resistência de plantas contra fitopatógenos, calor, bem como, a stresses osmótico, salino e oxidativo (HERMOSA *et al.*, 2011a; KUMAR *et al.*, 2009; MONTERO-BARRIENTOS *et al.*, 2010). Adotando essa abordagem, estudo recente identificou genes de *T. harzianum* potencialmente úteis para o biocontrole de *Fusarium solani*, fitopatógeno associado com elevadas perdas em culturas de interesse econômico (VIEIRA *et al.*, 2013) E, dentre os genes identificados, aquaporina destaca-se pela elevada expressão em *Trichoderma* durante o antagonismo com este fitopatógeno.

Aquaporinas (AQP) são uma família de proteínas integrais de membrana responsáveis pelo transporte de água (aquaporinas) e de outras pequenas moléculas, tais como o glicerol e a ureia (aquagliceroporinas) (TÖRNROTH-HORSEFIELD *et al.*, 2010). As vantagens evolutivas das aquaporinas fizeram seus genes presentes em inúmeros organismos (TANGHE *et al.*, 2006), e sua relevância é demonstrada nos diversos estudos que realizaram deleção e/ou superexpressão destes genes em *E. coli* (CALAMITA *et al.*, 1998; SOUPENE *et al.*, 2002), *S. cerevisiae* (CARBREY *et al.* 2001b, LAIZÉ *et al.* 2000), *Candida albicans* (CARBREY *et al.* 2001), *Dictyostelium discoideum* (MITRA *et al.*, 2000), *Arabidopsis* (SADE *et al.*, 2010a, 2010b; WANG *et al.*, 2014), dentre outros. Dentre os estudos com

microrganismos mutantes, foi sugerido que aquaporinas auxiliam na sobrevivência ao fornecer proteção contra choque osmótico e congelamento (TANGHE *et al.*, 2006). Já em eucariotos superiores, os membros da família das aquaporinas executam uma grande variedade de funções fisiológicas, incluindo: concentrar a urina nos rins (CHEN *et al.*, 2005), controlar a absorção de glicerol nas células (FRÜHBECK, 2005), manter a homeostasia de água no cérebro (AMIRY-MOGHADDAM & OTTERSEN, 2003), e regulação da osmolaridade na célula vegetal (AZAD *et al.*, 2008; MAUREL *et al.*, 2002). Aquaporinas também têm sido atrativas para estudos farmacêuticos por estarem envolvidas na migração das células durante o crescimento de tumor (SAADOUN *et al.*, 2005) e no crescimento do parasita da malária (PROMENEUR *et al.*, 2007).

Plantas tolerantes a salinidade e seca representam as principais propostas dos estudos de deleção e superexpressão de aquaporinas. Estes constataram que as aquaporinas contribuem para a condutividade hidráulica em folhas e raízes, transpiração (AHARON *et al.*, 2003; SADE *et al.*, 2010a), alongamento da célula vegetal (TANAKA *et al.*, 2008) e fotossíntese (SADE *et al.*, 2010a). Além disso, fatores ambientais que desencadeiam estresse em plantas, tais como: salinidade, seca e frio, podem aumentar a expressão de aquaporinas, sendo que, plantas transgênicas superexpressando algumas aquaporinas aumentaram tolerância a stresses abióticos (BOURSIAC *et al.*, 2008; GAO *et al.*, 2010; LUU & MAUREL, 2005; SADE *et al.*, 2009). Entretanto, as plantas transformadas apresentam um fenótipo discreto, sugerindo que devido à importância das aquaporinas, estas podem ser substituídas por proteínas homólogas e/ou desencadearem mecanismos de compensação (TÖRNROTH-HORSEFIELD *et al.*, 2010).

Diante do exposto, os estudos apontam a aquaporina identificada em *T. harzianum* como uma valiosa proteína de interesse biotecnológico para desenvolver linhagens de agentes de biocontrole mais eficazes, bem como, para obter plantas resistentes a estresses bióticos e abióticos. Com esse intuito, o referido gene foi clonado em vetores de superexpressão em *T. harzianum* e *N. tabacum*, e os fungos e plantas transformados, avaliados quanto a tolerância em diferentes condições de estresse.

2. METODOLOGIA

2.1. METODOLOGIA PARA A TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Trichoderma harzianum* E BIOENSAIOS

2.1.1 Manutenção dos fungos

Trichoderma harzianum (isolado ALL42) da coleção do Laboratório de Enzimologia (UFG/ICB) e *Fusarium solani* (EMBRAPA-ARROZ/FEIJÃO) são mantidos com repiques periódicos em meio MYG (0,5% de extrato de malte, 0,25% de extrato de levedura, 1% de glicose e 2% de ágar) e estocados a 4°C.

2.1.2. Construção do vetor e transformação de *Trichoderma harzianum* via biobalística

Os primers 5'-TCTTTATCGATATGGAGTTGCTGTCGCCTCCT-3' e 5'-TTCTT AAGCTTCGGTTGGTTGAAGTGGTGATACGC-3', desenhados a partir da sequência de aquaporina disponível no JGI para *Trichoderma harzianum* (ID476226), foram utilizados para isolar o gene de *T. harzianum* (ALL42). Para a construção do vetor de superexpressão, a sequência foi inserida no plasmídeo pLHhph1-tef1 (AKEL et al., 2009), previamente linearizado com Cla I/Hind III, sob controle do promotor constitutivo tef-1 α . A estratégia para a construção deste vetor é mostrada na figura 1.

Para a transformação de *T. harzianum* (ALL42) por bombardeamento, micropartículas de tungstênio M5 contendo 5 μ g do vetor de superexpressão foram preparadas de acordo com Aragão et al. (2002). Placas contendo meio BDA (batata 20%, glicose 2% e ágar 2%) foram inoculadas com 100 μ L de solução de esporos de *T. harzianum* (cerca de 10⁷ esporos) e deixadas secar por 15 minutos. As placas contendo esporos foram posicionadas no aparelho de alta pressão de gás hélio, e após serem submetidas ao bombardeamento de micropartículas recobertas com o vetor (1200 psi; 9 cm da membrana de retenção; vácuo), foram mantidas a 28°C durante 24 horas. Após esse período, as placas foram recobertas com meio BDA acrescido do agente seletivo higromicina (100 μ g/ml). Cada transformante obtido foi isolado em uma placa contendo agente seletivo e confirmado como positivos utilizando novos primers que se alinham dentro da sequência de aquaporina (5'-GTTGATGGCATAACCAGTCTCCCA-3') e da marca de seleção higromicina (5'-CACGTTGCAAGACCTGCCTGAA-3'). No intuito de checar a estabilidade do gene e purificar os transformantes positivos, foram realizados três etapas de alternância de conídios em meio BDA/0.1% TritonX-100 /higromicina seguidos de isolamento de esporo único em meio BDA/higromicina.

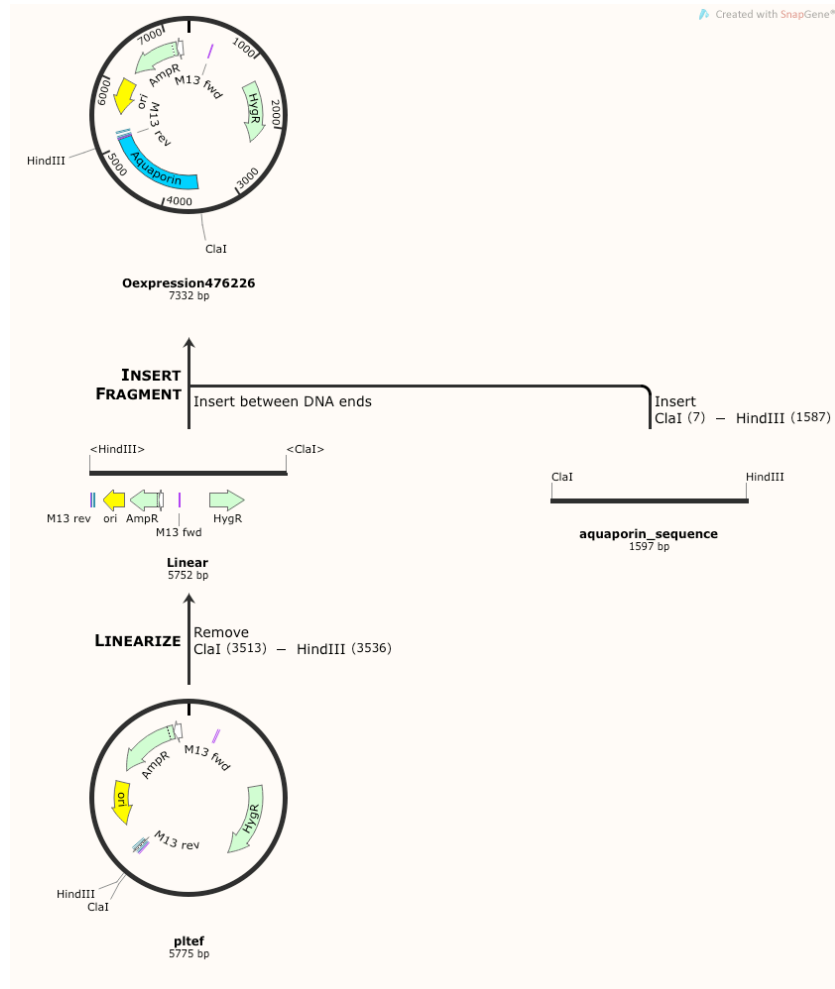


FIGURA 1: Estratégia para a construção do vetor de superexpressão de aquaporina em *Trichoderma harzianum*. O gene que codifica uma aquaporina de *T. harzianum* foi amplificado com primers desenhados a partir da sequência disponível no JGI (ID 476226). A sequência foi clonada no plasmídeo pLHph1-tef1, previamente linearizado com as enzimas Cla I e Hind III.

2.1.3. Bioensaios com transformantes de *Trichoderma harzianum*

Para avaliar o fenótipo de transformantes de *T. harzianum* e comparar com do fungo selvagem, plugues de 5mm de diâmetro com estes foram colocados no centro de placas preenchidas com meio BDA (batata 20%, glicose 2% e ágar 2%), BDA (com adição de NaCl a 5%), BDA (com adição de Sorbitol a 200mM), BDA (com adição de etanol a 10%), BDA (com adição de polietilenoglicol-PEG a 10%) ou BDA (com adição de peróxido de hidrogênio-H₂O₂ a 10%) e encubadas a 28°C. Para os ensaios de antagonismo do fitopatógeno, plugues de 5mm de diâmetro das linhagens de *T. harzianum* e *Fusarium* foram colocadas em lados opostos de placas contendo meio BDA e incubadas a 28°C. Para todos os experimentos, o crescimento radial de três réplicas biológicas foi observado após 24, 48 e 72 horas em dois experimentos independentes. Os transformantes que apresentaram tolerância a estresse abiótico foram avaliados quanto ao crescimento durante 9 dias.

2.2. METODOLOGIA PARA A TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Nicotiana tabacum* E BIOENSAIOS

2.2.1. Construção do vetor e transformação genética de tabaco (*Nicotiana tabacum*) via *Agrobacterium tumefaciens*

No momento da construção desse vetor, o genoma do agente de biocontrole *T. harzianum* não estava disponível. Assim, a sequência que codifica para a proteína identificada como aquaporina de *Trichoderma virens* (98% de identidade com *T. harzianum*) foi mutagenizada com os codons preferenciais de *Arabidopsis* e sintetizada pela empresa EPOCH (Figura 2). A sequência foi clonada no vetor pCambia 3300GCHI (glifosinato de amônio como marca de seleção), sob o controle do promotor constitutivo CaMV35S, e inserida na cepa de *A. tumefaciens* EHA-105. *Agrobacterium* contendo os vetores binários (gene *bar* e gene *nptII* que, confere resistência ao antibiótico kanamicina), foi inoculada em 10 mL de meio LB contendo o antibiótico rifampicina (100 mg/L) por um período de 16 horas. A cultura diluída de *Agrobacterium* foi adicionada aos explantes foliares de tabaco (cv. *Xanthi*), e mantidas durante 30 minutos sob leve agitação. Após a co-cultura, os explantes foram transferidos para placas contendo meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) sólido suplementado com 1 mg/L de BAP por 48 horas a 28°C, no escuro, e posteriormente, cultivados por três semanas em meio de regeneração (MS, BAP, Rifampicina e glifosinato de amônio). Os calos formados foram transferidos para frascos contendo meio de enraizamento e, as plantas confirmadamente positivas (geração T₀), aclimatadas em casa de vegetação (ARAGÃO & BRASILEIRO, 2002; ARAGÃO *et al.*, 2002). As progênies (geração T₁) das plantas regeneradas foram coletadas e armazenadas a 4 °C até o momento dos bioensaios.

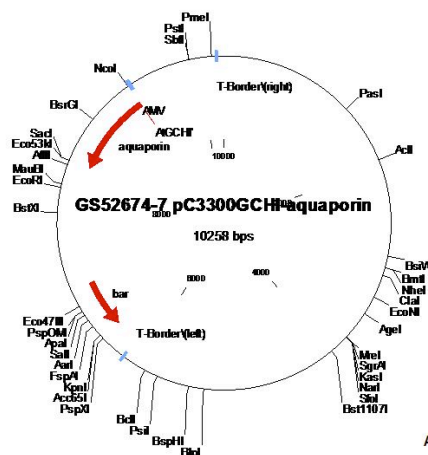


FIGURA 2: Vetor de superexpressão de aquaporina de *Trichoderma* em plantas de *Nicotiana tabacum*. Gene sintético de uma aquaporina de *Trichoderma virens* foi clonado nos sítios *NcoI/SacI* do vetor *pC3300GCHI*. Orientação de clonagem e marca de seleção (*bar*) estão ilustrados.

2.2.2. Avaliação das plantas transgênicas quanto a tolerância a estresses bióticos e abióticos

Bioensaios de germinação in vitro: Sementes de tabaco não transformadas (controle) e de 90 progênies da geração T1 foram esterilizadas e utilizadas para ensaios de germinação. Trinta sementes foram colocadas em placas contendo meio MS, MS (com 600 mM de sorbitol), MS (com 300 mM de NaCl) ou MS (com PEG 10%). As placas foram mantidas em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 h à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ com a germinação avaliada durante 4 semanas.

Bioensaios de germinação em hidroponia: Sementes de tabaco não transformadas (controle) e de 90 progênies da geração T1 foram colocadas em placas tipo elisa contendo furos nos poços e preenchidas com vermiculita. Sementes de cada linhagem foram distribuídas em réplicas de 8 poços. Como meio controle, placas contendo as sementes das linhagem foram colocadas em recipientes contendo solução nutritiva de Hoagland. Como indução de estresses osmótico e salino, placas contendo as sementes das linhagens foram colocadas em recipiente contendo solução nutritiva de Hoagland e adição de sorbitol (200 mM e 400 mM), NaCl (100 mM e 200 mM) ou PEG (10% e 20%). A germinação foi avaliada por 4 semanas.

Bioensaios de crescimento em hidroponia: Sementes de todas as linhagens foram previamente germinadas em placa de isopor contendo solo e vermiculita por 20 dias, e posteriormente transferidas para recipientes contendo solução nutritiva de Hoagland (controle), solução nutritiva de Hoagland (com PEG 20% e 30%) ou solução nutritiva de Hoagland (com NaCl 300, 400, 500 e 600 mM). Plantas resistentes foram selecionadas, avaliadas se positivas e transferidas para meio contendo solo para obter as progênies (T2). Todos os ensaios de tolerância a estresses abióticos desse trabalho foram realizados em duplicata ou triplicata de experimentos.

Bioensaios de resistência estresse biótico: 15 linhagens de plantas transformadas foram avaliadas quanto a tolerância a fungos fitopatogênicos. Para isso, dez plantas de cada linhagem transgênica e controle foram crescidas em casa de vegetação por 50 dias. Discos contendo micélio de *Fusarium solani* foram inoculados na superfície adaxial de folhas destacadas das plantas ($n = 2$ folhas por planta; repetido duas vezes) e estas foram mantidas no escuro à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, com a lesão sendo avaliada por 7 dias.

3. RESULTADOS

3.1. RESULTADOS DA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Trichoderma harzianum*

3.1.1. Bioensaios com *Trichoderma harzianum* geneticamente modificado

Dentre os transformantes de *Trichoderma harzianum* obtidos, quatro foram confirmados como positivos por pcr (T1, T2, T3 e T4) e selecionados para os bioensaios (Figura 2). Após três etapas em que foram isolados esporos únicos, todos esses transformantes apresentaram estabilidade de 100% em meio contendo higromicina.

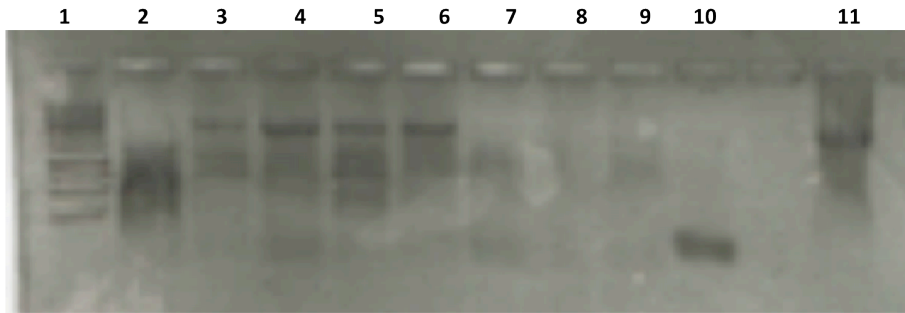


FIGURA 3: Confirmação de transformantes de *Trichoderma harzianum* em gel de agarose. (1): marcador 1kb. (2, 7 e 8): DNA genômico de *T. harzianum* não transformado que cresceu em meio seletivo – falso positivo. (3, 4, 5 e 6): Detecção do vetor em transformantes de *T. harzianum* – transformantes positivos. (9): DNA genômico de *T. harzianum* selvagem - controle negativo. (10): água estéril - controle negativo. (11): vetor de superexpressão - controle positivo (2789 pb).

No intuito de comparar *Trichoderma* selvagem (WT) e os transformantes (T1, T2, T3 e T4) em condições ótimas, os fungos foram crescidos em placas contendo BDA (controle) e mantidos a 28 °C. Nos ensaios de estresses abióticos, fungo selvagem (WT) e transformados (T1, T2, T3 e T4) foram crescidos, a 28 °C, em placa contendo BDA acrescido de etanol 10%, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10%, NaCl 5%, PEG 10% ou Sorbitol 200mM. Os ensaios foram avaliados nos tempos de 24, 48 e 72 horas, com triplicata biológica em dois experimentos independentes. Foi observado que as réplicas apresentaram reprodutibilidade e, para cada ensaio, uma destas foi selecionada aleatoriamente para ser representada nas figuras 4, 5 e 6.

24 horas

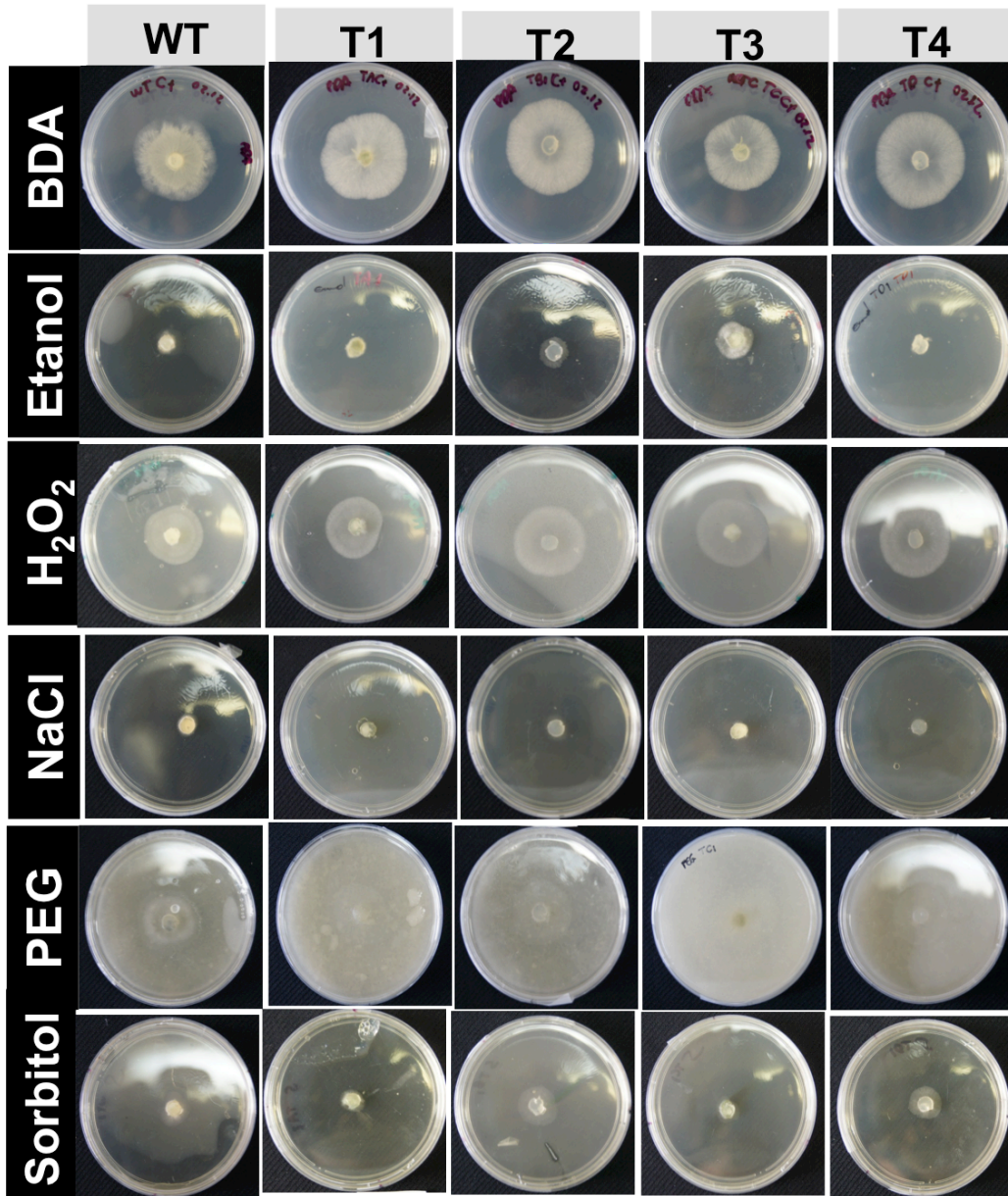


FIGURA 4. Análise fenotípica dos transformantes de *T. harzianum* no tempo de 24 horas. *Trichoderma harzianum* selvagem (WT) e transformantes superexpressando aquaporina (T1, T2, T3 e T4) foram cultivados em placas com BDA (batata, dextrose e agar), BDA (com etanol), BDA (com peróxido de hidrogênio), BDA (com cloreto de sódio), BDA (com polietilenoglicol) e BDA (com Sorbitol).

48 horas

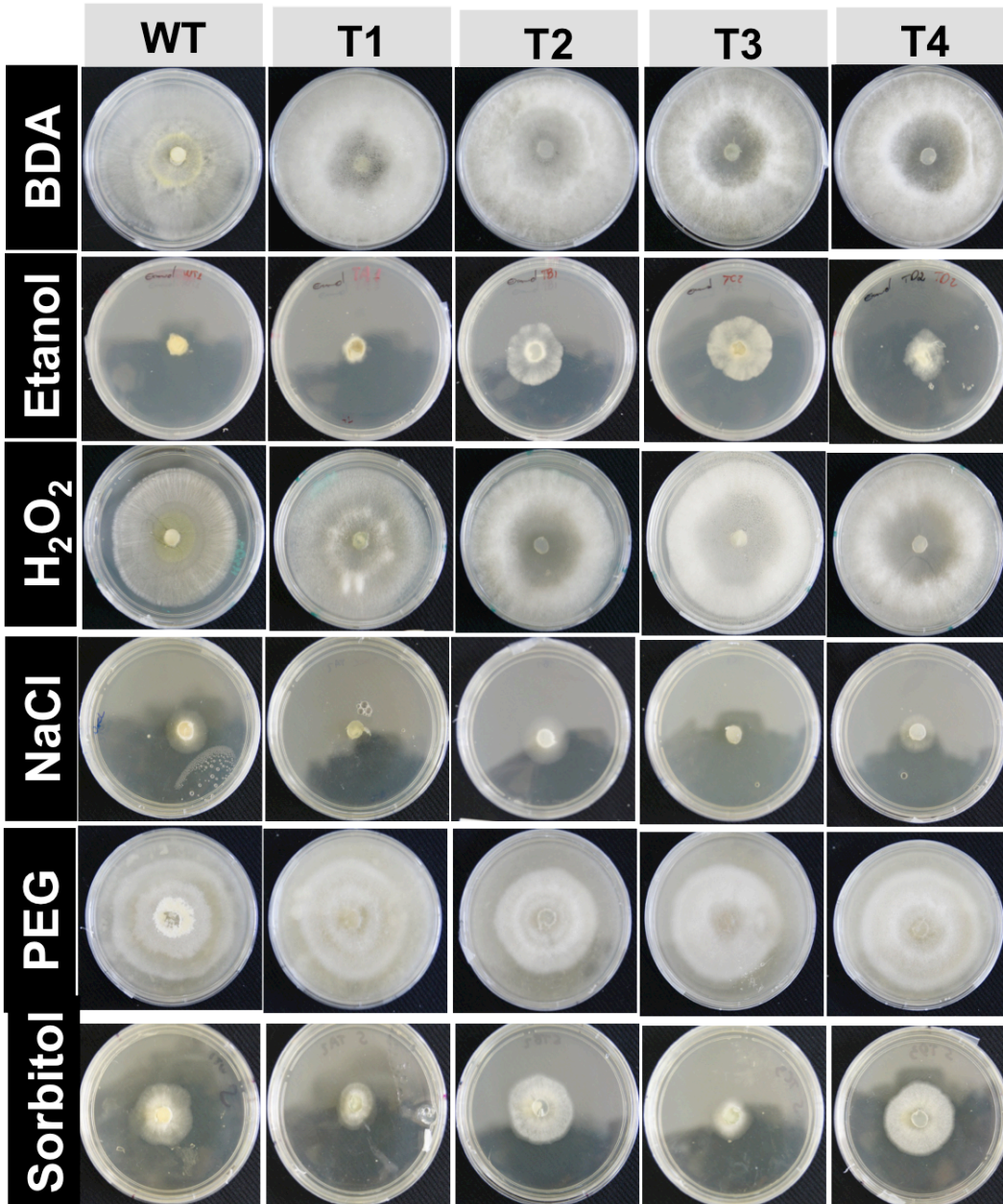


FIGURA 5. Análise fenotípica dos transformantes de *T. harzianum* no tempo de 48 horas. *Trichoderma harzianum* selvagem (WT) e transformantes superexpressando aquaporina (T1, T2, T3 e T4) foram cultivados em placas com BDA (batata, dextrose e agar), BDA (com etanol), BDA (com peróxido de hidrogênio), BDA (com cloreto de sódio), BDA (com polietilenoglicol) e BDA (com Sorbitol).

72 horas

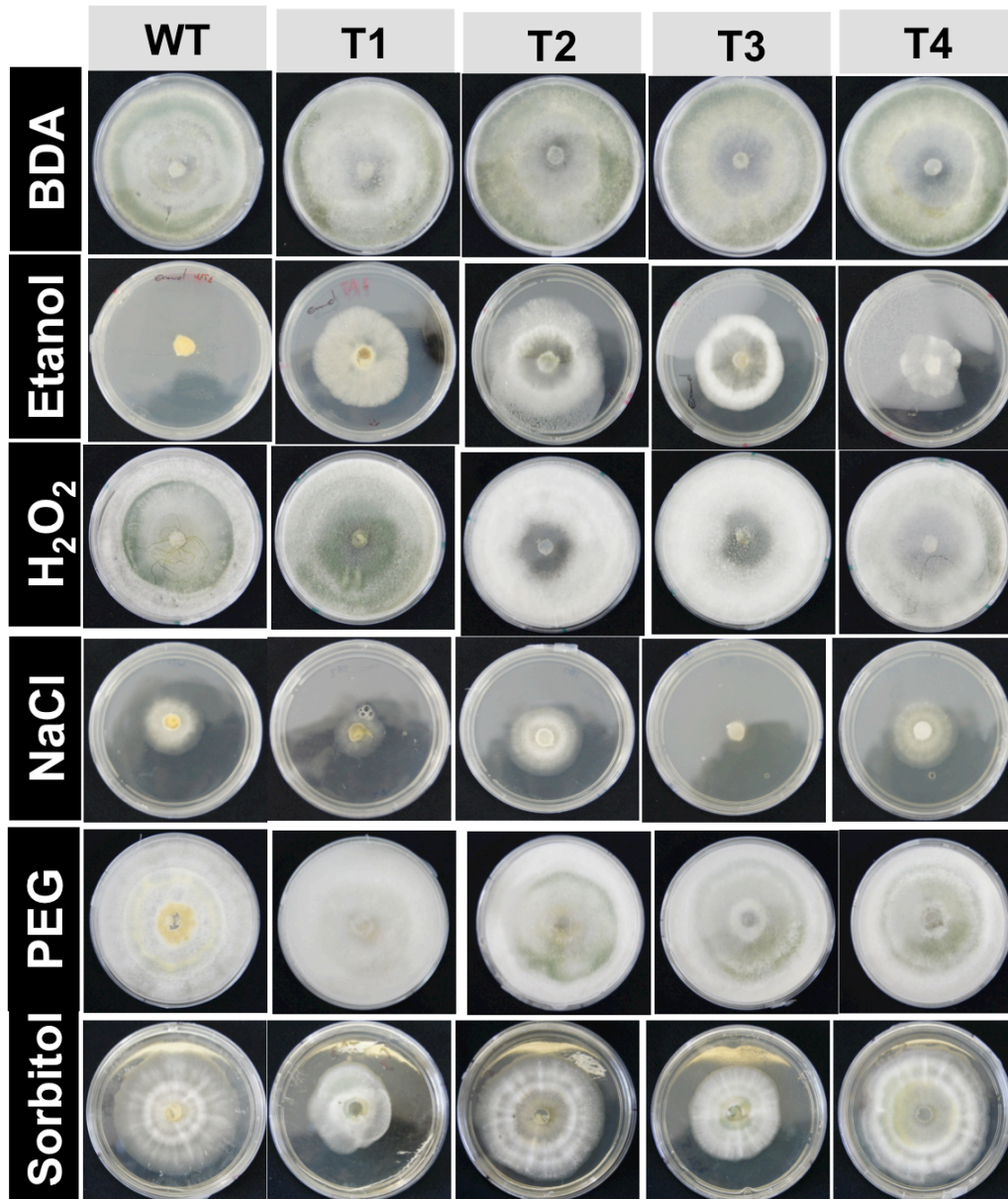


FIGURA 6. Análise fenotípica dos transformantes de *T. harzianum* no tempo de 72 horas. *Trichoderma harzianum* selvagem (WT) e transformantes superexpressando aquaporina (T1, T2, T3 e T4) foram cultivados em placas com BDA (batata, dextrose e agar), BDA (com etanol), BDA (com peróxido de hidrogênio), BDA (com cloreto de sódio), BDA (com polietilenoglicol) e BDA (com Sorbitol).

Foi possível observar em condições ótimas de cultura (meio BDA) que *T. harzianum* selvagem (WT) e transformantes (T1, T2, T3 e T4) apresentaram crescimento e morfologias semelhantes nos tempos de 24, 48 e 72 horas, sendo que o crescimento radial máximo foi detectado no tempo de 48 horas (Figuras 4, 5 e 6). Além disso, ao comparar os fungos WT, T1, T2, T3 e T4 crescidos em meios com adição de estresses abióticos e seus respectivos controles em meio BDA, foi possível constatar que todas as condições de estresse avaliadas causaram inibição no crescimento e/ou na densidade do micélio.

A análise do crescimento dos fungos no tempo de 24 horas demonstrou que, quando comparados ao meio controle, os meios contendo etanol, NaCl ou sorbitol foram os de maior influência no crescimento de *T. harzianum* WT e transformantes, sendo que, em meio contendo NaCl como indutor de estresse, não foi possível detectar o desenvolvimento de micélio de nenhum dos fungos avaliados (Figura 4). E, apesar de detectada redução e/ou inibição do crescimento radial dos fungos nos meios contendo estresses (etanol, H₂O₂, NaCl, PEG ou Sorbitol) quando comparados ao meio controle, foi observado que *Trichoderma harzianum* selvagem (WT) e os transformantes (T1, T2, T3 e T4) apresentaram o crescimento micelial semelhantes (Figura 4). Portanto, no tempo de 24 horas, não foi observada diferença fenotípica entre *T. harzianum* transformado com vetor contendo aquaporina e o selvagem em nenhuma das condições de estresse avaliadas.

No tempo de 48 horas foi observado que *T. harzianum* selvagem (WT) não apresentou crescimento de micélio apenas em meio contendo etanol, enquanto nos demais indutores de estresse, foi possível detectar o micélio de *T. harzianum* selvagem e pelo menos dois diferentes transformantes (Figura 5). E, em meio contendo PEG como indutor de estresse osmótico, todos os fungos avaliados (WT, T1, T2, T3 e T4) alcançaram o crescimento radial máximo em expansão permitido pela placa. Ainda nesse tempo (48 horas) é importante observar que, em presença de H₂O₂, apenas os fungos transformados (T1, T2, T3 e T4) apresentaram contato micelial com as bordas da placa (Figura 5), fato não observado em nenhuma das réplicas de *T. harzianum* selvagem. Dessa maneira, os resultados indicam que a aquaporina pode interferir no crescimento *T. harzianum* em presença de estresse oxidativo, como peróxido de hidrogênio, no tempo de 48 horas.

No tempo de 72 horas foi possível observar que os fungos selvagem (WT) e transformados (T1, T2, T3 e T4) tiveram crescimento máximo em todas as réplicas das placas contendo BDA, H₂O₂ e PEG, além de apresentar esporulação (Figura 6). Nos meios contendo NaCl e sorbitol foi possível observar crescimento dos fungos transformados e selvagem quando comparado aos períodos anteriores, entretanto, em nenhum dos fungos ocorreu contato do micélio com as bordas da placa. Com relação ao meio contendo etanol foi possível constatar crescimento de micélio em todos os fungos transformados (T1, T2, T3 e T4), fato este não observado apenas no fungo selvagem (WT) (Figura 6).

Foi avaliado o crescimento dos fungos, em meio contendo indicador de pH, sob as referidas condições estresse durante um período de 9 dias. Foi observado que, em condições ótimas e condições de estresses osmótico (PEG e sorbitol), *T. harzianum* transformado com vetor de superexpressão de

aquaporina não alterou o crescimento e a esporulação. No entanto, a transformação do fungo com o referido gene interferiu em seu crescimento na presença de etanol, sal e peróxido de hidrogênio como condições teste (Figura 7).

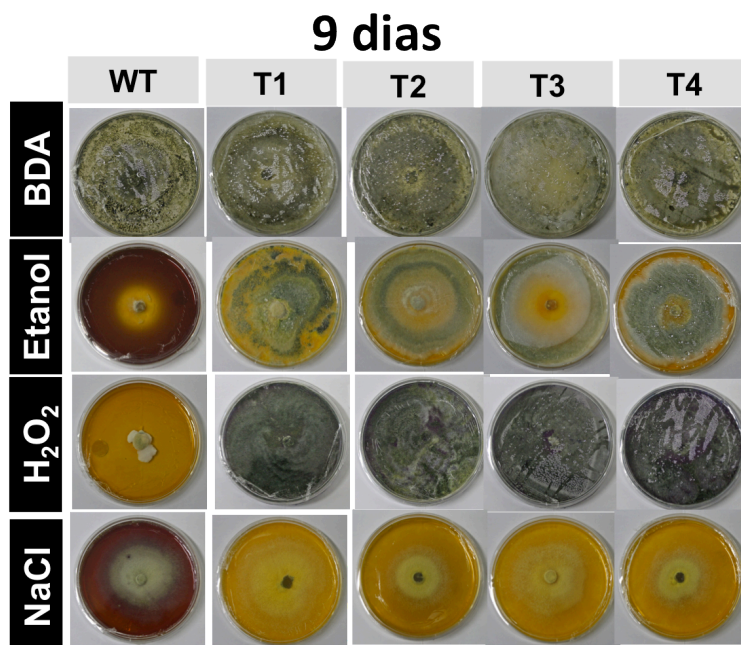


FIGURA 7. Análise fenotípica dos transformantes de *T. harzianum* no tempo de 9 dias. *Trichoderma harzianum* selvagem (WT) e transformantes superexpressando aquaporina (T1, T2, T3 e T4) foram cultivados em placas com BDA (batata, dextrose e agar), BDA (com etanol), BDA (com peróxido de hidrogênio) e BDA (com cloreto de sódio).

Com relação aos ensaios de confronto, *T. harzianum* selvagem (WT) e quatro transformantes (T1, T2, T3 e T4) foram avaliados em relação ao antagonismo do fitopatógeno *Fusarium*. Para isso, discos de micélio de *Trichoderma* e *Fusarium* foram colocados em lados opostos de placa de petri contendo BDA e avaliados nos tempos de 24, 48 e 72 horas (Figura 7). Os resultados dos tempos de 24 e 48 horas indicam que os micélios dos fungos selvagem (WT) e transformados (T1, T2, T3 e T4) cresceram de maneira semelhante nos momentos que antecedem ao contato com *Fusarium*. No entanto, foi possível observar que todos os fungos transformados (T1, T2, T3 e T4) entraram em contato com o fitopatógeno no tempo de 72 horas, fato não observado em nenhuma das réplicas de *T. harzianum* selvagem (WT). Além disso, é possível detectar no tempo de 72 horas uma maior concentração de micélio nos fungos transformados com relação ao fungo WT. Dessa maneira, os resultados sugerem que a transformação de *T. harzianum* com aquaporina pode interferir em seu mecanismo de biocontrole de fitopatógenos.

Confronto

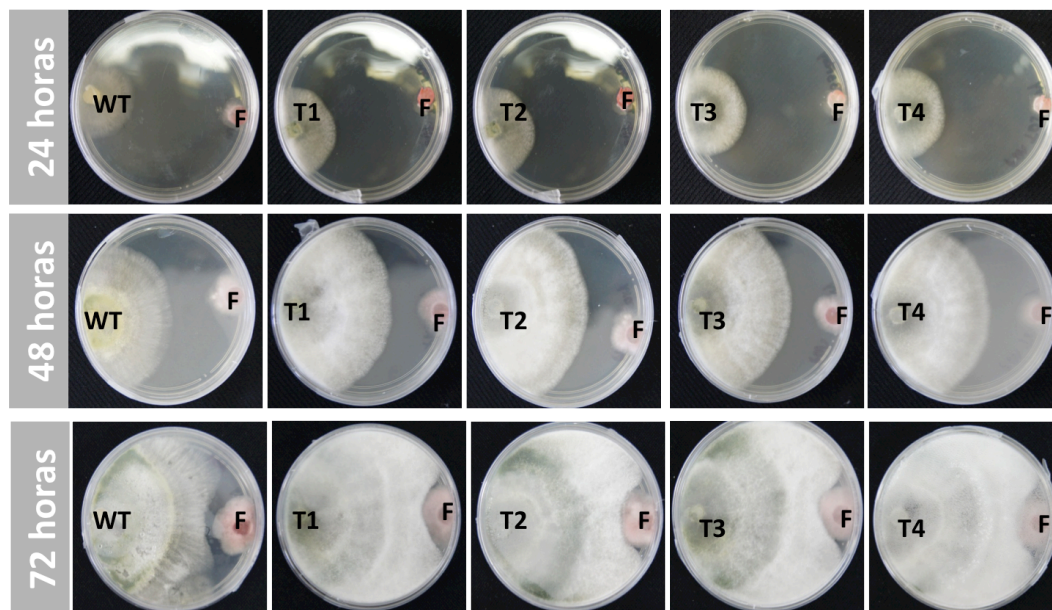


FIGURA 8. Bioensaios de micoparasitismo com transformantes de *T. harzianum*. *Trichoderma harzianum* selvagem (WT) e transformantes superexpressando aquaporina (T1, T2, T3 e T4) foram cultivados em placas com BDA (batata, dextrose e agar) em confronto com o fitopatógeno *Fusarium solani* (F).

3.2. RESULTADOS DA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Nicotiana tabacum*

3.2.1 Transformação genética de *Nicotiana tabacum* e seleção das progênie

A sequência da proteína aquaporina de *T. harzianum* foi comparada quanto a sua homologia com proteínas de outros fungos utilizando blastx como ferramenta. Foram observadas identidades com *Trichoderma virens* (98%), *Trichoderma reesei* (95%), *Trichoderma atroviride* (90%) e *Fusarium oxysporum* (82%). Entretanto, quando a sequência foi comparada utilizando *Nicotiana tabacum* como modelo, foi detectada identidade de apenas 28% com o gene desta espécie.

O gene que codifica uma aquaporina de *Trichoderma* foi clonado no vetor pC3300GCHI (Figura 2), sob controle do promotor *CaMV35S*, e utilizado para a transformação genética de tabaco via *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 8). Através da metodologia do co-cultivo de segmentos foliares de tabaco e *A. tumefaciens*, foram obtidos calos potencialmente transformados a partir de 20 dias de incubação em sala de cultivo. Os calos regenerados em meio seletivo foram individualizados e transferidos para meio de enraizamento, sendo que o crescimento da parte aérea e início da rizogênese se deu, aproximadamente, 20 dias após essa transferência. Plantas expressando o gene de seleção

(*bar*), que resulta na tolerância ao herbicida fosfinotricina, foram aclimatadas e, posteriormente, levadas para a casa de vegetação, onde o florescimento ocorreu em, aproximadamente, dois meses. Dentre as plantas positivas obtidas, noventa (90) linhagens de fenótipo normal foram férteis e, sendo assim, tiveram as sementes coletadas e armazenadas para os bioensaios subsequentes. As etapas referentes a transformação, desenvolvimento e florescimento das plantas transgênicas estão ilustradas na figura 8.

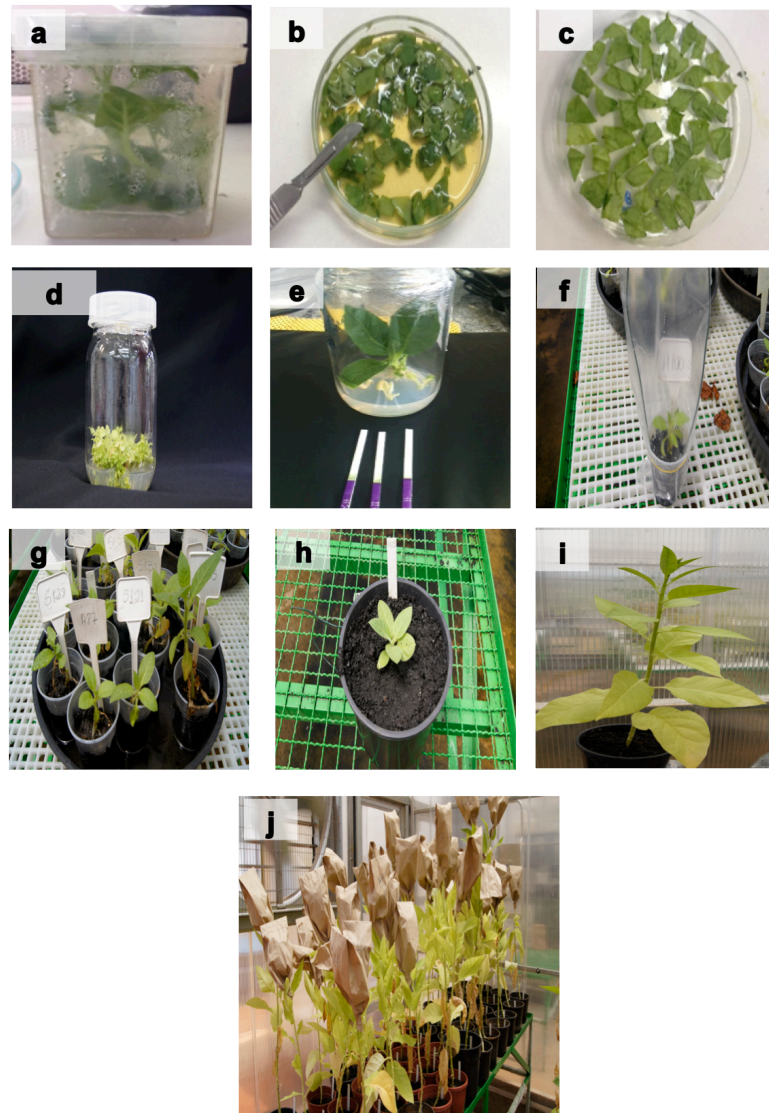


FIGURA 9: Transformação de explantes foliares de *Nicotiana tabacum* com vetor contendo aquaporina de *Trichoderma* e etapas de desenvolvimento e florescimento. (a, b) Tabaco selvagem e explantes em co-cultura. (c) Explantes em meio seletivo. (d) Regeneração de brotos na presença de agente seletivo. (e) Plântulas três meses após a transformação genética expressando o gene de seleção (*bar*). (f, g) Aclimação de plantas em casa de vegetação. (h, i) Transferência para vaso e desenvolvimento das plantas. (j) Florescimento das plantas transformadas.

3.2.2. Avaliação de tolerância a estresses abióticos em linhagens de tabaco transgênico

Sementes de tabaco não transformadas (controle) e de 90 linhagens foram esterilizadas e avaliadas quanto a germinação *in vitro* sob condições controle (MS), estresse osmótico (MS-PEG e MS-sorbitol) e estresse salino (MS-NaCl). Após 2 semanas foi observado germinação de sementes em todos os meios avaliados, não tendo sido detectada diferença na germinação entre as sementes transformadas e selvagens (Figura 9).

Na avaliação de germinação sob sistema de hidroponia (Figura 9), sementes de 90 linhagens transgênicas e selvagem foram submetidas a diferentes condições testes (controle, estresse salino e estresse osmótico). Foi observado que, após 3 semanas de experimento, as sementes de todas as linhagens (transgênicas e selvagem) germinaram em solução controle, PEG 10%, NaCl 100 mM e NaCl 200 mM. Entretanto, nessas condições de estresse, as sementes das linhagens transgênicas atrasaram a germinação em 1 semana quando comparadas com as selvagens. Após 5 semanas de experimento, apenas 27 linhagens transformadas, além da linhagem controle, germinaram em condição contendo PEG 20%.

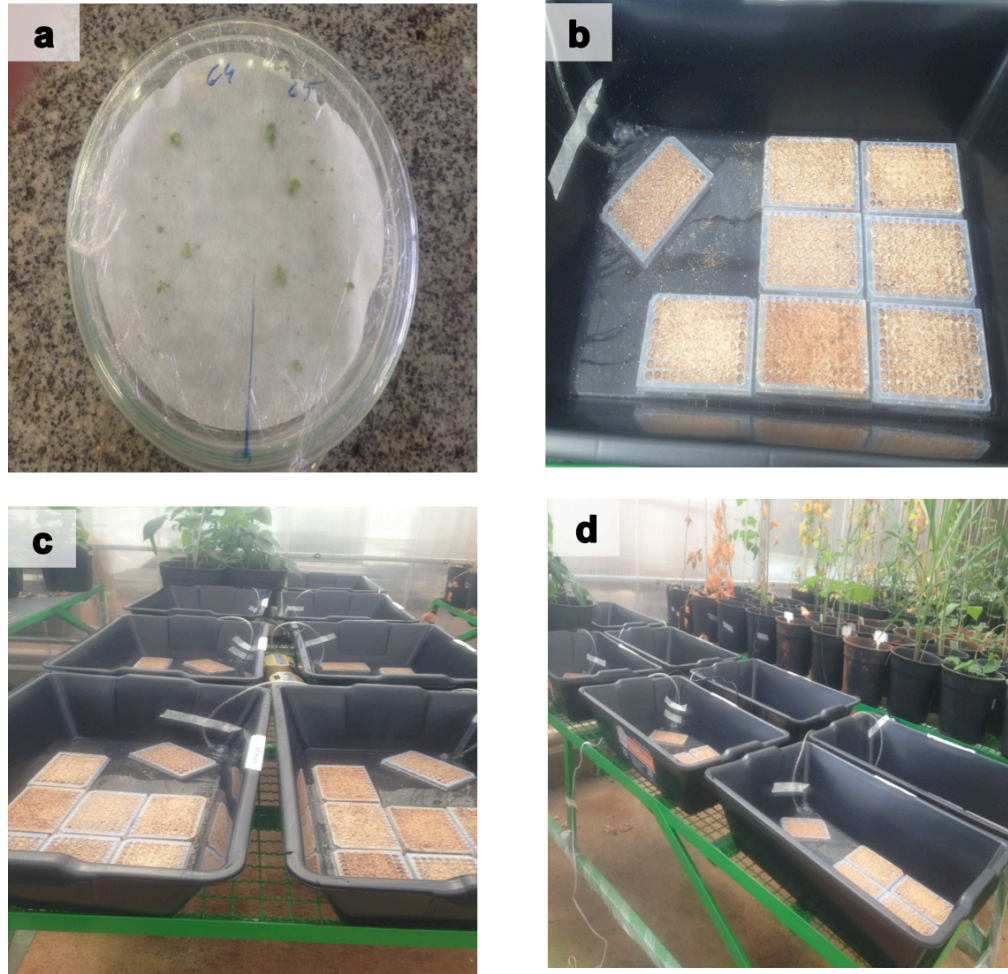


FIGURA 10: Bioensaios de germinação de sementes de *Nicotiana tabacum* superexpressando *aquaporina*. (a) Sementes de tabaco submetidas a estresses abióticos *in vitro*. (b,c,d) Sementes de tabaco submetidas a estresses abióticos em cultivo hidropônico.

As 90 linhagens de tabaco transformadas com aquaporina de *Trichoderma* foram avaliadas quanto ao crescimento sob condições de estresse osmótico e salino. Para isso, estas foram previamente germinadas em placa de isopor contendo solo e vermiculita por 21 dias, e transferidas para recipientes contendo solução de Hoagland (controle), solução de Hoagland (com PEG 20% e 30%) ou solução de Hoagland (com NaCl 300, 400, 500 e 600 mM).

Foi possível observar que, além das linhagens selvagem e transformadas apresentarem crescimento e morfologia semelhantes em condições ótimas de cultura, os estresses abióticos avaliados causaram redução no crescimento das plantas. E que, nos tratamentos contendo PEG 20 % e 30% como estresse osmótico, apesar de detectada redução no crescimento das plantas nesse meio quando comparado ao meio controle, não foi observada morte ou diferença entre as plantas de linhagens transgênicas e selvagem. Com relação aos tratamentos contendo NaCl (300, 400, 500 e 600 mM) como indutores de estresse, foi observado redução no crescimento das plantas em concordância com o

aumento gradativo da concentração de sal (Figura 10). Além disso, após 4 semanas de tratamento com 500 e 600 mM de NaCl foi possível selecionar nove linhagens de plantas transgênicas com plantas vivas, fato não ocorrido com plantas da linhagem selvagem. As plantas tolerantes confirmadas como positivas foram transferidas para vaso para aguardar o florescimento, e as sementes da progênie (T2) foram coletadas para novas análises.

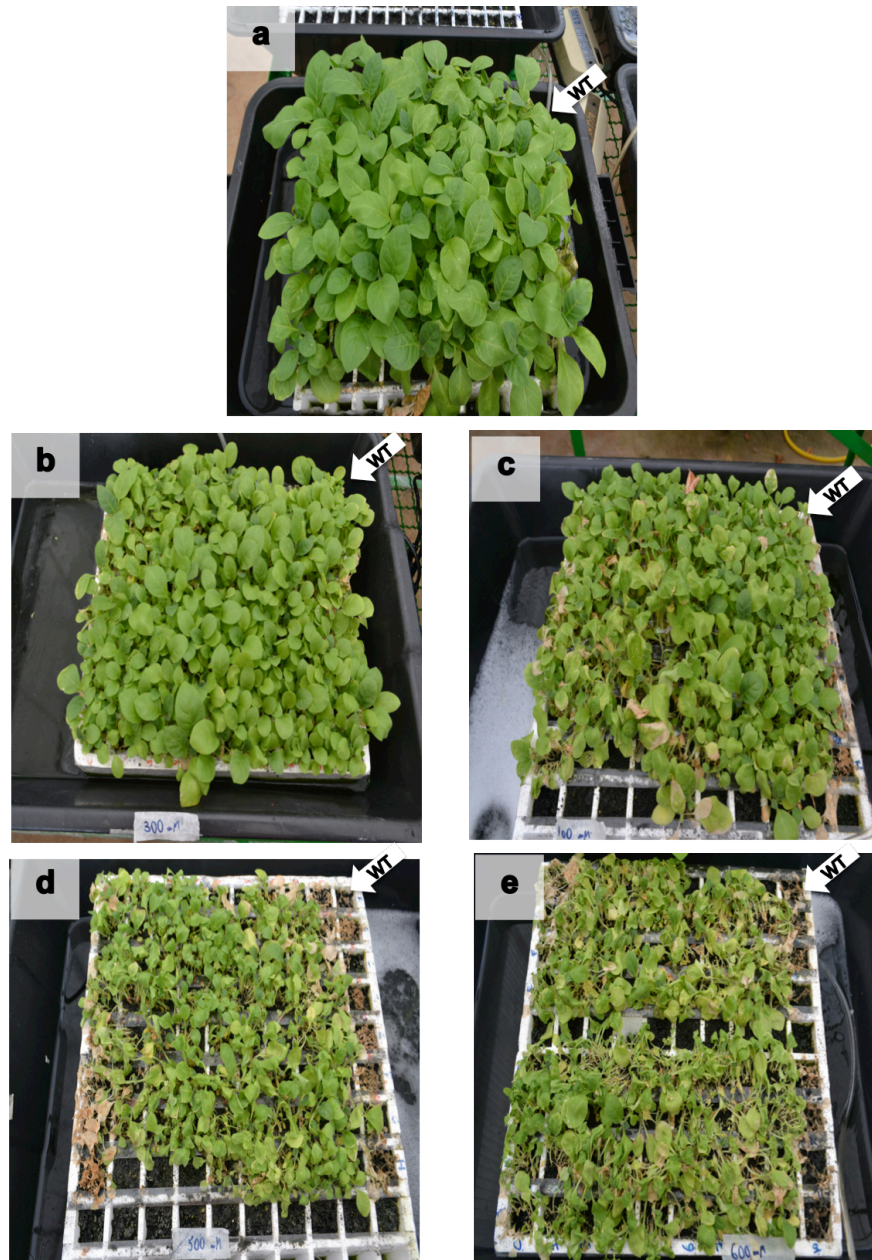


FIGURA 11: Bioensaios de crescimento de linhagens de tabaco transformadas e não transformada sob condições de estresse salino em cultivo hidropônico. (a) Condição controle. (b) NaCl 300 mM. (c) NaCl 400 mM. (d) NaCl 500 mM. (e) NaCl 600 mM. (WT) Plantas de *N. tabacum* de linhagem não transformada - controle.

3.2.3. Avaliação de tolerância a fitopatógeno em *Nicotiana tabacum* geneticamente modificado

Para investigar se a transformação de *Nicotiana tabacum* com aquaporina de *Trichoderma* correlaciona-se com a tolerância a estresse biótico, 15 linhagens transgênicas foram crescidas em casa de vegetação e avaliadas quanto a resistência ao fitopatógeno *F.solani*. Para isso, foi observada a lesão foliar provocada pelo fungo em dez plantas por linhagem, duas folhas por planta, e comparada com a lesão causada pelo fungo em tabaco não transgênico. Nos resultados obtidos, não foi detectada diferença nas lesões causadas às folhas das linhagens transformadas quando comparadas à folhas de plantas selvagens (Figura 11). Além disso, foi observado que o fitopatógeno alcançou o crescimento máximo nas folhas de todas as plantas avaliadas com tempo semelhante (10 dias). Sendo assim, os resultados indicam que a transformação de aquaporina de *Trichoderma* em tabaco não confere resistência ao fitopatógeno *F.solani*.

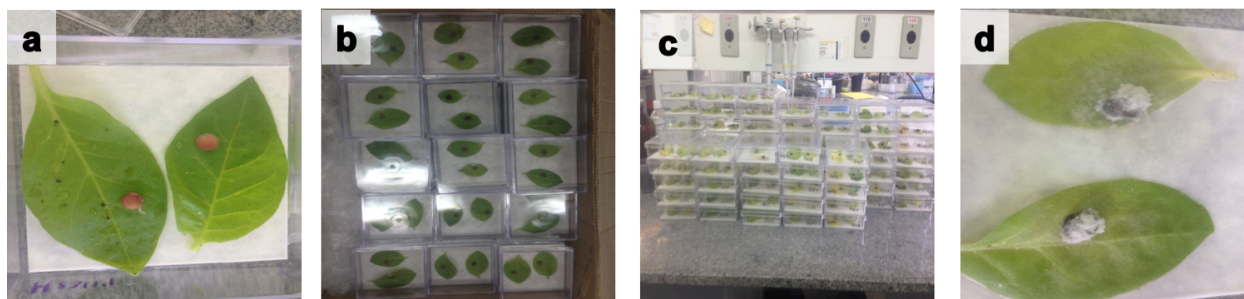


FIGURA 12: Bioensaios de resistência a fitopatógeno em plantas de tabaco geneticamente modificadas. (a, b,c) Plagues com micélio de *Fusarium solani* na superfície de folhas de linhagens de tabaco transformadas com aquaporina e controle (d) Perfil do crescimento do fungo 7 dias após o crescimento em sala de cultivo.

4. DISCUSSÃO

Aquaporinas (AQP) são uma família de proteínas integrais de membrana responsáveis pelo transporte de água e de outras pequenas moléculas. Diversos estudos com estas proteínas demonstram potencial em desenvolver plantas de relevância agrícola com resistência a estresses abióticos através da superexpressão de seus genes (MARTINEZ-BALLESTA; CARVAJAL, 2013). Recentemente, uma aquaporina foi identificada no agente de controle biológico *Trichoderma harzianum* durante sua interação com o fitopatógeno *Fusarium solani*, indicando que esse gene encerra potencial biotecnológico tanto para a transformação genética de plantas quanto para a seleção de linhagens de biocontrole mais eficientes (VIEIRA et al., 2013). Sendo assim, este trabalho faz estudos com a aquaporina identificada em *T. harzianum* no intuito de avaliar sua importância no biocontrole de fitopatógenos, bem como, de viabilidade em obter plantas transgênicas tolerantes a stresses bióticos e abióticos utilizando genes do agente de biocontrole *Trichoderma*.

Através da metodologia de transformação genética, ferramenta indispensável para a análise funcional de genes de interesse biotecnológico, foram avaliados transformantes de *T. harzianum* com vetor de superexpressão contendo uma aquaporina identificada na interação desse microorganismo com um fitopatógeno. A análise do fenótipo desses transformantes indicou que a presença de aquaporina não alterou o crescimento, desenvolvimento ou a morfologia do micélio quando crescidos em condições ótimas. Porém, como diversos estudos funcionais com aquaporinas em microorganismos revelaram que esse gene auxilia na sobrevivência e fornece proteção contra choque osmótico e congelamento (HUSSAIN et al., 2011), foi aberta a discussão sobre o fenótipo desses transformantes frente a estresses abióticos.

Transformantes de *T. harzianum* contendo aquaporina foram crescidos em presença de NaCl, PEG e Sorbitol como estresses salino e osmótico, respectivamente, e não apresentaram tolerância a esses estresses nas dosagens e tempos avaliados (24, 48 e 72 horas). No entanto, ao serem avaliados em meio contendo peróxido de hidrogênio como indutor de estresse, foi observado um maior crescimento radial do micélio dos transformantes quando comparado ao crescimento do fungo selvagem.

A exposição de microrganismos ao sal, peróxido de hidrogênio e etanol induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e, em seguida, ao estresse oxidativo (LIU et al., 2013). Entretanto, foi demonstrado em recente estudo de transcriptoma de *Trichoderma atroviride* que após a lesão ao micélio ocorre a síntese de espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo que estas ERO ativam as vias sinalizadoras de defesa através da produção de moléculas de peróxido de hidrogênio. E, ainda, que essa resposta de defesa que utiliza peróxido de hidrogênio como molécula sinalizadora é conservada entre *Trichoderma*, animais e plantas (HERNÁNDEZ-OÑATE et al., 2012). Como em nossos resultados com transformantes de *T. harzianum* sugerem aumento de tolerância ao peróxido de hidrogênio, mas não ao cloreto de sódio, é possível que esta proteína de membrana esteja envolvida na biossinalização de

resposta de defesa ocorrida após a lesão do micélio.

Assim como o peróxido de hidrogênio, o etanol tem um forte impacto sobre os comportamentos celulares e processos metabólicos relacionados com a morte celular, incluindo mudanças na fluidez da membrana, estrutura de proteínas, respostas a estresse e de apoptose (KITAGAKI et al., 2007; VAN VOORST et al., 2006). Além disso, altas concentrações de etanol exercem efeito nas bicamadas de fosfolípidos, nas proteínas, e em componentes hidrofílicos nas células (KITAGAKI et al., 2007). Como nossos resultados indicam que transformantes contendo aquaporina são tolerantes ao etanol, além do peróxido de hidrogênio, é possível sugerir que o aumento no número dessas proteínas de membrana pode interferir na estrutura e composição da bicamada lipídica, e conseqüentemente, nas funções associadas a ela, como a resistência e respostas de defesa.

Trichoderma também têm conquistado posição de destaque nos processos biotecnológicos de produção de bioetanol, pois apresenta características que conferem vantagens em relação aos demais microorganismos (SCHUSTER & SCHMOLL, 2010b). No entanto, os processos fermentativos utilizando organismos apresentam “gargalos” para a produtividade, como a geração de produtos tóxicos que afetam o crescimento e a morte celular. Dentre estes produtos, o próprio etanol é um dos exemplos adequados, porque é altamente tóxico para as células e um produto inibidor do processo fermentativo (SRIYUDTHSAK & SHIRAIISHI, 2010). Como solução, pesquisadores têm direcionados esforços para desenvolver linhagens resistentes a etanol, especialmente aquelas que reforçam a membrana celular dos microorganismos (SRIYUDTHSAK & SHIRAIISHI, 2010; ZHENG et al., 2013). Como nossos resultados de transformação com aquaporina de *T. harzianum* indicam um aumento de resistência ao etanol nos transformantes, esta representa uma perspectiva a ser também avaliada durante processos fermentativos de obtenção de bioetanol.

Nesse trabalho, a transformação com vetor contendo aquaporina de *T. harzianum* também foi avaliada como estratégia para aumentar a atividade de micoparasitismo deste agente de controle biológico. Atualmente, esta estratégia é utilizada tanto para o estudo do biocontrole quanto para a identificação de genes de valor biotecnológico para a transformação genética de plantas (MONTERO-BARRIENTOS et al., 2008; SCHUSTER & SCHMOLL, 2010b). Foi observado nos ensaios de confronto com o fitopatógeno que os transformantes de *T. harzianum* apresentaram mais rápido crescimento das hifas e mais denso micélio ao atingir contato com o hospedeiro. De fato, esse gene foi identificado em *T. harzianum* após interação com o referido fitopatógeno e, através de PCR tempo real, havia sido demonstrado que aquaporina está altamente expressa durante o biocontrole (VIEIRA et al., 2013). Portanto, em conjunto nossos resultados indicaram que a expressão desta aquaporina em uma planta modelo representaria uma excelente alternativa para o estudo de aplicabilidade desse gene em novos cultivares com resistência a estresses abióticos e fungos fitopatogênicos.

Estudos com aquaporinas relatam que, sob condições desfavoráveis, estas podem atrasar a

desidratação e promover a retenção de água nas células. Por esta razão, plantas transgênicas superexpressando aquaporinas são excelentes candidatas para tentar melhorar a tolerância a estresses abióticos (MARTINEZ-BALLESTA & CARVAJAL, 2013). Nesse trabalho, a transformação de *Nicotiana tabacum* com aquaporina de *Trichoderma* não acarretou diferença no percentual de germinação, crescimento ou desenvolvimento quando em condições ótimas de cultura. Mas como já foi descrito que alguns membros da família de aquaporinas são redundantes em condições ótimas de cultura, mas são essenciais sob estresse ambiental (LIÉNARD et al., 2008), foram avaliadas as mesmas progênes sob condições de estresses abióticos.

Foi observado que, quando avaliadas sob diferentes condições de estresse osmótico e salino, a germinação das sementes das progênes transformadas ocorreu 7 dias após as selvagens. E ainda, não foi demonstrada maior tolerância a estresse osmótico em plantas de linhagens transformadas com o referido gene. Sendo assim, ao avaliar transformantes de fungo e tabaco com o referido gene foi demonstrado que, apesar não alterados o crescimento e a morfologia em condições ótimas de cultura, este não confere resistência às estresse osmótico em nenhum dos organismos estudados. No entanto, a transformação de tabaco com o gene codificador de aquaporina permitiu selecionar linhagens de plantas com tolerância a elevado estresse salino, fato não observado em *T. harzianum* transformado com este gene.

São inúmeros os exemplos na literatura de aquaporinas usadas como proteínas alvo para tentar melhorar as relações hídricas de plantas sob estresse ambiental (AHARON et al., 2003; SADE et al., 2009, 2010a; ZHOU et al., 2012). Sabe-se que a superexpressão de aquaporinas que estão inibidas durante o estresse não confere tolerância a estresses abióticos, mas que diferentes respostas a estresses são desencadeadas em plantas após a superexpressão de isoformas de aquaporinas (CUI et al., 2008; JANG et al., 2007). E, apesar da alta homologia entre as sequências, o fluxo de água nas plantas é determinado pela contribuição das diferentes isoformas destes genes. Mas o fato da regulação dessas isoformas ocorrer de maneira adversa em condições favoráveis ou de estresse hídrico indica um complexo mecanismo de regulação das aquaporinas, no qual a expressão aumentada ou diminuída destes genes, de um modo espacial e temporal, é necessária para lidar com o estresse

Também já foi demonstrado que a expressão de aquaporina de uma espécie heteróloga aumenta a tolerância a estresse hídrico através da cooperação com aquaporinas endógenas (AYADI et al., 2011; ZELAZNY et al., 2007) e, no presente estudo, foi observado aumento de tolerância a estresse salino pela superexpressão de aquaporina de *Trichoderma* em *Nicotiana tabacum*. Portanto, a influência na tolerância a estresses abióticos causada pela expressão ectópica desse gene requer maiores investigações morfofisiológicas e de análise de expressão nas progênes homocigotas.

Os desafios para o desenvolvimento da biotecnologia agrícola incluem a identificação de genes relacionados com a resistência a doenças fúngicas para a introdução no genoma de plantas (LIU et al.,

2013).. Adotando essa abordagem, estudos com plantas geneticamente modificadas utilizando genes de *Trichoderma* destacam a expressão de hidrolases, como chitinases e glucanases, como genes de indução de resistência a estresses bióticos, e acredita-se ser devido a degradação da parede celular de fungos fitopatogênico (GROVE & GOWTHAMAN, 2003; ISLAM, 2006; MEI *et al.*, 2004).

Devido ao fato desta aquaporina ter sido identificada em *T. harzianum* durante interação com o fitopatógeno *F.solani*, a transformação de tabaco com esse gene também foi avaliada como estratégia para aumentar a resistência ao fitopatógeno. E foi observado que, apesar de *T. harzianum* transformado com esse gene aumentar o crescimento durante o confronto com *Fusarium solani*, plantas de tabaco transformadas com esse gene não apresentaram resistência a ao fitopatógeno. Entretanto, dentre os estudos que comprovam a indução de resistência a estresses abióticos utilizando genes de *Trichoderma*, não foram avaliadas a resistência destas plantas transgênicas a fitopatógenos (HERMOSA *et al.*, 2011b; MONTERO-BARRIENTOS *et al.*, 2010).

Este trabalho é pioneiro na obtenção de plantas transgênicas contendo aquaporina de um fungo de controle biológico, bem como, na avaliação de plantas transformadas com aquaporina como estratégia para aumentar a tolerância à doenças fúngicas. Como o presente estudo alcançou progressos na transformação de fungo e plantas com a aquaporina identificada em *T. harzianum*, e ainda, indicou tolerância a estresses abióticos e resistência a fitopatógenos em transformantes, tornou-se necessário elucidar a expressão deste gene nos organismos transformados. Sendo assim, estudos de expressão deste gene em *T. harzianum* e *N. tabacum* serão o realizados em nossas próximas análises.

CONCLUSÃO

A identificação de genes diferencialmente expressos em *T. harzianum* durante o confronto com *F.solani* permitiu analisar mecanismos moleculares que estão relacionados com o biocontrole de fitopatógenos, bem como, elencar genes com potencial biotecnológico. Com efeito, *N. tabacum* e *T. harzianum* transformados com vetores de superexpressão contendo uma aquaporina identificada indicaram que esses genes de *Trichoderma* representam uma valiosa ferramenta tanto para seleção de linhagens de biocontrole mais eficazes, bem como, para a obtenção de plantas transgênicas tolerantes a estresses abióticos.

PERSPECTIVAS/TRABALHOS EM DESENVOLVIMENTO

- Análise de expressão de aquaporina em transformantes de *Trichoderma harzianum*;
- Análise de expressão de aquaporina em plantas de *Nicotiana tabacum* geneticamente modificadas;
- Deleção (*knockout*) de aquaporina em *T. harzianum*;
- Expressão em *N. tabacum* e análise dos demais genes identificados em *T. harzianum*;
- Deleção (*knockout*) dos demais genes com expressão diferencial em *T. harzianum* com o intuito de selecionar genes marcadores para o biocontrole.
- Deleção (*knockout*) e superexpressão de genes de *T. harzianum* com interesse biotecnológico para a transformação genética de plantas.

REFERÊNCIAS

- AHARON, R. et al. Overexpression of a Plasma Membrane Aquaporin in Transgenic Tobacco Improves Plant Vigor under Favorable Growth Conditions but Not under Drought or Salt Stress. **The Plant Cell**, v. 15, n. February, p. 439–447, 2003.
- AKEL, E. et al. Molecular regulation of arabinan and L-arabinose metabolism in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Eukaryotic cell**, v. 8, n. 12, p. 1837–44, dez. 2009.
- ALMEIDA, F. B. R. et al. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: Evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology letters**, v. 29, n. 8, p. 1189–1193, 2007.
- AMIRY-MOGHADDAM, M.; OTTERSEN, O. The molecular basis of water transport in the brain. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 12, p. 991–1001, dez. 2003.
- ARAGÃO, F. et al. Metodologias para Transformação Genética de Plantas-Modelo. In: **Circular técnica**. [s.l.: s.n.]. v. 15p. 1–5.
- ARAGÃO, F.; FARIA, J. First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. **Nature biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 1086–1088, 2009.
- ARAGÃO, F. J. L.; BRASILEIRO, A. C. M. Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, n. 1, p. 01–10, jan. 2002.
- AYADI, M. et al. Identification and characterization of two plasma membrane aquaporins in durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum) and their role in abiotic stress tolerance. **Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 49, n. 9, p. 1029–39, set. 2011.
- AZAD, A. K. et al. Characterization of four plasma membrane aquaporins in tulip petals: a putative homolog is regulated by phosphorylation. **Plant & cell physiology**, v. 49, n. 8, p. 1196–208, ago. 2008.
- BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249–60, dez. 2004.
- BOLAR, J. P. et al. Expression of Endochitinase from *Trichoderma harzianum* in Transgenic Apple Increases Resistance to Apple Scab and Reduces Vigor. **Phytopathology**, v. 90, n. 1, p. 72–7, jan. 2000.

BOURSIAC, Y.; PRAK, S.; BOUDET, J. The response of Arabidopsis root water transport to a challenging environment implicates reactive oxygen species- and phosphorylation-dependent internalization of aquaporins. **Plant Signal ...**, v. 3, n. 12, p. 1096–1098, 2008.

BROTMAN, Y.; KAPUGANTI, J. G.; VITERBO, A. Quick guide Trichoderma. **Current Biology**, v. 20, n. 9, p. 390–391, 2012.

CALAMITA, G. et al. Regulation of the Escherichia coli water channel gene aqpZ. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 7, p. 3627–31, 1998.

CARBREY, J. M. et al. Aquaporins in Saccharomyces: Characterization of a second functional water channel protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 3, p. 1000–5, 30 jan. 2001.

CARBREY, J. M.; CORMACK, B. P.; AGRE, P. Aquaporin in Candida: characterization of a functional water channel protein. **Yeast (Chichester, England)**, v. 18, n. 15, p. 1391–6, nov. 2001.

CARPENTER, M. A.; STEWART, A.; RIDGWAY, H. J. Identification of novel Trichoderma hamatum genes expressed during mycoparasitism using subtractive hybridisation. **FEMS microbiology letters**, v. 251, n. 1, p. 105–12, 1 out. 2005.

CHEN, Y.; CADNAPAPHORNCHAI, M.; SCHRIER, R. Clinical update on renal aquaporins. **Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization**, v. 97, n. 6, p. 357–71, jun. 2005.

CUI, X.-H. et al. Expression of the ViciCui, X.-H., Hao, F.-S., Chen, H., Chen, J., & Wang, X.-C. (2008). Expression of the Vicia faba VfPIP1 gene in Arabidopsis thaliana plants improves their drought resistance. *Journal of Plant Research*, 121(2), 207–14. doi:10.1007/s1026. **Journal of plant research**, v. 121, n. 2, p. 207–14, mar. 2008.

CUNHA, W. G. et al. High resistance to Sclerotinia sclerotiorum in transgenic soybean plants transformed to express an oxalate decarboxylase gene. **Plant pathology**, v. 59, n. 4, p. 654–660, 2010.

DANA, M.; PINTOR-TORO, J.; CUBERO, B. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. **Plant physiology**, v. 142, n. 2, p. 722–30, out. 2006.

DIATCHENKO, L. et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 12, p. 6025, 1996.

DIXIT, P. et al. Enhanced tolerance and remediation of anthracene by transgenic tobacco plants expressing a fungal glutathione transferase gene. **Journal of hazardous materials**, v. 192, n. 1, p. 270–6, 15 ago. 2011.

EMANI, C. et al. Enhanced fungal resistance in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. **Plant Biotechnol J**, v. 1, n. 5, p. 321–36, 2003.

FRISCHMANN, A. et al. Self-assembly at Air / Water Interfaces and Carbohydrate Binding Properties of the Small Secreted Protein EPL1 from the fungus *Trichoderma atroviride* * □. **Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 6, p. 4278–4287, 2013.

FRÜHBECK, G. Obesity: aquaporin enters the picture. **Nature**, v. 438, n. 7067, p. 436–7, 24 nov. 2005.

GAO, Z. et al. Overexpressing a putative aquaporin gene from wheat, TaNIP, enhances salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Plant & cell physiology**, v. 51, n. 5, p. 767–75, maio 2010.

GRIGORIEV, I. V et al. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. **Nucleic acids research**, v. 40, n. Database issue, p. D26–32, 2012.

GROVE, A.; GOWTHAMAN, R. Strategies for development of fungus.pdf. **Current Science**, v. 84, n. 3, p. 330–341, 2003.

GRUBER, S. et al. Generation of *Trichoderma atroviride* mutants with constitutively activated G protein signaling by using geneticin resistance as selection marker. 2012.

GULLINO, M.; KUIJPERS, L. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. **Annual review of phytopathology**, v. 32, n. 1, p. 559–581, 1994.

HANSEN, G.; WRIGHT, M. S. Recent advances in the transaraformation of plants. **Trends in plant science**, v. 4, n. 6, p. 226–231, 1999.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 43–56, 2004.

HERMOSA et al. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 17–25, 2012.

HERMOSA, R. et al. The overexpression in *Arabidopsis thaliana* of a *Trichoderma harzianum* gene that modulates glucosidase activity, and enhances tolerance to salt and osmotic stresses. **Journal of plant physiology**, v. 168, n. 11, p. 1295–302, 15 jul. 2011a.

HERMOSA, R. et al. The overexpression in *Arabidopsis thaliana* of a *Trichoderma harzianum* gene that modulates glucosidase activity, and enhances tolerance to salt and osmotic stresses. **Journal of plant physiology**, v. 168, n. 11, p. 1295–302, 15 jul. 2011b.

HERNÁNDEZ-OÑATE, M. A et al. An injury-response mechanism conserved across kingdoms determines entry of the fungus *Trichoderma atroviride* into development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 37, p. 14918–23, 11 set. 2012.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant disease**, v. 87, n. 1, p. 3–10, 2003.

HUANG, X. et al. Suppression Subtractive Hybridization (SSH) and its modifications in microbiological research. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 76, n. 4, p. 753–760, 2007.

HUSSAIN, S. S. et al. Beyond osmolytes and transcription factors: drought tolerance in plants via protective proteins and aquaporins. **Biologia Plantarum**, v. 55, n. 3, p. 401–413, 24 jul. 2011.

HYNES, M. J. Genetic transformation of filamentous fungi. **Journal of Genetics**, v. 75, n. 3, p. 297–311, 1996.

ISLAM, A. PTC & B. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 117–138, 2006.

JANG, J. Y. et al. Transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants overexpressing an aquaporin respond differently to various abiotic stresses. **Plant molecular biology**, v. 64, n. 6, p. 621–32, ago. 2007.

KITAGAKI, H. et al. Ethanol-induced death in yeast exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway. **FEBS letters**, v. 581, n. 16, p. 2935–42, 26 jun. 2007.

KUBICEK, C. P. et al. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. **Genome biology**, v. 12, n. 4, p. R40, jan. 2011.

KUBICEK, C. P.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; DRUZHININA, I. S. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 9, n. 10, p. 753–63, out. 2008.

KUMAR, A. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Overlapping and distinct functions of two *Trichoderma virens* MAP kinases in cell-wall integrity , antagonistic properties and repression of conidiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 398, n. 4, p. 765–770, 2010.

KUMAR, V. et al. Defense-related gene expression and enzyme activities in transgenic cotton plants expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens* in response to interaction with *Rhizoctonia solani*. **Planta**, v. 230, n. 2, p. 277–91, jul. 2009.

LAIZÉ, V.; FERREIRA, M. C. J. DE; HOHMANN, S. Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport. In: **Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport**. [s.l: s.n.]. p. 415–421.

LATGÉ, J. P. Tasting the fungal cell wall. **Cellular microbiology**, v. 12, n. 7, p. 863–872, 2010.

LIÉNARD, D. et al. Water transport by aquaporins in the extant plant *Physcomitrella patens*. **Plant physiology**, v. 146, n. 3, p. 1207–18, mar. 2008.

LIU, M.; LIU, J.; WANG, W. Isolation and functional analysis of *Thmfs1*, the first major facilitator superfamily transporter from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. **Biotechnology letters**, v. 34, p. 1857–1862, 2012.

LIU, P.; YANG, Q. Identification of genes with a biocontrol function in *Trichoderma harzianum* mycelium using the expressed sequence tag approach. **Research in microbiology**, v. 156, n. 3, p. 416–423, 2005.

LIU, W.; YUAN, J.; STEWART, C. Advanced genetic tools for plant biotechnology. **Nature reviews. Genetics**, v. 14, n. 11, p. 781–93, nov. 2013.

LIU, Y.-B. et al. Physiological roles of mycothiol in detoxification and tolerance to multiple poisonous chemicals in *Corynebacterium glutamicum*. **Archives of microbiology**, v. 195, n. 6, p. 419–29, jun. 2013.

LIU, Z. et al. Expressed sequence tags-based identification of genes in a biocontrol strain *Trichoderma asperellum*. **Molecular biology reports**, v. 37, n. 8, p. 3673–81, dez. 2010.

LORITO, M. et al. Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. **Current genetics**, v. 24, n. 4, p. 349–56, out. 1993.

LORITO, M. et al. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 14, p. 7860–5, 7 jul. 1998.

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

LUU, D.-T.; MAUREL, C. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. **Plant, Cell and Environment**, v. 28, n. 1, p. 85–96, jan. 2005.

MACH, R.; ZEILINGER, S. Genetic transformation of Trichoderma and Gliocladium. In: **Trichoderma and Gliocladium**. [s.l.: s.n.]. p. 225–242.

MARTINEZ, D. et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus Trichoderma reesei (syn. Hypocrea jecorina). **Nature biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 553–60, maio 2008.

MARTINEZ-BALLESTA, M.; CARVAJAL, M. New challenges in plant aquaporin biotechnology. **Plant Science**, v. 217-218, p. 71–77, dez. 2013.

MASSART, S.; JIJAKLI, H. M. Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal biocontrol agents: a review. **Journal of microbiological methods**, v. 69, n. 2, p. 229–41, maio 2007.

MAUREL, C. et al. Molecular physiology of aquaporins in plants. **International review of cytology**, v. 215, p. 105–48, jan. 2002.

MEI, L. et al. Enhancing rice resistance to fungal pathogens by transformation with cell wall degrading enzyme genes. **Journal of Zhejiang University. Science.**, v. 5, n. 2, p. 133–136, 2004.

MENDOZA-MENDOZA, A. et al. Enhanced biocontrol activity of Trichoderma through inactivation of a mitogen-activated protein kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 26, p. 15965–70, 23 dez. 2003.

MENDOZA-MENDOZA, A. et al. The MAP kinase TVK1 regulates conidiation, hydrophobicity and the expression of genes encoding cell wall proteins in the fungus Trichoderma virens. **Microbiology (Reading, England)**, v. 153, n. Pt 7, p. 2137–47, jul. 2007.

MITRA, B. et al. Loss of a member of the aquaporin gene family, aqpA affects spore dormancy in Dictyostelium. **Gene**, v. 251, n. 2, p. 131–9, 2000.

MONTERO-BARRIENTOS, M. et al. Overexpression of a *Trichoderma* HSP70 gene increases fungal resistance to heat and other abiotic stresses. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 11, p. 1506–1513, 2008.

MONTERO-BARRIENTOS, M. et al. Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum* hsp70 gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses. **Journal of plant physiology**, v. 167, n. 8, p. 659–65, 15 maio 2010.

MORÁN-DIEZ, E. et al. The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*-plant beneficial interaction. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 22, n. 8, p. 1021–31, ago. 2009.

MUKHERJEE, M.; MUKHERJEE, P. K.; KALE, S. P. cAMP signalling is involved in growth, germination, mycoparasitism and secondary metabolism in *Trichoderma virens*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 153, n. Pt 6, p. 1734–42, jun. 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, jul. 1962.

PIMENTEL, D.; ZUNIGA, R.; MORRISON, D. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. **Ecological Economics**, v. 52, n. 3, p. 273–288, 2005.

POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R.; SILVA, J. F. A. F. **Principais doenças do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) no Para e recomendações de controle..** [s.l.] Belem: EMBRAPA-CPATU, 1994.

POZO, M. J. et al. Functional analysis of tvsp1, a serine protease-encoding gene in the biocontrol agent *Trichoderma virens*. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 41, n. 3, p. 336–48, mar. 2004.

PROMENEUR, D. et al. Aquaglyceroporin PbAQP during intraerythrocytic development of the malaria parasite *Plasmodium berghei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 7, p. 2211–6, 13 fev. 2007.

REITHNER, B. et al. Identification of mycoparasitism-related genes in *Trichoderma atroviride*. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4361–70, jul. 2011.

ROMÃO-DUMARESQ, A. S. et al. RNA interference of endochitinases in the sugarcane endophyte *Trichoderma virens* 223 reduces its fitness as a biocontrol agent of pineapple disease. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e47888, jan. 2012.

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

RUIZ-DÍEZ, B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. **Journal of applied microbiology**, v. 92, n. 2, p. 189–95, jan. 2002.

SAADOUN, S. et al. Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. **Nature**, v. 434, n. 7034, p. 786–92, 7 abr. 2005.

SADE, N. et al. Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SITIP2;2 a key to isohydric to anisohydric conversion? **The New phytologist**, v. 181, n. 3, p. 651–61, jan. 2009.

SADE, N. et al. The role of tobacco Aquaporin1 in improving water use efficiency, hydraulic conductivity, and yield production under salt stress. **Plant physiology**, v. 152, n. 1, p. 245–54, jan. 2010a.

SADE, N. et al. The role of tobacco Aquaporin1 in improving water use efficiency, hydraulic conductivity, and yield production under salt stress. **Plant physiology**, v. 152, n. 1, p. 245–54, jan. 2010b.

SAGERSTRÖM, C.; SUN, B.; SIVE, H. Subtractive cloning: past, present, and future. **Annual review of biochemistry**, v. 66, p. 751–83, jan. 1997.

SAIPRASAD, G.; MYTHILI, J.; ANAND, L. Development of *Trichoderma harzianum* endochitinase gene construct conferring antifungal activity in transgenic tobacco. **Ind J ...**, v. 8, n. April, p. 199–206, 2009.

SCHERM, B. et al. Identification of potential marker genes for *Trichoderma harzianum* strains with high antagonistic potential against *Rhizoctonia solani* by a rapid subtraction hybridization approach. **Current genetics**, v. 55, n. 1, p. 81–91, 2009.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787–99, jul. 2010a.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787–99, jul. 2010b.

SEIDL, V. et al. Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. **BMC genomics**, v. 10, p. 567, jan. 2009.

SELA-BUURLAGE, M. B. et al. Only Specific Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Chitinases and [beta]-1,3-Glucanases Exhibit Antifungal Activity. **Plant physiology**, v. 101, n. 3, p. 857–863, mar. 1993.

SHIBUYA, N.; MINAMI, E. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 59, n. 5, p. 223–233, nov. 2001.

SILVA, G. et al. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) provenientes do estado de Goiás. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 29–34, 2008.

SOUPENE, E. et al. Aquaporin Z of *Escherichia coli*: reassessment of its regulation and physiological role. **J Bacteriol**, v. 184, n. 15, p. 4304–7, 2002.

SRIYUDTHSAK, K.; SHIRAIISHI, F. Investigation of the performance of fermentation processes using a mathematical model including effects of metabolic bottleneck and toxic product on cells. **Mathematical biosciences**, v. 228, n. 1, p. 1–9, nov. 2010.

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

STUDART-GUIMARÃES, C.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A. C. M. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, v. 13, n. 1, 2010.

TANAKA, M. et al. NIP6;1 is a boric acid channel for preferential transport of boron to growing shoot tissues in *Arabidopsis*. **The Plant cell**, v. 20, n. 10, p. 2860–75, out. 2008.

TANGHE, A.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. Why do microorganisms have aquaporins? **Trends in microbiology**, v. 14, n. 2, p. 78–85, fev. 2006a.

TANGHE, A.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M. Why do microorganisms have aquaporins? **Trends in microbiology**, v. 14, n. 2, p. 78–85, fev. 2006b.

TÖRNROTH-HORSEFIELD, S. et al. Structural insights into eukaryotic aquaporin regulation. **FEBS Letters**, v. 584, n. 12, p. 2580–2588, 2010.

TOURNAS, V. H. Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. **Critical reviews in microbiology**, v. 31, n. 1, p. 33–44, jan. 2005.

TRUSHINA, N. et al. PacC and pH-dependent transcriptome of the mycotrophic fungus *Trichoderma virens*. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 138, jan. 2013.

VAN VOORST, F. et al. Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress. **Yeast (Chichester, England)**, v. 23, n. 5, p. 351–9, 15 abr. 2006.

VERMA, M. et al. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 1, p. 1–20, 2007.

VIEIRA, P. M. et al. Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma harzianum* during growth on cell wall of *Fusarium solani* as a tool for biotechnological application. **BMC genomics**, v. 14, n. 177, p. 177, jan. 2013.

VINALE, F. et al. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 1–10, jan. 2008.

VITERBO, A. et al. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1-4, p. 549–56, ago. 2002.

VIZCAÍNO, J. A. et al. Generation, annotation and analysis of ESTs from *Trichoderma harzianum* CECT 2413. **BMC genomics**, v. 7, p. 193, jan. 2006.

WANG, L.-L. et al. The *Thellungiella salsa* tonoplast aquaporin TsTIP1;2 functions in protection against multiple abiotic stresses. **Plant & cell physiology**, v. 55, n. 1, p. 148–61, jan. 2014.

ZEILINGER, S. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. **Current genetics**, v. 45, n. 1, p. 54–60, fev. 2004.

ZELAZNY, E. et al. FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 30, p. 12359–64, 24 jul. 2007.

ZHENG, D. et al. Construction of Novel *Saccharomyces cerevisiae* Strains for Bioethanol Active Dry Yeast (ADY) Production. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e85022, jan. 2013.

ZHOU, S. et al. Overexpression of the wheat aquaporin gene, TaAQP7, enhances drought tolerance in transgenic tobacco. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e52439, jan. 2012.