



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

Estudos de sinalização celular em *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) durante a expressão dos genes de celulase (*cbh1* e *cbh2*) em presença de celulose e soforose e durante o antagonismo contra *Pythium ultimum*

Roberto do Nascimento Silva

Orientador: Dr. Carlos Roberto Félix

Brasília 2008



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

Estudos de sinalização celular em *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) durante a expressão dos genes de celulase (*cbh1* e *cbh2*) em presença de celulose e soforose e durante o antagonismo contra *Pythium ultimum*

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília – UnB como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biologia Molecular

Candidato: Roberto do Nascimento Silva
Orientador: Dr. Carlos Roberto Félix

Brasília 2008

*De tudo ficam três coisas:
A certeza de que estamos sempre
começando...
A certeza de que precisamos
continuar...
A certeza de que seremos
interrompidos antes de terminar...
Portanto, devemos:
Fazer da interrupção um caminho
novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que ao lerem esse trabalho e se sentirem parte dele o meu muito obrigado!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Em primeiro, agradeço minha família: Mãe, Pai e irmãs pelo apoio incondicional em todos os momentos dessa caminhada.

Ao Prof. Cirano José Ulhoa pela sua privilegiada amizade e confiança, pois sem ele nenhuma das oportunidades que tive durante o mestrado e doutorado poderiam ter se concretizado.

Ao “pai” Cirano pelos seus ensinamentos e conselhos nas horas sempre certas e por me mostrar os caminhos do sucesso e ética.

Ao Prof. Félix pelo apoio e confiança na realização deste trabalho.

A professora Silvana Petrofeza por aceitar a co-orientação deste trabalho.

Ao Prof. Kubicek do Institute for Chemical Engineering, Vienna University of Technology pela oportunidade e pelos ensinamentos “ímpares” durante minha passagem por lá.

A Monika Schmoll pela orientação científica durante minha estada em Viena.

Ao Ítalo pelo seu companheirismo, carinho e amizade em todas as horas difíceis e alegres.

As minhas amigas Cinthia e Val por tudo de bom que já vivemos juntos e pelo que ainda vamos viver.

Ao meu amigo Prof. Eduardo Ramirez pela confiança e longa parceria.

A todos os amigos do laboratório de Enzimologia UFG pelas ajudas e discussões científicas e não científicas.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFG pela amizade e apoio nesses últimos anos.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular da UnB pelos ensinamentos e discussões durante a elaboração deste trabalho.

Aos amigos dos laboratórios de Biologia Molecular da UFG e UnB pela ajuda em experimentos diversos.

Aos professores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Rio Verde pelo apoio e amizade.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
SUMMARY	xv
INTRODUÇÃO.....	1
<i>O gênero Trichoderma</i>	1
<i>O controle biológico por Trichoderma</i>	3
<i>O sistema hidrolítico de Trichoderma</i>	5
<i>Celulose</i>	9
<i>O gênero Trichoderma e o sistema celulolítico</i>	10
<i>Formação de celulase por T. reesei</i>	15
<i>Regulação da expressão de genes de celulase em T. reesei</i>	19
<i>Vias de sinalização</i>	26
<i>Proteínas G</i>	28
OBJETIVOS	33
<i>Objetivo geral</i>	33
<i>Objetivos específicos</i>	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
MATERIAL	34
<i>Meios de cultura e soluções</i>	34
MÉTODOS	43
<i>Origem e manutenção do fungo</i>	43
<i>Bactéria hospedeira para propagação de vetor</i>	43
<i>Condições de cultura</i>	43
<i>Purificação da parede celular de P. ultimum</i>	44
<i>Preparação de DNA plasmidial</i>	44
<i>Pequena escala (Miniprep)</i>	44
<i>Média escala (Midprep)</i>	45
<i>Digestão do DNA com enzimas de restrição</i>	45
<i>Análise de DNA em gel de agarose</i>	45
<i>Ligação de fragmentos de DNA</i>	46
<i>Preparo de células de E. coli competentes para transformação</i>	46
<i>Transformação de células de E. coli</i>	46
<i>Amplificação do DNA por PCR</i>	47

<i>Clonagem do gene gna3 de T. reesei e construção do vetor pBgna3QL</i>	47
<i>Sequenciamento do fragmento gna3QL</i>	49
<i>Transformação de T. reesei</i>	49
<i>Extração do DNA total de T. reesei</i>	50
<i>Southern blot</i>	50
<i>Marcação e purificação de sonda radioativa</i>	51
<i>Pré-Hibridação e Hibridação</i>	51
<i>Revelação dos filmes auto-radiográficos</i>	52
<i>Caracterização dos transformantes positivos</i>	52
<i>Extração do RNA total de T. reesei</i>	52
<i>Quantificação de ácidos nucléicos</i>	53
<i>Northern blot</i>	53
<i>Extração e dosagem de AMPc</i>	54
<i>Determinação da atividade enzimática e dosagens de proteínas</i>	54
<i>Avaliação da atividade antagonista de T. reesei sobre P. ultimum</i>	56
<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	56
RESULTADOS	58
<i>Clonagem e caracterização do gene gna3 de T. reesei</i>	58
<i>Construção do vetor pBgna3QL</i>	60
<i>Análise por Southern blot dos transformantes de T. reesei com o vetor pBgna3QL</i>	63
<i>Caracterização dos transformantes e dosagem de AMPc</i>	67
<i>Avaliação da expressão dos genes de celulase cbh1 e cbh2 por Northern blot e avaliação da atividade enzimática</i>	68
<i>Análise da expressão de gna3 e outros genes reguladores de luz (blr1, blr2 e env1) por Northern blot</i>	73
<i>Análise da capacidade antagonista de TU-6 e gna3QL contra P. ultimum</i>	75
<i>Análise do conteúdo intracelular de AMPc</i>	76
<i>Avaliação da atividade das enzimas líticas induzidas por parede celular de P. ultimum</i>	77
DISCUSSÃO	85
CONCLUSÕES	91
PERSPECTIVAS	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXOS	110
<i>PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORAMENTO</i>	110
<i>TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS</i>	110
<i>Relacionados com a Tese</i>	110
<i>Outros Trabalhos</i>	111

<i>ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS</i>	112
<i>Relacionados com a tese</i>	112
<i>Outros Trabalhos</i>	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografia mostrando a interação entre <i>T. harzianum</i> e o hospedeiro <i>R. solani</i> (R) analisada por microscopia de varredura.	4
Figura 2. Esquema da estruturação da parede celular de fungos.....	6
Figura 3. Resíduos de celobiose na cadeia de celulose.	9
Figura 4. Representação esquemática dos domínios de celulasas	12
Figura 5. Mecanismo da hidrólise enzimática da celulose.....	15
Figura 6. Esquema da estrutura da região promotora de <i>cbh1</i> mostrando a localização dos sítios de ligação para alguns fatores de transcrição.	21
Figura 7. Esquema da estrutura da região promotora de <i>cbh2</i> mostrando a localização dos sítios de ligação para alguns fatores de transcrição.	24
Figura 8. Mecanismo de ação das proteínas G heterotriméricas.....	29
Figura 9. Representação esquemática da estratégia para obtenção do fragmento <i>gna3</i> QL	48
Figura 10. Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do gene <i>gna3</i>	60
Figura 11. Análise eletroforética em gel de agarose 1 % com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) dos produtos de PCR (A) e PCR mutagênica (B).	61
Figura 12. Análise eletroforética em gel de agarose 1 % com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) dos produtos da digestão com enzimas de restrição <i>Bam</i> HI e <i>Eco</i> RI/ <i>Xba</i> I.	62
Figura 13. Alinhamento da seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento <i>gna3</i> QL com a seqüência <i>Gna3</i> de <i>T. reesei</i>	63
Figura 14. Mapa de restrição do gene <i>gna3</i> e do vetor pB <i>gna3</i> QL mostrando o tamanho esperado dos fragmentos após a digestão com as enzimas <i>Eco</i> RI/ <i>Xba</i> I e <i>Hind</i> III.....	64

Figura 15. Análise por Southern blot do perfil de hibridação do DNA total dos transformantes de <i>T. reesei</i> digerido com <i>EcoRI/XbaI</i> (Painel A) e <i>HindIII</i> (painel B) e hibridados com a sonda <i>gna3QL</i>	66
Figura 16. Crescimento em placa (painel A) e em tubo (painel B) do mutante <i>gna3QL</i> e na linhagem parental TU-6.....	67
Figura 17. Concentração de AMPc na linhagem TU-6 e no mutante <i>gna3QL</i> ..	68
Figura 18. Análise da expressão dos genes de celulase, <i>cbh1</i> e <i>cbh2</i> , por Northern blot (painel A) após indução por celulose e quantificação por densitometria dos filmes radiográficos, gene <i>cbh1</i> (painel B) e <i>cbh2</i> (painel C).....	69
Figura 19. Atividade de celulase total (FPase) produzida pelo mutante <i>gna3QL</i> e pela linhagem parental TU-6 induzidos por celulose em presença constante de luz (25 μmol fótons. m^{-2} . s^{-1} ; 1800 lux) (A) e no escuro (B).	70
Figura 20. Análise da expressão dos genes de celulase, <i>cbh1</i> e <i>cbh2</i> , por Northern blot após indução por soforose.	72
Figura 21. Análise da expressão dos genes de celulase, <i>cbh1</i> e <i>cbh2</i> , por Northern blot em meio contendo glicerol e glicose.	73
Figura 22. Análise da expressão dos genes <i>gna3</i> (painel A) e <i>blr1</i> , <i>blr2</i> e <i>env1</i> (painel B), por Northern blot após indução por celulose.....	74
Figura 23. Fotografias do confronto direto em placa e microscopia eletrônica de varredura entre <i>T. reesei</i> (TU-6), <i>T. reesei</i> (<i>gna3QL</i>) and <i>T. harzianum</i> (ALL42) e <i>P. ultimum</i> , após 3 dias de inoculação.	76
Figura 24. Conteúdo intracelular de AMPc de <i>T. reesei</i> (TU-6), <i>T. reesei</i> (<i>gna3QL</i>) e <i>T. harzianum</i> (ALL42) após 72 horas de incubação com parede celular de <i>P. ultimum</i> como fonte de carbono em meio líquido.	77
Figura 25. Conteúdo de proteínas totais produzidas por <i>T. reesei</i> (TU-6 e <i>gna3QL</i>) e <i>T. harzianum</i> (ALL42) após 72 horas de indução por parede celular de <i>P. ultimum</i> em meio líquido.....	78

Figura 26. Atividade de celulase (FPase) produzida por <i>T. reesei</i> (TU-6 e <i>gna3QL</i>) e <i>T. harzianum</i> (ALL42) após 72 horas de indução por parede celular de <i>P. ultimum</i> em meio líquido.....	79
Figura 27. Atividade de endoquitinase produzida por <i>T. reesei</i> (TU-6 e <i>gna3QL</i>) e <i>T. harzianum</i> (ALL42) após 72 horas de indução por parede celular de <i>P. ultimum</i> em meio líquido.....	80
Figura 28. Atividade de NAGase produzida por <i>T. reesei</i> (TU-6 e <i>gna3QL</i>) e <i>T. harzianum</i> (ALL42) após 72 horas de indução por parede celular de <i>P. ultimum</i> em meio líquido.....	80
Figura 29. Atividade de β -1,3-glicanase produzida por <i>T. reesei</i> (TU-6 e <i>gna3QL</i>) e <i>T. harzianum</i> (ALL42) após 72 horas de indução por parede celular de <i>P. ultimum</i> em meio líquido.....	81
Figura 30. Atividade de protease produzida por <i>T. reesei</i> (TU-6 e <i>gna3QL</i>) e <i>T. harzianum</i> (ALL42) após 72 horas de indução por parede celular de <i>P. ultimum</i> em meio líquido.....	82
Figura 31. Atividade de lipase produzida por <i>T. reesei</i> (TU-6 e <i>gna3QL</i>) e <i>T. harzianum</i> (ALL42) após 72 horas de indução por parede celular de <i>P. ultimum</i> em meio líquido..	83
Figura 32. Atividade de fosfatase ácida produzida por <i>T. reesei</i> (TU-6 e <i>gna3QL</i>) e <i>T. harzianum</i> (ALL42) após 72 horas de indução por parede celular de <i>P. ultimum</i> em meio líquido.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades e organização estrutural das celulasas produzidas pelo <i>T. reesei</i> (Adaptado de: Miettinen–Oinonen, 2004).	13
Tabela 2. Genes de proteínas G α já clonados de fungos. Adaptado de Bolker (1998) e Schmoll (2008).	30
Tabela 3. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR.....	41

RESUMO

Trichoderma reesei (*Hypocrea jecorina*) é amplamente utilizado na indústria e seu potencial para o uso na agricultura como agente de controle biológico contra fungos fitopatogênicos começou a ser explorado recentemente. O gene *gna3* que codifica para uma proteína G α subgrupo III, ativadora de adenilato ciclase de *T. reesei*, foi clonado para o estudo do seu possível papel no controle da expressão de genes codificadores das celulases (*cbh1* e *cbh2*) por celulose e sofrorose. Bem como, na produção de enzimas que degradam parede celular (EDPCs), durante o antagonismo contra *Phytophthora ultimum*. A linhagem mutante de *T. reesei* que possui uma cópia modificada de *gna3* para expressão de uma versão da proteína GNA3 (*gna3QL*) que se mantém ativada exibiu elevado conteúdo intracelular de AMPc e uma diminuição na esporulação, mas sem afetar a taxa de crescimento vegetativo no escuro e um aumento de 20% dessa taxa em presença de luz. Consistente com o comportamento da linhagem selvagem, nenhuma transcrição de genes de celulase ocorre na ausência de indutor. Entretanto, o mutante mostra um aumento na transcrição de celulase em presença de celulose, mas somente em presença de luz. O nível de transcrição de celulase no escuro é similar o da linhagem parental TU-6. Por outro lado, quando sofrorose foi utilizada como indutor, transcritos de *cbh1* e *cbh2* tiveram nível mais alto de transcrição quando as culturas foram mantidas no escuro do que na presença de luz. A transcrição de *gna3* é aumentada em presença de luz. Todavia, genes conhecidamente regulados por luz, *blr1*, *blr2* e *env1* são igualmente transcritos no mutante *gna3QL* como no tipo selvagem. Durante o antagonismo contra *P. ultimum*, o mutante *gna3QL*, como a linhagem parental TU-6 inibiram o crescimento de *P. ultimum* no teste de confronto. O mutante *gna3QL* cresceu mais rápido do que a linhagem parental TU-6 nos primeiros 3 dias, mas cresceu mais devagar que o *T. harzianum* (ALL42). A microscopia eletrônica de varredura mostrou que o mutante *gna3QL* promoveu maiores alterações morfológicas na parede celular de *P. ultimum* do que a linhagem parental TU-6. O mutante *gna3QL* apresentou uma melhor performance na produção de EDPCs como endoquitinase (0,36 U. mL⁻¹), N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAGase) (2,62 U. mL⁻¹), β -1,3-glicanase (5 U. mL⁻¹), lipase (2,94 U. mL⁻¹) e fosfatase ácida (11,81 U. mL⁻¹), após 72 horas de incubação em meio líquido contendo parede celular de *P. ultimum* como fonte de carbono. Entretanto, a linhagem parental TU-6 apresentou uma maior atividade de celulase (10,3 U. mL⁻¹) do

que o mutante *gna3QL* (6,64 U. mL⁻¹) e nenhuma diferença significativa na atividade de protease entre as duas linhagens foi observada. Os resultados mostram que GNA3 está envolvida na regulação da expressão de genes de celulase (*cbh1* e *cbh2*) por celulose e este processo é dependente de luz. Além disso, a produção de algumas EDPCs durante o micoparasitismo por *T. reesei* contra *P. ultimum* pode estar associada com a atividade de GNA3 e/ou com o aumento intracelular dos níveis de AMPc.

SUMMARY

Trichoderma reesei (*Hypocrea jecorina*) is widely used in industry and its potential for use in agriculture as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi has just begun to be explored. The adenylate cyclase activating subgroup III G α protein-encoding gene *gna3* of *T. reesei* was cloned to study its possible role in the control of cellulose and sophorose to cellulase (*cbh1* and *cbh2*) gene expression as well in production of cell wall-degrading enzymes (CWDEs) during antagonism against *Pythium ultimum*. A mutant strain of *T. reesei* bearing a modified copy of *gna3* for expression of a kept activated version of GNA3 protein (*gna3QL*) exhibits elevated intracellular cAMP levels and decreased sporulation, but was unaffected in its growth rate in dark and an increase in this rate of about 20% in light. Consistent with the behavior of the wild-type strain, no cellulase transcription occurs in this mutant in the absence of an inducer. However, the mutant shows an increase in cellulase transcription in presence of cellulose, but only in the presence of light. Cellulase transcription level in the dark is similar to the parent strain. On the other hand, when sophorose was used as inducer, transcript levels of *cbh1* and *cbh2* were higher when cultures were kept in the dark than in presence of light. The transcription of *gna3* is increased in the presence of light. Nevertheless the light regulatory genes *blr1*, *blr2* and *env1* are transcribed similarly in the *gna3QL* mutant as in the wild-type. During antagonism against *P. ultimum*, the mutant *gna3QL*, like the parental TU-6 strain, inhibited the growth of *P. ultimum* in dual culture assay. The mutant *gna3QL* grew faster than the parental TU-6 strain within the first 3 days but grew more slowly than the *T. harzianum* (ALL42). Scanning electron microscopy showed that the mutant *gna3QL* promoted more morphological alterations of *P. ultimum* cell wall after interaction than the parental TU-6 strain. The mutant *gna3QL* showed a better performance in production of CWDEs such as endochitinase (0.36 U. mL⁻¹), N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) (2.62 U. mL⁻¹), β -1,3-glucanase (5 U. mL⁻¹), lipase (2.94 U. mL⁻¹) and acid phosphatase (11.81 U. mL⁻¹), after 72 hours of incubation in liquid medium containing *P. ultimum* cell wall as the carbon source. However, the parental TU-6 strain showed higher cellulase activity (10.3 U. mL⁻¹) than the mutant *gna3QL* (6.64 U. mL⁻¹) and no significant difference was observed in protease activity between the two strains. The results showed that GNA3 is involved in light-regulated cellulase gene expression (*cbh1* and *cbh2*) on cellulose. Furthermore, the production of some CWDEs during

mycoparasitism by *T. reesei* against *P. ultimum* can be associated with GNA3 activity and/or increase in intracellular cAMP levels.

INTRODUÇÃO

O gênero *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* (*Ascomycetes*, *Hypocreales*) foi descrito por Persoon há mais de 200 anos atrás (Rifai, 1969) e consiste de fungos anamórficos que habitam principalmente o solo, matéria orgânica e árvores em decomposição (Samuels, 1996; Gams e Bisset, 1998). Espécies de *Trichoderma* estão dentre os fungos mais comumente distribuídos na natureza e podem ser encontrados em ecossistemas que variam desde tundra até o tropical (Samuels, 1996). Essa capacidade de sobrevivência em regiões tão diferentes pode ser atribuída a sua capacidade metabólica diversificada e sua agressividade natural competitiva (Klein e Eveleigh, 1998).

Isolados de *Trichoderma* podem ser reconhecidos por suas características, tais como rápido crescimento em cultura, produção de numerosos esporos (conídios), os quais comumente são verdes e micélio aéreo (Bissett, 1991). Apesar de suas características macroscópicas serem facilmente reconhecidas, este gênero carece de um conceito de espécie mais definido, em virtude de variações dentro e entre grupos de espécies, as quais foram definidas por Rifai como espécies agregadas (Rifai, 1969). Além disso, a maioria dos isolados de *Trichoderma* não são encontrados associados com seus estágios sexuais (teleomorfos), sendo considerados fungos de reprodução clonal (mitóticos) (anamorfos). Esta aparente ausência de sexualidade constitui-se em uma barreira ainda maior para a melhor compreensão das inter-relações dentro e entre espécies deste gênero (Samuels, 1996). Os teleomorfos conhecidos de *Trichoderma* estão incluídos em três gêneros afins de ascomycetos: *Hypocrea* Fr., *Podostroma* Karst. e *Sarawakus* Boedijn (Gams e Bisset, 1998). Samuels (2004), entretanto, baseado em evidências moleculares, considera o gênero *Hypocrea* (*Ascomycota*) como sua única conexão teleomórfica. A maioria dos anamorfos de *Hypocrea* estudados enquadram-se no gênero *Trichoderma*, sendo que alguns isolados agrupados na mesma espécie por Rifai (1969) poderiam ser conectadas a mais de um desses teleomorfos (Bissett, 1984). Desta maneira, obviamente que as espécies de *Trichoderma* provenientes de diferentes teleomorfos são geneticamente distintas; embora suas características morfológicas não sejam suficientes para diferenciá-las (Bissett, 1984). Assim, o principal problema é definir os limites para espécies individuais e delinear um sistema eficiente para

distinguir espécies geneticamente heterogêneas, porém fenotipicamente similares (Bissett, 1984; Samuels e Rehner, 1993).

A taxonomia *Trichoderma* é um tanto difícil e complexa devido à plasticidade dos caracteres analisados. O uso de marcadores moleculares tais como análise do DNA ribossômico tem apresentado resultados bastante confiáveis e vem esclarecendo diferentes questões, antes limitadas pela estrita utilização da morfologia e análises bioquímicas (Bruns et al., 1991). Embora certas regiões específicas como ITS1, ITS2 e 5.8S sejam predominantes em diversos estudos taxonômicos e filogenéticos, observou-se que devido à alta conservação desta região, em alguns casos sua análise comparativa não tem resolvido a taxonomia de espécies muito próximas. Em função disto, atualmente, certos genes codificadores de proteínas como o fator EF1 (translation-elongation), quitinases (*chit42*), proteases (*pbr1*), calmodulina, actina, e a subunidade II da RNA polimerase, também têm sido utilizados, isolada ou conjuntamente, em trabalhos de reconstrução filogenética (Samuels, 2004; Druzhinina et al., 2005). Atualmente novas ferramentas vêm sendo desenvolvidas no sentido de refinar a taxonomia de *Trichoderma* baseadas na comparação de novos marcadores moleculares e na metabolização diferenciada de fontes de carbono, também conhecido como “biolog” (Druzhinina et al., 2006).

Trichoderma spp. possuem um grande número de mecanismos para sobrevivência e proliferação incluindo ataque físico a outros fungos e degradação e utilização de carboidratos complexos (Harman et al., 2004). Devido a essas características esses fungos são de grande interesse econômico e são usados em aplicações comerciais. *T. reesei* (*H. jecorina*) é economicamente um importante produtor de celulasas e hemicelulasas e também é usado para expressão heteróloga de proteínas (Kubicek e Penttila, 1998). *H. lixi* (= *T. harzianum*), *H. atroviridis* (= *T. atroviride*) e *T. asperellum* são aplicados como agentes de controle biológico contra fungos fitopatogênicos em uma grande variedade de grãos e climas (Benítez et al., 2004). Entretanto, existem também efeitos negativos causados por *Trichoderma*; devido à sua alta atividade celulolítica eles degradam algodão de fábricas; isolados de *T. aggressivum* são patogênicos para alguns fungos comerciais, como *Agaricus* e *Pleurotus* (Seaby, 1998) e mais recentemente, *T. longibrachiatum* foi reportado como sendo um patógeno oportunista em mamíferos imunocomprometidos, incluindo seres humanos (Kredics et al., 2003).

O controle biológico por *Trichoderma*

O potencial das espécies do gênero *Trichoderma* como agentes de controle biológico de plantas doentes foi reconhecido primeiramente por Weindling no começo da década de 1930 (Weindling, 1934) que descreveu a ação micoparasítica de *Trichoderma* em *Rhizoctonia* e *Sclerotinia* e seus efeitos benéficos no controle da patologia da planta. Isso estimulou várias pesquisas nessa área e hoje algumas espécies vêm sendo utilizadas com sucesso, inclusive comercial, no controle biológico de fungos fitopatógenos de interesse na agricultura. O controle destes fitopatógenos pode ocorrer por vários mecanismos, dentre os quais os mais relevantes são: competição por nutrientes, produção de antibióticos voláteis e não voláteis e produção de enzimas hidrolíticas. O mecanismo que envolve a ação de enzimas hidrolíticas é denominado micoparasitismo (Haran et al., 1996). O micoparasitismo pode ser de dois tipos; necrótrófico, que resulta na morte do hospedeiro; e biotrófico, em que o desenvolvimento do parasita é favorecido pela manutenção da vida do hospedeiro (Barnett e Binder, 1973).

Este mecanismo ocorre por eventos seqüenciais, que vão desde o reconhecimento e contato com o hospedeiro, até expressão de genes específicos (Vasseur et al., 1995). Inicialmente, o micoparasita apresenta uma ramificação em direção ao hospedeiro até que ocorra o contato, seguido do enrolamento na hifa do hospedeiro (Figura 1).

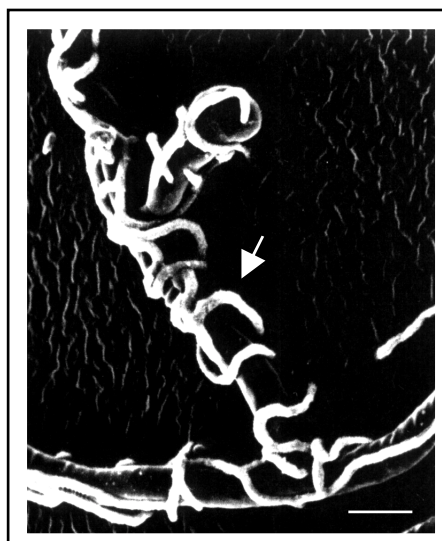


Figura 1. Fotomicrografia mostrando a interação entre *T. harzianum* e o hospedeiro *R. solani* (R) analisada por microscopia de varredura. A seta indica o enrolamento do *T. harzianum*. Fonte: Almeida et al. (2007).

Após este contato segue-se a formação de estruturas em forma de gancho e estruturas semelhantes a apressórios, que ajudam na penetração na parede celular da hifa hospedeira. O mecanismo de reconhecimento e enrolamento ainda não é totalmente conhecido, mas existem indicativos do envolvimento de lectinas e de fatores difusíveis nestes processos (Inbar & Chet, 1992; Kulling et al., 2000). Diferentes tipos de lectinas que diferem com relação aos resíduos glicosídicos aos quais se ligam, têm sido isoladas da parede celular de *Sclerotium rolfii* e *Rhizoctonia solani* (Elad et al., 1983).

O passo seguinte ao crescimento do *Trichoderma* spp. em torno do hospedeiro é a degradação e lise da parede celular, por produção de enzimas hidrolíticas. Essa etapa inicia o processo degradativo que consiste na desorganização da parede celular, seguida de desequilíbrio osmótico, retração do plasma e membrana e agregação do citoplasma (Haran et al., 1996). Entretanto, dados recentes demonstram que a interação entre um micoparásita e seu hospedeiro é muito mais complexa, pois também envolvem mecanismos, não elucidados, de sinalização celular com participação de proteínas G (Rocha-Ramirez et al., 2002; Mukherjee et al., 2004; Reithner et al., 2005; Zeilinger et al., 2005), proteínas quinases (Reithner et al., 2007) e de moléculas sinalizadoras tais como AMP cíclico (Omero et al., 1999).

Como agente de biocontrole *T. harzianum* tem sido a espécie mais estudada, embora outras como *T. koningii*, *T. viride*, *T. hamatum*, *T. virens* e *T. pseudokoningii* também venham sendo isoladas e analisadas com esse propósito. O sucesso maior com o uso de *Trichoderma* tem sido documentado para patógenos de solo, como: *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium spp.* e *Pythium spp* (Benitez et al., 2004).

O gênero *Pythium* é biologicamente e ecologicamente diverso e diferem dos fungos verdadeiros (Eumycotas) por serem diplóides, apresentarem reprodução assexuada e por possuírem β -1,3-glicana, β -1,6-glicana e celulose ao invés de quitina como maior componente da parede celular (Blaschek et al., 1992). A maioria das espécies de *Pythium* são saprofitos, fitopatógenos facultativos e algumas espécies parasitam insetos (Benhamou e Chet, 1997)

Espécies do gênero *Pythium* estão entre os patógenos de solo mais agressivos, causando grandes perdas na produtividade de grãos por atacar raízes e sementes das plantas (Whipps e Lumsden, 1991). Apesar de alguns experimentos em laboratório (Whipps e Lumsden, 1991) e em casa de vegetação (Seidl et al., 2006) ter demonstrado a habilidade de *Trichoderma* sp. em antagonizar *Pythium* sp., uma explicação clara para o esse mecanismo ainda não foi proposto. Tem sido especulado que glucanases e celulases possuem um papel importante nesse processo (Benhamou e Chet, 1997). Entretanto, recentemente Seidl et al. (2006) demonstraram que o antagonismo de *P. ultimum* por *T. reesei* não necessita da expressão de genes de celulase e que esse processo é melhorado por desrepressão catabólica por fonte de carbono. Esses dados sugerem que o mecanismo de antagonismo contra *Pythium* sp. por *Trichoderma* sp. pode ser mais complexo do que se imagina.

O sistema hidrolítico de *Trichoderma*

Trichoderma spp. produzem uma série de enzimas para a degradação de homo e heteropolissacarídeos, as quais são importantes para sua sobrevivência. A constituição da parede celular dos fitopatógenos é uma característica importante para indução de enzimas hidrolíticas. A parede celular dos fungos é uma estrutura complexa composta por 80 a 90% de carboidratos (polissacarídeos em sua maioria) como glicanas, quitina, celulose, mananas e outros, e 10 a 20% de proteínas, lipídeos, íons orgânicos e

pigmentos (Elad et al., 1985). A estruturação da parede celular de fungos é mostrada na figura 2.

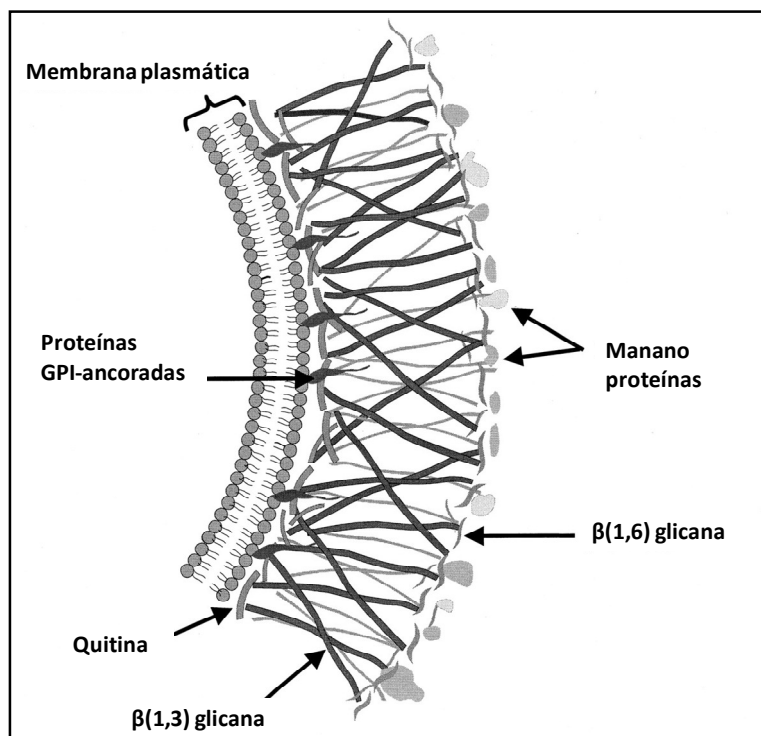


Figura 2. Esquema da estruturação da parede celular de fungos. Adaptado de: Ruiz-Herrera (1992).

Fungos do gênero *Trichoderma*, principalmente *T. harzianum*, são produtores das enzimas β -1,3/1,6-glicanases, quitinases e N-acetilglicosaminidase (Haran et al., 1996). Dentre as enzimas hidrolíticas produzidas por *Trichoderma harzianum*, aquelas pertencentes ao sistema quitinolítico e as β -1,3-glicanases são as mais estudadas (revistas por Kubicek et al., 2001).

A quitina é um polímero linear insolúvel formado por unidades de β -1,4-N-acetilglicosamina (GlcNAc), encontrada em diferentes organismos. As enzimas quitinolíticas podem ser divididas em duas classes, endo e exo, baseadas em suas reações e nos produtos formados, revisto por Kubicek *et al.* (2001). Assim, as **endoquitinases** (EC 3.2.1.14) clivam o polímero de quitina e quitoligômeros randomicamente e liberam uma mistura de produtos solúveis de baixa massa molecular de diferentes tamanhos com diacetilquitobiose como o primeiro produto a ser formado. As **exoquitinases**, ou quitina 1,4-quitobiosidase, clivam a quitina e quitoligômeros

[(GlcNAc)_n; n>3] progressivamente da extremidade não redutora e libera somente quitobiose (GlcNAc)₂ como produto final. As ***β-N-acetilglicosaminidases*** (EC 3.2.1.30) clivam o polímero de quitina e quitoligômeros progressivamente da extremidade não redutora e libera somente N-acetilglicosamina (GlcNAc) como produto final. São as únicas enzimas capazes de hidrolisar quitobiose (GlcNAc)₂.

A identificação, clonagem e expressão de vários genes de quitinases de *T. harzianum* já foram descritos por alguns grupos e revistos por Kubicek et al. (2001). Estudos da regulação da expressão destas enzimas mostraram que de uma forma geral elas são induzidas quando *T. harzianum* cresce na presença de parede celular de fungos fitopatogênicos ou quitina, e são reprimidas por açúcares facilmente metabolizados (Ulhoa & Peberdy, 1993; Haran et al., 1995; De La Cruz et al. 1995; Inbar & Chet, 1995).

As enzimas denominadas ***β-1,3-glicanases*** produzidas por *T. harzianum* também possuem papel importante mecanismo de micoparasitismo, uma vez que atuam na hidrólise das β-1,3-glicanas, presentes na parede celular de alguns fitopatógenos (Pitson et al., 1993). As β-1,3-glicanases foram classificadas de acordo com os produtos de hidrólise em ***exo-β-1,3-glicanases*** (EC 3.2.1.58) e ***endo-β-1,3-glicanases*** (EC 3.2.1.39) (Pitson et al., 1993). As *exo-β-1,3-glicanases* hidrolisam as β-1,3-glucanas pela clivagem a partir da extremidade não redutora da glicana gerando como principal produto glicose, gentobiose e outros oligossacarídeos. Enquanto que as *endo-β-1,3-glicanases* clivam o substrato aleatoriamente ao longo da cadeia liberando principalmente oligossacarídeos.

Apesar de serem menos abundantes do que as β-1,3-glicanases, *Trichoderma* spp. também são capazes de produzir ***β-1,6-glicanases*** e ***α-1,3-glicanases*** e os dados de literatura mostram que estas também estão envolvidas no processo de micoparasitismo (Montero et al., 2005; Sanz et al., 2005). Muitas β-1,3, β-1,6 e α-1,3 foram isoladas e caracterizadas e alguns genes clonados como *bgn13.1*, *bgn16.2* e *lam1.3* de *T. harzianum*, *glu78* de *T. atroviride*, *lamA1* (que codifica a *endo-β(1,3-1,6)-glicanase*), *Tv-bgn2* de *T. virens* (Benítez et al., 2004; Martin et al., 2007) e *tag83* de *T. asperellum* (Marcello et al., 2008) e duas α-1,3-glicanases, *agn13.1* e *agn13.2* de *H. lixii* (Sanz et al., 2005).

Outra classe de enzimas que tem recebido uma maior atenção são as ***proteases***. Estas enzimas constituem uma grande família (EC 3.4), dividida em ***endopeptidases*** ou

proteínases (EC 3.4. 21-99) e **exopeptidases** (EC 3.4.11-19), de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica. As endopeptidases podem ser ainda subdivididas de acordo com o grupo reativo no sítio ativo envolvido com a catálise em **serina-** (EC 3.4.21), **cisteína-** (EC 3.4.22), **aspártico-proteínases** ou **endopeptidases** (EC 3.4.23) e **metalloproteínases** ou **metalloendopeptidases** (EC 3.4.24) (Rao et al., 1998).

O estudo do sistema proteolítico de *Trichoderma* e sua contribuição no controle biológico têm aumentado bastante nos últimos anos. Elad e Kapat (1999) mostraram que enzimas hidrolíticas produzidas por *B. cinerea* foram parcialmente desativadas por ação das proteases produzidas por *H. lixii* e que sobrenadante de cultura de *Trichoderma* contendo proteases foram capazes de reduzir a germinação de fitopatógenos. Assim, as proteases de *Trichoderma* podem ser importantes no processo de micoparasitismo pela degradação dos componentes da parede celular do hospedeiro (De Marco e Felix, 2002). Proteases produzidas por *T.virens* mostraram similaridade com serino peptidases que aumentam a resposta de defesa de plantas contra patógenos (Suárez et al., 2007). Além disso, proteases de espécies de *Trichoderma* vêm sendo associadas ao biocontrole de nematóides como *Meloidogyne javanica* em tomateiro (Howel, 2003).

Alguns genes que codificam para proteases foram clonados e caracterizados e experimentos de deleção de alguns desses genes têm mostrado a relevância de proteases no biocontrole. Um gene que codifica uma serina peptidase família S8 (*prb1*) foi inicialmente clonado e caracterizado de *T. atroviride* e mais tarde de *T. virens* (*tvsp1*) e *T. hamatum* (*prb1*) (Suarez et al., 2005).

As **celulases** (β -1,4-glicanases) degradam o polímero de celulose de várias formas e compreendem as exoglicanases (celobiohidrolases EC 3.2.1.91), endoglicanases (EC 3.2.1.4) e β -glicosidase (EC 3.2.1.21), as quais ocorrem em várias isoformas e suas características serão discutidas adiante. Apesar de a celulose ser o maior constituinte da parede celular dos oomicetos como *Pythium*, celulases não tem sido estudadas em maiores detalhes como parte de controle biológico (Migheli et al., 1998). Entretanto, o sistema celulolítico de *Trichoderma* tem sido estudado extensivamente com interesse industrial (revisto por Schmoll e Kubicek, 2003).

Outra classe importante de enzimas de *T. reesei*, devido a sua aplicação na indústria de papel e ração, são as **xilanases** (Burchert et al., 1998). Essas enzimas são capazes de hidrolisar o polímero de xilana, um heteropolissacarídeo formado por

resíduos de xilopiranosil ligados por ligações β -1,4. Este grupo de enzimas inclui as endoxilanases (EC 3.2.1.8), uma endo-enzima que hidrolisa aleatoriamente ligações glicosídicas do tipo β -1,4 dentro da cadeia de hemicelulose (na cadeia principal de xilana) liberando xilo-oligossacarídeos e β -xilosidases (EC 3.2.1.91) que hidrolisam os xilo-oligômeros de baixa massa molecular resultantes da degradação da xilana pelas endoxilanases (Burchert et al., 1998).

Outras enzimas hidrolíticas como *galactosidases*, *pectinases* e *manosidases* dentre outras, estão sendo estudadas em *Trichoderma*, principalmente em *T. reesei*, devido suas aplicações industriais. Espera-se que mais enzimas sejam caracterizadas e seus genes clonados, principalmente pelo fato de que a sequência do genoma de *T. reesei* está disponibilizada publicamente desde o ano de 2005 (<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>).

Celulose

A celulose é um homopolímero cristalino e insolúvel formado por unidades de glicose interligados por ligações glicosídicas do tipo β 1 \rightarrow 4 e constituem uma parte significativa na biomassa existente na terra. A menor unidade de celulose é a celobiose que consiste de duas unidades de glicose (Figura 3). Na natureza, as cadeias de glicose têm um grau de polimerização (DP) de aproximadamente 10.000 unidades de glicose na celulose de madeira e 15.000 unidades em fibra de algodão nativo (Sjöström, 1987).

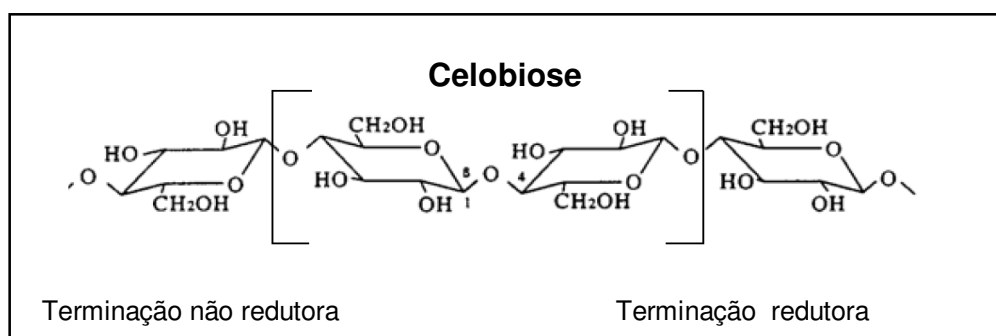


Figura 3. Resíduos de celobiose na cadeia de celulose. Fonte: Gama, 1996.

A celulose apresenta uma estrutura química relativamente simples, mas não é um biopolímero facilmente degradável. Seus filamentos se encontram unidos formando microfibrilas cristalinas, estabilizadas por pontes de hidrogênio e de *van der waals* formando estruturas altamente insolúveis (Miettinen–Oinonen, 2004).

A celulose pode ser definida em termos de estrutura em três níveis organizacionais (Terri, 1997). O primeiro é definido pela seqüência de ligações covalentes, correspondendo a um homopolímero de anidroglicose com ligações β -1,4. O segundo nível representa a conformação molecular, com a organização espacial das unidades repetitivas, e é caracterizado pelas distâncias de suas ligações e ângulos, e pelas ligações de hidrogênio intramoleculares. O terceiro nível define a associação das moléculas formando agregados com uma determinada estrutura cristalina (Miettinen–Oinonen, 2004).

O gênero *Trichoderma* e o sistema celulolítico

Espécies de fungos do gênero *Trichoderma* são saprófitos. Na natureza estes fungos encontram uma grande variedade de polissacarídeos naturais, dentre os quais a celulose. O *T. reesei* é o degradador mais proeminente do gênero *Trichoderma*. Isolado originalmente no pacífico sul (Ilhas Salomão) durante a Segunda Guerra Mundial, onde foi observada a degradação por esses fungos de tecidos de algodão, barracas e cintos. Deste então este fungo foi reconhecido como um produtor potencial industrial de celulasas.

O complexo celulolítico secretado pelo *T. reesei* é o mais estudado em toda a literatura e, como consequência, muitos detalhes sobre o seu modo de ação são conhecidos atualmente (Miettinen–Oinonen, 2004). O sistema deste fungo é constituído por pelo menos três tipos diferentes de enzimas: exoglicanases (celobiohidrolases EC 3.2.1.91), endoglicanases (EC 3.2.1.4) e β -glicosidase (EC 3.2.1.21), as quais ocorrem sob várias isoformas (Saloheimo et al., 1997)

O *T. reesei* secreta pelo menos seis tipos de endoglicanases (EGI, EGII, EGIII, EGIV, EGV e EGVI) que diferem em massa molecular e ponto isoelétrico (pI). A EG I é a endoglucanase produzida em maior quantidade pelo *T. reesei*, chegando a cerca de 5% do total de proteínas liberadas no meio de cultura, enquanto a EG II chega a 0,5% e

as endoglicanases restantes (EG III, IV e V) apresentam-se como componentes minoritários (Saloheimo et al., 2002).

Dois tipos de celobiohidrolases (CBH I e CBH II) já foram identificadas no complexo celulolítico secretado por *T. reesei* (Terri, 1997). Estas exoglicanases são produzidas em maior quantidade do que as outras enzimas celulolíticas do complexo. A CBH I responde por cerca de 60% do total de proteínas liberadas no meio de cultura, enquanto que a CBH II chega a 20% (Miettinen–Oinonen, 2004).

As β -glicosidase, também denominadas celobiasas, possuem a função de desdobrar a celobiose gerada pelas celobiohidrolases e endoglicanases em glucose. Estritamente falando, β -glicosidase não são celulasas legítimas, uma vez que elas agem sobre substratos solúveis, mas sua contribuição é muito importante para a eficiência da hidrólise da celulose pela remoção da celobiose do meio reacional, que é um potente inibidor competitivo das celobiohidrolases (Miettinen–Oinonen, 2004). Em *T. reesei* já foram descritas duas β -glicosidase BGLI e BGLII, sendo que essa última além de hidrolizar celobiose, também possui ação de transglicosilação (Saloheimo et al., 2002).

As celulasas produzidas pelo *T. reesei*, assim como as produzidas pela maioria dos fungos filamentosos, são constituídas por dois domínios, funcionais e estruturalmente distintos. O domínio catalítico que constitui a maior parte da proteína e um domínio responsável pela ligação da enzima ao substrato designado por CBM (módulo de ligação a carboidrato). Os dois domínios estão ligados por uma seqüência altamente glicosilada (“linker”) (Figura 4).

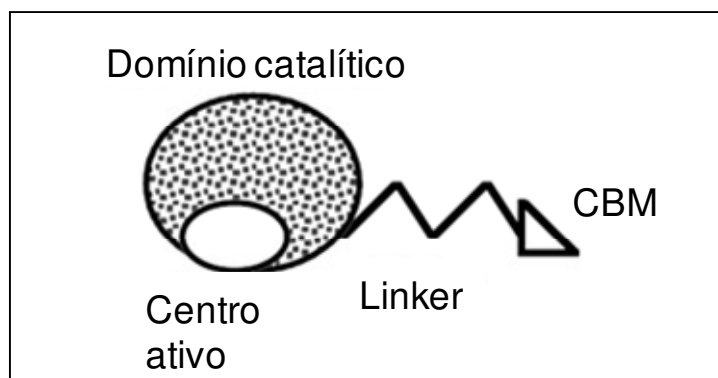


Figura 4. Representação esquemática dos domínios de celulases (Cavaco-Paulo, 1995).
CBM = Módulo de ligação a carboidrato.

A classificação das celulases se baseia na similaridade da seqüência de aminoácidos do domínio catalítico e com base no modo de catálise sobre a fibra de celulose.









Endoglicanases (EC 3.2.1.4) (EG) – A hidrólise pelas endoglicanases ocorre na maioria em ligações internas no polímero da celulose, produzindo novas cadeias terminais, logo causam uma diminuição considerável no DP da celulose (Heikinheimo e Buchert, 2001; Wood, 1989). As endoglicanases são também denominadas como celulases, endo- β -1,4-glicanases e carboximetilcelulases. Seu substrato natural é a celulose e xiloglicana, apresentando especificidade variável sobre carboximetilcelulose (CMC), Avicel (celulose cristalina), β -glucana e xilana (Wood, 1989).




β -1,4-Celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) (CBH) - As enzimas denominadas também como exoglicanase, celobiohidrolases, ou Avilcelase, catalisam a hidrólise de ligações β -1,4-D-glicosídicas na celulose e celotetraose, liberando celobiose das extremidades redutoras das cadeias (Becker et al., 2001). A hidrólise da exoglicanases se inicia na extremidade da cadeia e nas extremidades geradas pelas endoglicanases e não produzem uma quantidade significativa de novas cadeias terminais na superfície da celulose (Heikinheimo e Buchert, 2001). Os domínios CBHI e CBHII quebram as unidades de celobiose das extremidades redutora e não redutora do polímero, respectivamente (Heikinheimo e Buchert, 2001). As celobiohidrolases atuam nas regiões cristalinas da celulose sem o auxílio das endoglicanases (Heikinheimo e Buchert, 2001).

β -glicosidase (EC 3.2.1.21) (BG) – As β -glicosidases são conhecidas como gentobiase, celobiase e amígdalase. Catalisa a hidrólise de resíduos β -D-glicose

terminais não redutores, oligômeros, entre esses a celobiose liberada por CBH liberando β -D-glicose. Apresenta ampla especificidade por β -D-glicosídeos, podendo hidrolisar também β -D-galactosídeos, α -L-arabinosídeos, β -D-xilosídeos e β -D-fucosídeos (Miettinen–Oinonen, 2004). Muitas β -glicosidases têm sido identificadas com atividade de transglicosilação na presença de glicose e celobiose (Saloheimo et al., 2002).

Tabela 1. Propriedades e organização estrutural das celulasas produzidas pelo *T. reesei* (Adaptado de: Miettinen–Oinonen, 2004).

Enzima	Aminoácidos	Massa molecular (kDa)	Ponto isoelétrico (pI)	Organização estrutural
EG I	437	50 – 55	4,6	 368 33 36
EG II	397	48	5,5	 36 34 327
EG III	218	25	7,4	 218
EG IV	326	37	--	 233 56 37
EG V	225	23	2,8 – 3	 166 23 36
EG VI	838	75 – 105	4,1-4,3	 810 28
CBH I	497	59 – 68	3,5 – 4,2	 430 31 36
CBH II	447	50 - 58	5,1 – 6,3	 36 44 365
CEL3A/BGLI	744	75	ND	ND
CEL1A/BGLII	466	52	ND	ND

 Domínio catalítico;
 Linker
 CBD
 ND Não determinado

O modelo de Elwyn Reese explica a ação das celulasas que se baseia na hipótese C_1-C_X , onde para ocorrer degradação da celulose cristalina, um fator denominado C_1 , presente no complexo enzimático, mas sem atividade hidrolítica, disponibilizaria substratos para ação catalítica de um fator denominado C_X (Mandels e Reese, 1960). Fungos com ausência desse fator C_1 seriam capazes de apenas degradar formas derivadas de celulose solúveis, como a carboximetilcelulose. Dessa forma, para que a celulose possa ser degradada, as celulasas, devem não apenas desencadear hidrólises, mas também devem reduzir as estruturas cristalinas do polímero, por meio do rompimento de pontes de hidrogênio, as quais ligam as microfibrilas (Heikinheimo et al., 2001).

As enzimas do complexo celulolítico de *T. reesei* atacam o substrato de uma forma sinérgica fazendo com que a velocidade de formação de produtos solúveis aumente significativamente quando comparado à velocidade de ação isolada das enzimas (Miettinen–Oinonen, 2004). Endoglicanases hidrolisam as ligações internas nas regiões mais acessíveis (amorfas) da celulose gerando novas extremidades livres. Celobiohidrolases conseguem penetrar nas regiões cristalinas das microfibrilas degradando o polímero de celulose a partir das extremidades geradas pelas endoglicanases. As β -glicosidades complementam a degradação clivando os celooligosacarídeos e celobiose gerados pelas celobiohidrolases (Teeri, 1997). As celobiohidrolases são capazes de atuar muito rapidamente em uma extremidade gerada pelas endoglicanases, mostrando que as enzimas ficam distribuídas ao longo da fibra de celulose. O sinérgismo ocorre também entre os diferentes subtipos de celobiohidrolases, uma vez que há enzimas que atacam as extremidades redutoras (CBHI) e outras que atacam as extremidades não-redutoras (CBHII) das fibras de celulose (Miettinen–Oinonen, 2004). O grau de sinérgismo varia conforme o tipo de celulose utilizada: na presença de celulose cristalina o sinérgismo endo-exo é alto, diminui na celulose amorfa e é muito baixo ou ausente em derivados solúveis da celulose, como a carboximetilcelulose (CMC) (Heikinheimo e Buchert, 2001).

O modo de ação dessas enzimas é mostrado na figura 5.

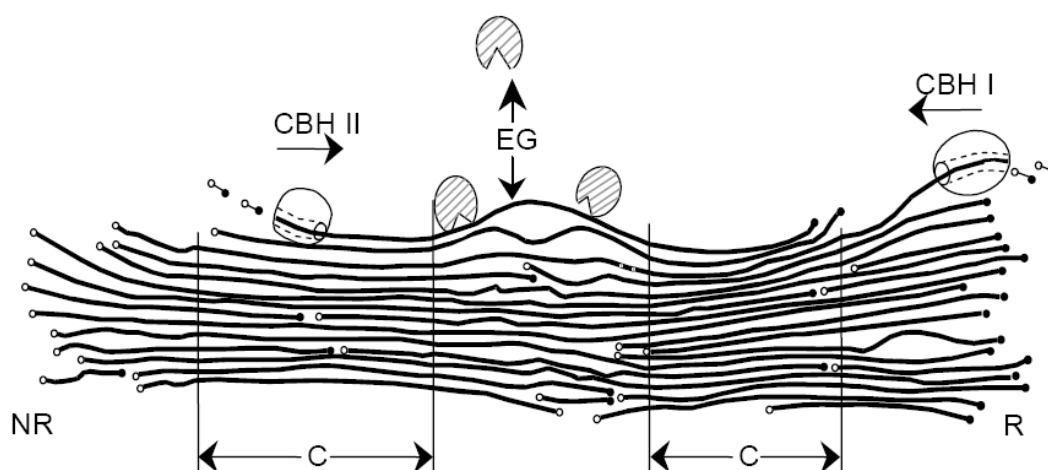


Figura 5. Mecanismo da hidrólise enzimática da celulose. As duas celobiohidrolases (CBH) atacam as áreas cristalinas na faixa oposta do término da cadeia e as endoglicanases (EG) agem no meio da parte amorfa da celulose. Os círculos fechados, no lado R, representam a região redutora e os círculos abertos, lado NR, representa a região não-redutora. C indica as regiões altamente cristalinas. Fonte: Teeri (1997).

Formação de celulase por *T. reesei*

À parte aos estudos da enzimologia da degradação da celulose, existe também um interesse contínuo no entendimento dos mecanismos de regulação da síntese das celulasas. Tal conhecimento é requerido para entender a fisiologia do organismo, para prover estratégias no melhoramento da produção da enzima, por estratégias nutricionais ou recombinantes e para o uso de promotores de celulase para superprodução de proteínas heterólogas em *Trichoderma* (Schmoll e Kubicek, 2003).

Em 1960, Mary Mandels e Elwyn T. Reese (Mandels e Reese, 1960), levantaram o seguinte paradigma sobre como ocorre a indução da formação de celulase pelo fungo *T. reesei*: “Celulasas são enzimas adaptativas, mas seu substrato natural -celulose- é insolúvel. Então como ocorre a indução?”. Acredita-se que alguns oligossacarídeos liberados da celulose servem como indutores da expressão da celulase. Esta hipótese está apoiada no fato que celulasas são fortemente induzidas por vários dissacarídeos

como celobiose, lactose, sofrorose e 1,5-lactona- δ -celobiono (revisto por Schmoll e Kubicek, 2003).

Existem três modelos diferentes para a explicação desse mecanismo de indução. Um deles, ainda proposto na década de 70, sugere que a formação inicial destes oligossacarídeos a partir da celulose é atribuída a baixos níveis constitutivos de celulases encontrados nesses fungos (Gritzali e Brown, 1979). Embora essa explicação não tenha sido totalmente aceita por parte dos pesquisadores, a ocorrência de um mecanismo de indução semelhante em outros microrganismos tem reforçado esta hipótese. Em linhas gerais, a ligação de reguladores transcricionais em regiões específicas do promotor de celulases esta em equilíbrio, assim, mesmo uma forte repressão ou forte ativação dos genes de celulase, sempre leva a um aumento nos baixos níveis da expressão “constitutiva”, a qual, entretanto, pode escapar da detecção por alguns métodos (Carle-Urioste et al., 1997).

Outra hipótese para a formação de celulase em *T. reesei* tem sido apresentada por Kubicek e seus colaboradores. Esta hipótese se baseia na observação de que somente os conídios e não o micélio são capazes de começar o crescimento em presença de celulose em meios de cultura. Os conídios de *Trichoderma* spp. contêm uma série de enzimas diferentes capazes de hidrolisar vários tipos de polissacarídeos, sendo portanto uma explicação alternativa para a degradação inicial da celulose. Essas enzimas estão localizadas na superfície dos conídios e são formadas independentemente das condições nutricionais usadas para induzir a esporulação e são capazes de hidrolisar celulose cristalina (Kubicek et al., 1988). O papel essencial de celulases ligadas a conídios na formação de indutores de celulases tem sido demonstrado pela retirada dessas enzimas da superfície dos conídios com uso de detergentes fracos, impedindo assim a capacidade de *T. reesei* de crescer em celulose.

Seiboth et al. (1992 e 1997) por outro lado demonstraram pelo uso de mutantes para *cbh1*, *cbh2*, *egl1* e *egl2* que diferentes celulases podem exibir diferentes habilidades para a formação de indutores: linhagens com *cbh2* e *egl2* deletados, mostram uma indução baixa de celulase ao passo que a deleção de apenas *egl1* quase não teve diferença na indução frente ao tipo selvagem. Linhagens com a deleção tanto de *cbh1* quanto de *cbh2* foram completamente incapazes de induzir a expressão dos genes de *egl1* e *egl2* por celulose. Entretanto a adição de 2 mM de sofrorose no meio de cultura restaurou esta capacidade.

Estes resultados juntos suportam a hipótese proposta por Kubicek e mostram que as celulases ligadas a superfícies dos conídios agem de forma sinérgica na degradação inicial de moléculas de celulose, gerando assim, os indutores da biosíntese de celulases e, portanto promovem a expressão de genes de celulase e o crescimento do fungo em celulose.

Uma terceira hipótese proposta por Ilmen et al. (1997) baseia-se no fato de que significativa expressão de todas as celulases foi observada após o consumo total de glicose do meio de cultura. Entretanto, esse mecanismo de desrepressão da formação de celulases ainda não é esclarecido e parece ser independente da falta de fonte de carbono ou repressão catabólica. A liberação de compostos indutores de celulase tanto da parede celular dos fungos durante a falta de nutrientes quanto pela transglicosilação de glicose previamente presente no meio de cultura antes da metabolização ainda não foram verificados para sugerir uma explicação para estes resultados encontrados pelos pesquisadores acima citados.

Qualquer que seja o modelo que de fato seja responsável pelo ataque inicial da molécula de celulose, o produto final deve ser um indutor de baixa massa molecular que é capturado pelas células dos fungos. A identidade deste composto ainda não é conhecida, porém diversos oligossacarídeos podem funcionar com indutores de celulases em experimentos laboratoriais.

A **Celobiose** (β -D-Glic-(1 \rightarrow 4)-D-Glic 4-O- β -D-Glicopiranosil-D-glicose) é o principal produto final formado à partir da hidrólise da celulose. O surgimento deste composto na célula pode sinalizar a presença de celulose extracelular e, portanto seria o candidato lógico como indutor natural para a biosíntese de celulase. Entretanto, crescimento em celobiose ou adição de celobiose a culturas de *T. reesei* crescidos em celulose, inibe a síntese de celulase (Fritscher, Messner e Kubicek, 1990). Isso se deve provavelmente à rápida hidrólise, por ação de uma β -glicosidase, da celobiose a glicose que reprime a síntese de celulase (Ilmen et al., 1996; Ilmen et al., 1997). Estes resultados não devem ser interpretados como uma evidência contra a celobiose como indutor. O transporte de dissacarídeos como celobiose, sofrorose, gentobiose e laminaribiose para dentro do micélio de *T. reesei* ocorrem através de uma permease, que possui uma maior afinidade por estes substratos do que as β -glicosidases extracelulares (Kubicek et al., 1993). Assim, a uma baixa concentração do dissacarídeo, prevalece o transporte do mesmo para dentro da célula e conseqüentemente um aumento na formação de celulase. Desta forma, a utilização de celobiose como indutor da formação

de celulases tem sido utilizada em baixas concentrações ou em reatores alimentados a uma baixa taxa e com o uso concomitante de inibidores de β -glicosidases ou ainda pela adição de um análogo de celobiose (1,5-lactona- δ -celobiono) que é um substrato pobre para β -glicosidases (Szakmary, Wotawa e Kubicek, 1991). Todos estes processos permitem a síntese de celulases em quantidades comparáveis com aquelas observadas em celulose (Fritscher, Messner e Kubicek, 1990).

A **Soforose** (β -D-Glic-(1 \rightarrow 2)-D-Glic 2-O- β -D-Glicopiranosil-D-glicopirano), que também é um substrato pouco específico para β -glicosidases, induz a expressão de genes de celulase a um alto nível e por isso tem sido considerado por muito tempo um indutor natural de formação de celulase em *T. reesei* (Sternberg e Mandels, 1979). Acredita-se que a soforose é formada pela ação de transglicosilação de β -glicosidases e/ou de algumas endoglicanases (Vaheri, Leisola e Kaupinnen, 1979). Mutantes de *T. reesei* em que o gene de β -glicosidase (*bgl1*) foi removido ou ainda experimentos onde foram utilizados inibidores de β -glicosidases, apresentaram uma deficiência de crescimento e na produção de celulase em presença de celulose (Fowler e Brown, 1992). A adição de soforose nesses meios de cultura restaurou a indução de celulase e o crescimento do fungo em celulose, indicando que as β -glicosidases possuem um papel importante na formação de indutores de celulase a partir de celulose (Kubicek, 1987).

Entretanto, esses resultados não provam que a soforose seja de fato o indutor natural da formação de celulase. Mutantes de *T. reesei* contendo múltiplas cópias do gene *bgl1* apresentaram um aumento na indução de formação de celulase não só na presença de celulose, mas também de soforose. Além disso, a indução por soforose em mutantes com deleção para *bgl1* também foi inibida na presença de nojirimicina, um inibidor de β -glicosidase (Mach et al., 1995). Uma explicação para isso poderia ser o envolvimento da ação de pelo menos mais de uma β -glicosidase na formação final do indutor. Umile e Kubicek (1995) identificaram uma β -glicosidase ligada à membrana plasmática que poderia estar envolvida nesse processo. Além disso, uma nova β -glicosidase intracelular, com atividade de transglicosilação, denominada de BGLII foi caracterizada e seu gene (*bgl2*) clonado (Saloheimo et al., 2002). Entretanto, a natureza do envolvimento de β -glicosidases na indução de celulases ainda é desconhecida.

A **Lactose** (1,4-O- β -D-galactopiranosil-D-glicose) não é um produto normal da degradação da celulose. Sua demonstração como um potente indutor de celulase ainda é um enigma e sua semelhança estrutural com a celobiose pode explicar esse fato. A

lactose é a única fonte de carbono solúvel que pode ser usado economicamente na produção de celulase ou na produção de proteínas heterólogas sob controle de promotores de celulase por *T. reesei* (Morikawa et al., 1995).

A principal via de metabolismo da lactose por *T. reesei* ocorre pela sua hidrólise extracelular produzindo glicose e galactose com subsequente metabolismo da galactose pela via de Leloir (Seiboth et al., 2005). A identificação do mecanismo de indução da formação de celulase por lactose vem sendo feita por várias etapas com uso de mutantes com deleção para os genes que compõem a via de metabolismo da galactose. Assim, com a deleção da galacto quinase, a formação de celulase tendo como indutor lactose, é diminuída, enquanto que a deleção do gene *gal7* (uridiltransferase), que está envolvido no próximo passo do metabolismo, não afeta a indução de celulase, mas promove um aumento no tempo de transcrição dos genes de celulases (Seiboth, Hofmann e Kubicek, 2002). Estes resultados sugerem que a concentração celular de galactose-1-fosfato pode sinalizar a presença de lactose. Entretanto, essa indução parece ser influenciada por outras substâncias como o galacitol e outros metabólitos, uma vez que quando o *T. reesei* é crescido na presença de galactose não apresenta formação de celulase. Outros dados indicam que uma baixa taxa de crescimento do fungo pode ser essencial para a indução de celulase por lactose (Hartl, Kubicek e Seiboth, 2007). Novos componentes dessa rede têm revelado que a indução da formação de celulase por lactose pode ser muito mais complexa do que se imagina, com o envolvimento de outras vias de metabolização tais como, xilose, arabinose, arabinitol e xilitol (Seiboth et al., 2007). Além disso, o estudo de mutantes que tiveram a indução de celulase por sofrorose e celulose diminuídas, ainda são induzidas por lactose, sugerindo que a lactose trabalha por uma via de sinalização diferente (Schmoll e Kubicek, 2003).

Regulação da expressão de genes de celulase em *T. reesei*

Independente da natureza do indutor de celulases é consenso que a formação de celulases é regulada no nível transcricional e acontece de forma coordenada. Em presença do indutor celuloase, o gene da celobiohidrolase (*cbh1*) é o mais expresso, seguido por *cbh2*, *egl5* e *egl1* (Schmoll e Kubicek, 2003).

Análise de promotores dos genes de celulase (principalmente *cbh1* e *cbh2*) mostrou que expressão destes genes está sujeita à regulação tanto positiva quanto negativa (revisado por Schmoll e Kubicek, 2003). Saloheimo et al. (2000) e Aro et al.

(2001) isolaram os genes e identificaram dois ativadores de transcrição, o *ace1* (activator of cellulase gene expression), que codifica para uma proteína que se liga ao DNA (ACE1), que contém três motivos dedos de zinco do tipo Cys(2)-His(2) e o *ace2* que também codifica para uma proteína que se liga ao DNA (ACE2) a qual pertence a classe binuclear de zinco do tipo (Zn(II)2Cys₆), que são exclusivas de fungos (Aro et al., 2001).

Genes homólogos ao *ace1* já foram identificados em seqüências expressas em *Aspergillus* e *Neurospora*, indicando que esse gene também ocorre em outros fungos filamentosos (Todd et al., 1998). Experimentos *in vitro* demonstram que existem pelo menos oito regiões de ligação para ACE1 na região promotora de *cbh1*. ACE1 reconhece todas as regiões que contem AGGCAAA e algumas AGCA precedidas por regiões relativamente ricas em AT (Saloheimo et al., 2000). Seqüências idênticas ou bastante semelhantes ocorrem em promotores de outros genes de celulase em *T. reesei*, tais como *egl1*, *egl5* e *cbh2* e no gene de xilanase *xyn1* (revisto por Schmoll e Kubicek, 2003). Experimentos de deleção do gene *ace1* em *T. reesei* mostraram um retardamento no crescimento do fungo em meio de cultura contendo celulose (revisto por Schmoll e Kubicek, 2003), porém, resultou em um aumento na expressão das principais celulases em sofrorse e celulose, indicando que ACE1 age como um repressor da expressão de genes de celulase (Aro et al., 2001).

Diferente do *ace1* e da maioria de outros fatores de transcrição que contém motivos zinco-binucleares, o sítio de ligação para ACE2 (5'-GGCTAATAA) não é uma seqüência que se repete ao longo da região promotora de *cbh1*. Nesse aspecto, Ace2 parece ser bastante similar ao regulador de hemicelulase e celulase XlnR de *A. niger*, que se liga na região promotora desses genes ativando sua transcrição (Aro et al., 2001). Entretanto ACE2 não se liga a região consenso de XlnR (5'-GGCTAAA-3') e os dois não apresentam uma semelhança esperada para domínios de ligação ao DNA, assim, experimentos futuros são necessários para confirmar a semelhança entre esses dois fatores (Aro et al., 2001). O sítio de ligação para ACE2 na região promotora de *cbh1*, está localizado próximo à região de ligação do repressor catabólico CREI. Essa região está flanqueada por quatro seqüências CCAAT e também por um sítio de ligação para ACE1(Aro et al., 2001). Já foi descrito que a seqüência CCAAT são requeridas para uma alta expressão do gene *amdS*, que codifica para uma acetamidase em *A. nidulans* e poderia servir como sítio de ligação de complexos semelhantes ao AnCF de *A. nidulans*,

o qual influencia a estrutura da cromatina na região 5' do gene de *amdS* (Aro et al., 2001).

A deleção do gene *ace2* promove uma diminuição nos níveis de RNAm de *cbh1*, *cbh2*, *egl1* e *egl2* e uma redução de 30 a 70% na atividade de celulases quando o fungo é crescido em meio contendo celulose (Aro et al., 2001). A indução de celulase por soforose não foi afetada pela deleção do gene *ace2*, sugerindo que a indução por celulose e soforose envolve diferentes fatores de transcrição (Schmoll e Kubicek, 2003). Foi relatado também que Ace2 pode se ligar a regiões do promotor de *cbh2*. Entretanto, em contraste com os resultados de deleção do motivo de ligação em *cbh1*, a deleção do motivo de ligação no promotor de *cbh2* prejudica não só a indução por celulose, mas também por soforose (Zeilinger, Mach e Kubicek, 1998). Outro motivo descrito recentemente por Schmoll et al. (2005), EUM1, sugere que o gene *cbh1* pode ser regulado pela presença de luz. O esquema que resume a estrutura do promotor de *cbh1* e seus ligantes está mostrado na figura 6.

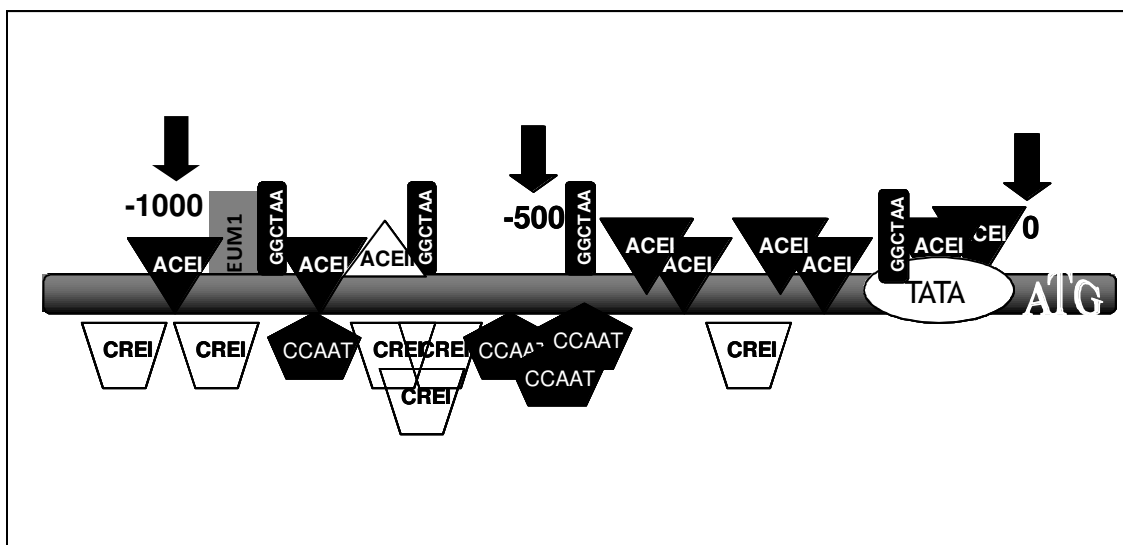


Figura 6. Esquema da estrutura da região promotora de *cbh1* mostrando a localização dos sítios de ligação para alguns fatores de transcrição. Os números indicam as posições ajustadas ao códon de iniciação ATG; ACEI (ativador de expressão do gene da celulase) (AGGCAAA); ACEII (5'-GGCTAATAA); CREI (repressor de produtos de catabolismo de carbono) (5'-SYGGRG-3'). CCAAT (motivo de ligação para o complexo AnCF de *A. nidulans*). EUM1 (motivo de ligação regulado por luz, CTGTGC).

Outros fatores de transcrição envolvidos na expressão de genes de celulase em *T. reesei* foram identificados pela técnica de EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), utilizando extratos celulares de micélios, em condições de indução por sofrose ou sem a presença do indutor, e vários fragmentos do promotor de *cbh2*. Zeilinger et al. (1998) detectaram uma seqüência de nucleotídeo 5'-ATTGGTAATA-3' denominada de elemento de ativação de *cbh2* (*cbh2*-activating element, CAE) para ligação de um complexo protéico. Experimentos *in vivo* de “footprinting” demonstraram que a ligação de proteínas à CAE ocorre tanto sob condições de indução quanto em condições de não indução. Análises de EMSA com versões mutantes em regiões específicas de CAE revelaram que a ligação de proteínas nessa região requer a presença de uma cópia intacta de qualquer um dos dois motivos adjacentes: o CCAAT na fita molde e o GTAATA na fita codante. Mutações simultâneas nesses dois motivos levam a uma perda na ligação de complexos protéicos (Zeilinger et al., 1998).

A identidade de proteínas que se ligam a motivos GTAATA ainda não é conhecida (Zeilinger et al., 2001). Entretanto, experimentos de EMSA utilizando anticorpos sugeriram que proteínas do tipo Hap podem se ligar ao motivo CCAAT. Assim, Zeilinger et al. (2001) clonaram os genes *hap2*, *hap3* e *hap5* de *T. reesei* que codificam para proteínas com regiões homologas a HapB, HapC e HapE de *Aspergillus* e outras Hap conhecidas de outros organismos. Todas as três proteínas (Hap2, Hap3 e Hap5) foram necessárias para ligar no CAE do promotor de *cbh2* de *T. reesei* *in vitro*. Assim, o motivo CCAAT na fita molde no CAE é ligado como um complexo em *T. reesei*, semelhante ao complexo Hap de outros organismos (revisto por Schmoll e Kubicek, 2003).

Abrahão-Neto et al. (1995) reportaram que a atividade mitocondrial é fundamental para a máxima expressão de genes de celulases em *T. reesei*. Carraro et al. (1998) demonstraram que a transcrição heteróloga de genes controlados pelo promotor de *cbh1* em *S. cerevisiae* também é dependente da atividade mitocondrial, sugerindo a presença de seqüências no promotor para ligação de proteínas que possam mediar esse processo. Já foi sugerido que o complexo Hap2/3/5 esteja envolvido na regulação respiratória em leveduras (Mattoon, Caravajal e Guthrie, 1990). Assim estudos mais aprofundados sobre a ligação entre o complexo Hap2/3/5, atividade mitocondrial e expressão de genes de celulase deverão ser realizados em *T. reesei*.

Todos os componentes já identificados como reguladores transcricionais de genes de celulase ligam-se aos seus alvos de forma constitutiva, porém o modo pelo

qual eles atuam ainda é especulativo (Schmoll e Kubicek, 2003). Já foi relatado que o complexo Hap2/3/5 é capaz de regular a transcrição de genes por remodelação da cromatina (Narendja et al., 1999). Zeilinger *et al.* (2003) investigaram as alterações na estrutura da cromatina do promotor de *cbh2* durante a indução do gene de celulase. Os resultados mostraram que em condições de indução ou sob condições de repressão catabólica, mudanças na estrutura da cromatina foram observadas. Durante repressão, ocorre formação de nucleossomos próximos ao TATA “box” impedindo a interação dos reguladores Ace2 e o complexo Hap2/3/5, ao passo que em condições de indução o TATA box fica acessível. Esses resultados, portanto, sugerem que tanto o complexo Hap2/3/5 e o Ace2 estejam envolvidos na formação de nucleossomos no promotor de *cbh2* e que eles respondem à ausência de nucleossomos, ativando a expressão de genes de celulase (Zeilinger et al., 2003). Dados recentes sugerem a presença de mais dois componentes nesse processo, uma proteína ainda desconhecida, que ligaria o complexo RNA-polimerase II ao complexo Hap2/3/5 e uma proteína com domínio WD repetição, que se encontra em grandes quantidades em presença de celulose e lactose em *T. reesei*, porém ausente no mutante negativo para celulase (Schmoll et al., 2004). Os membros da família de proteínas formadas por domínios WD exercem uma grande variedade de funções como: transdução de sinal, processamento e síntese de RNA, montagem da cromatina, transporte vesicular, montagem do citoesqueleto, regulação do ciclo celular, apoptose (Schmoll et al., 2005). O esquema que resume a estrutura do promotor de *cbh2* e seus ligantes está mostrado na figura 7.

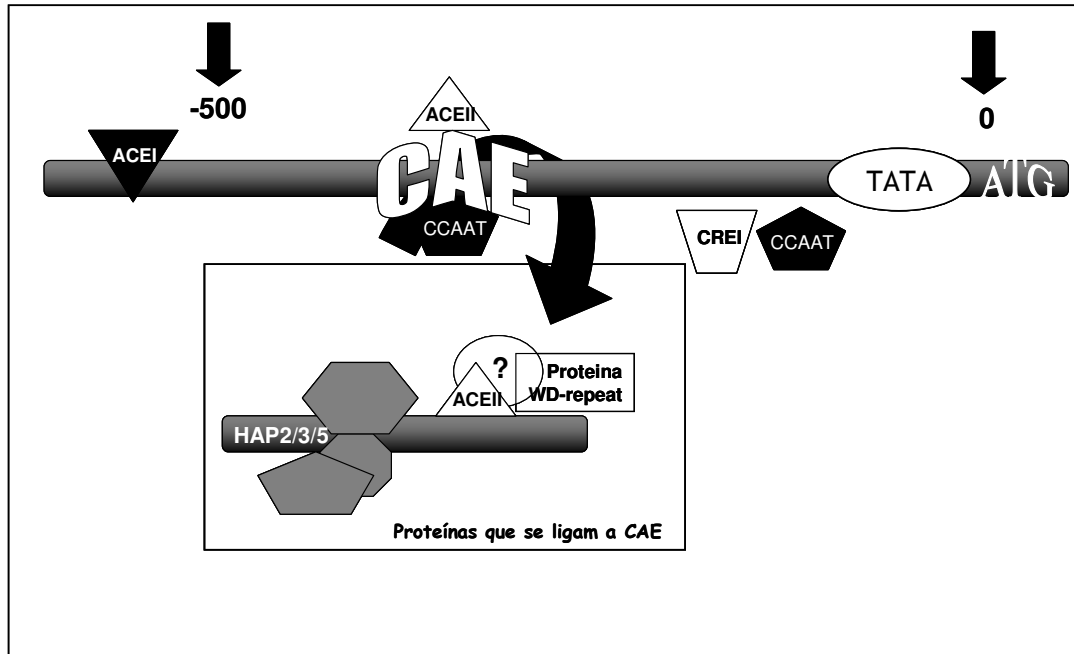


Figura 7. Esquema da estrutura da região promotora de *cbh2* mostrando a localização dos sítios de ligação para alguns fatores de transcrição. Os números indicam as posições ajustadas ao códon de iniciação ATG; ACEI (ativador de expressão de genes de celulase) (AGGCAA); ACEII (5'-GGCTAATA); CREI (repressor de catabolitos de carbono) (5'-SYGGRG-3'). CCAAT (motivo de ligação para o complexo AnCF de *A. nidulans*) CAE (*cbh2*-ativador).

Outro aspecto bastante interessante que regula a expressão de genes de celulase é a repressão catabólica. Na verdade a repressão catabólica é um importante mecanismo de regulação que permite a repressão de genes que codificam para enzimas que estão envolvidas na utilização de fontes de carbono complexas quando açúcares simples, como a glicose, estão disponíveis (Gancedo, 1998). Essa situação também se observa com o sistema celulolítico de *Trichoderma*. Em presença de altos níveis de glicose, a sofrose não é capaz de induzir a expressão de genes de celulase e a adição de glicose em meios, que já estão em situação de indução, promove o desaparecimento de transcritos de *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2* e *egl5* (Ilmen et al., 1997). Entretanto, esses resultados por si só não demonstram que a glicose é um repressor direto, uma vez que essa molécula pode impedir a entrada do indutor para dentro da célula do fungo, através da inibição da dissacarídeo permease (Kubicek et al., 1993).

Evidências do efeito repressor direto da glicose têm sido demonstradas pelo uso de mutantes para o respectivo gene repressor e na análise dos promotores de celulase (Takashima et al., 1996 e Ilmen, 1997). O gene em questão, chamado de *cre1*, que codifica para um repressor catabólico Cre1 já foi clonado (Strauss et al., 1995) e mostrou codificar para uma proteína funcional homóloga a CreA de *A. nidulans* (Dowzer e Kelly, 1991). Essa proteína possui um consenso no seu sítio de ligação, 5'-SYGGRG-3'. Mutações nesses sítios localizados a -700, -1000 e -1500 pb amontante ao ATG mostraram que a mutação na posição -700 resultou em uma clara desrepressão do gene *lacZ* de *E. coli*, usado como gene repórter (Ilmen et al., 1996). Dados mais recentes mostraram que essa desrepressão resulta em uma diminuição dos níveis de expressão em apenas 10 vezes, quando comparada com a indução, revelando que a repressão catabólica não se trata de um simples evento de antagonismo, e que esse processo provavelmente requer a ativação de outros fatores (revisto por Schmoll e Kubicek, 2003).

Um estudo mais aprofundado de como Cre1 se torna ativo em presença de glicose, durante a indução do sistema celulolítico em *T. reesei*, foi realizado por Cziferszky et al. (2002). Os autores mostraram que Cre1 é uma fosfoproteína, que possui um motivo de fosforilação Ser₂₄₁, contendo uma região ácida como alvo de fosforilação. Um componente semelhante já foi descrito em leveduras, o repressor catabólico Mig1, que é fosforilado por Snf1-quinase (Treitel et al., 1998). Entretanto, dados mostraram que os mecanismos de repressão bem como de fosforilação dessas proteínas, ocorrem de maneiras diferentes nos dois organismos (Cziferszky et al., 2003). É interessante ressaltar que a linhagem de *T. reesei* mais comumente utilizada como hiperprodutor de celulases, RutC-30, que foi originalmente isolada após uma seleção por crescimento em celobiose na presença de 2-deoxi-glicose (Montenecourt e Eveleigh, 1979), possui o gene *cre1* mutado, com apenas 20% da região codante, formando uma proteína defeituosa, com a falta da região C-terminal. Análises por Northern blot confirmaram que essa linhagem expressa algumas celulases, como *cbh1* na presença de glicose, mesmo em baixas concentrações (Zeilinger et al., 2003). Recentemente, Seidl et al. (2008) reportaram que o RutC-30 perdeu cerca de 85 kb de fragmento genômico durante o processo de metagênese o que resultou na perda de 29 genes, dentre os quais alguns relacionados ao transporte de proteínas e metabolismo primário.

Vias de sinalização

Apesar de todos estes trabalhos citados acima demonstrarem que os genes de celulase são dependentes de indução, nem a natureza do indutor nem as vias de sinalização são totalmente conhecidas (Schmoll e Kubicek, 2003). Em contraste com tantos dados a respeito da arquitetura dos promotores de hidrolases de *T. reesei*, poucos trabalhos têm sido observados sobre os mecanismos de transdução de sinais neste fungo (Mach e Zeilinger, 2002). Wang e Nuss (1995) demonstraram a evidência do envolvimento de uma proteína G α na indução de *cbh1* por celulose. Sestak e Farkas (1993), descreveram que a eficácia da indução de celulase por sofrorose pode ser dobrada pela adição de dibutilil-AMP cíclico (uma forma permeável de AMPc à membrana) ou ainda pela adição de inibidores de fosfodiesterase (enzima que conhecidamente degrada AMPc). Estes dados sugerem que a sinalização dos indutores de celulases podem envolver proteínas G e AMPc.

Numa tentativa de identificar alguns componentes na via de sinalização durante a produção de celulase em presença de celulose Schmoll et al. (2004), utilizando um mutante para as regiões promotoras de *cbh1* e *cbh2*, realizaram uma hibridização por subtração (RaSH) de bibliotecas de cDNAs, e conseguiram identificar mais de 20 genes que são diferencialmente expressos no mutante negativo para celulase e no tipo selvagem. Dois destes genes parecem ser promissores, já que são super regulados em presença de celulose. O primeiro, o gene “*envoy*”, codifica para uma proteína que contém um domínio PAS (presente em proteínas de reconhecimento de luz) e apresentou uma alta similaridade com VIVID (uma proteína relacionada a percepção de luz) de *N. crassa* (Heitzen et al., 2001). Este gene faz uma ligação entre a indução de celulase por celulose e a sinalização por luz em *T. reesei* (Schmoll et al., 2005).

O segundo gene, que codifica para uma proteína de 51 kDa, foi denominado de *minute*. Nenhuma similaridade com outras proteínas foi detectada nos bancos de dados disponíveis, incluindo *N. crassa*, *Fusarium graminearum*, *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus fumigatus* (Schmoll et al., 2004). Uma característica adicional intrigante de *minute* é que contém a sucessão (L/I)GC(S/T)VM repetida três vezes ao longo da proteína, respondendo assim por aproximadamente 35% do polipeptídeo, e interrompido por um espaço de 11 e 13 aminoácidos. Mais adiante, exibe um domínio putativo de CAAX para prenilação (Higgins e Casey 1996; Lai et al., 1990) e um local de consenso

para fosforilação por proteína cinase A, o que o torna mais interessante ainda devido a hipótese levantada de um envolvimento de AMPc na indução da celulase.

Além dos genes mencionados, dois recebem uma atenção especial, *csi1* (“cellulase signalling 1”) e *ooc1* (“only expressed on cellulose”). O primeiro é fortemente expresso em presença de soforose no tipo selvagem, mas não no mutante negativo para celulase (Schmoll e Kubicek, 2003). Já o segundo é expresso somente na presença de celulose como indutor e somente quando a indução é realizada no escuro (Schmoll e Kubicek, 2005). Mutantes para esses genes ainda não foram descritos, porém, quando realizados poderão elucidar as vias distintas de sinalização da indução de celulase por soforose e celulose na presença ou ausência de luz.

A luz é um fator abiótico importante para a sobrevivência de organismos vivos. Em fungos, a luz é conhecida por estimular funções morfogênicas tais como fototropismo, formação de hifas, formação de esporos, reprodução e formação de conídeos. A luz também pode aumentar a formação de pigmentos no sentido de proteger os organismos contra os efeitos negativos da luz ultravioleta (Friedl et al., 2007).

O mecanismo molecular de resposta à presença de luz é melhor conhecido, dentre os fungos, em *Neurospora crassa*. Neste fungo, as respostas moleculares induzidas por luz dependem de pelo menos dois genes que regulam esse processo: white-collar-1 (WC-1) e White-color-2 (WC-2). Estes dois genes codificam proteínas que possuem domínios tipo dedo de zinco e um domínio PAS/LOV, que possui um papel importante como sensor para presença de oxigênio, potencial de redução e luz (Shuster et al., 2007).

Em *Trichoderma* os efeitos da luz em alguns eventos metabólicos já foram descritos desde a década de 70 (revisados por Betina e Farkas, 1998). Entretanto, estudos do efeito da luz em processos envolvendo *T. reesei* tiveram início recentemente (Schmoll et al., 2005). Em *T. reesei*, a luz é capaz de estimular tanto o crescimento do fungo quanto a expressão de genes de celulase em presença de celulose e esses processos são regulados por uma proteína recém descrita, ENVOY (Schmoll et al., 2005, Shuster et al., 2007). Recentemente, foi demonstrado que o metabolismo de enxofre e metionina por *T. reesei* é influenciado por luz e mediado por ENVOY e que a sinalização para esse processo pode ocorrer através de proteína G (Gremel et al., 2008).

Proteínas G

As proteínas ligantes de nucleotídeos de guanina (Proteínas G) estão envolvidas em vários processos celulares e têm um papel importante na regulação da atividade de um grande número de enzimas (Hepler e Gilman, 1992 e Neer, 1995). Uma proteína G trimérica é composta por três cadeias polipeptídicas diferentes denominadas de α (39-46 kDa), β (37 kDa) e γ (8 kDa). Agem por interação com receptores e efetores específicos que podem controlar os níveis de mensageiros secundários intracelulares (Kleuss et al., 1994). As proteínas G estão envolvidas no controle da maior parte das vias de sinalização celular em eucariotos (Turner e Borkovich, 1993).

Os fungos podem responder a diferentes tipos de estímulos químicos e físicos, tais como nutrientes, osmolaridade, pH e luz. Além do mais, podem detectar a presença de outros fungos por ferormônios e fungos patogênicos respondem a sinais de seus hospedeiros (Bölker, 1998). Esses sinais são detectados por receptores acoplados a proteínas G localizados na membrana plasmática. É conhecido que estes receptores apresentam um domínio estrutural comum composto por sete alças de aminoácidos hidrofóbicos que atravessam a membrana, sendo que a região N-terminal e C-terminal estão localizadas fora e dentro da célula, respectivamente (Dohlman et al., 1991).

O mecanismo de ação destas proteínas envolve um ciclo de ativação e inativação da atividade GTPásica. Quando GDP está ligado à subunidade α , esta está associada às subunidades $\beta\gamma$ e formam um heterotrímero inativo ($\alpha\beta\gamma$). Na presença de um sinal químico ou físico ocorre a estimulação de um receptor, que muda de conformação, fazendo com que a proteína G inativa também sofra mudança conformacional. Esta mudança diminui a afinidade da proteína G por GDP, que então se desloca do sítio de ligação de GDP/GTP da proteína G. Quando GTP está ligado, as subunidades α e $\beta\gamma$ se dissociam e perdem a ligação com o receptor. O estado ativado da subunidade α permanecerá até que o GTP seja hidrolisado a GDP, quando ocorre então, a reassociação das subunidades e do receptor (Figura 8) (Bölker, 1998). A hidrólise do GTP a GDP e P_i ocorre graças a uma atividade GTPásica intrínseca da subunidade α (Neer, 1995). Tanto a subunidade α quanto $\beta\gamma$ podem, quando livres, ativar efetores, tais como adenilato ciclase, fosfodiesterase, MAP quinase, fosfolipases ou regular canais iônicos diretamente (Kleuss et al., 1994).

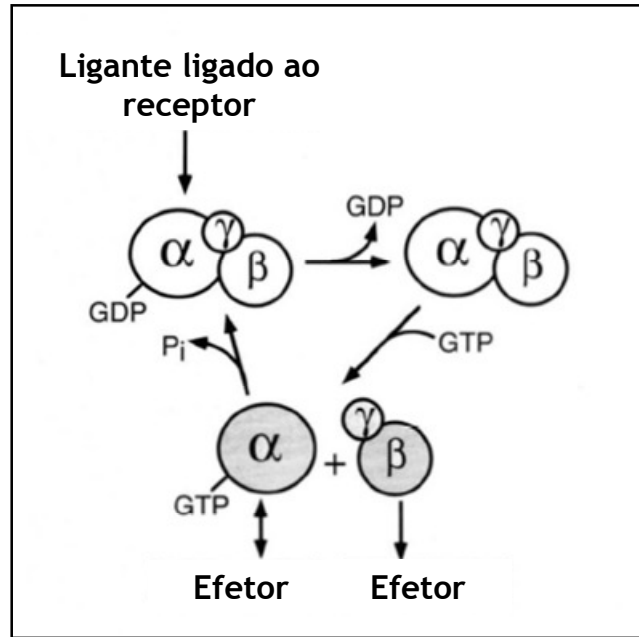


Figura 8. Mecanismo de ação das proteínas G heterotriméricas. Adaptado de Neer (1995).

Apesar de o sistema de proteínas G ser mais conhecido em mamíferos, muitos fungos vêm respondendo questões antes levantadas por pesquisadores que trabalham com células de mamíferos. Isso se deve ao fato de que os fungos são geneticamente mais manipuláveis e um grande número de mutantes já foram construídos (Bölker, 1998).

Baseado no alinhamento de suas seqüências, as proteínas G de fungos podem ser classificadas em três grandes subgrupos: **Subgrupo I**-podem inibir a adenilato ciclase e estão relacionadas a G α_i de mamíferos. Membros desse grupo possuem G α muito conservadas em nível de aminoácidos. Também possuem um sítio de miristoilação (MGXXXS) na porção N-terminal e um sítio para ADP-ribosilação (CXXX) (Bolker, 1998). Além disso, existem evidências genéticas de que alguns fungos, que possuem G α_i , podem diminuir os níveis intracelulares de AMPc, embora o mecanismo pelo qual isso ocorra ainda seja desconhecido (Bolker, 1998).

O **subgrupo II** não apresenta homologia com proteínas G de mamíferos e, além disso, apenas alguns membros foram observados (Bolker, 1998). Já o **subgrupo III** está relacionado a G α_s de mamíferos e estimulam adenilato ciclases promovendo um aumento dos níveis intracelulares de AMPc (Bolker, 1998).

Até o presente momento mais de 30 diferentes genes que codificam para subunidades α de proteínas G já foram isolados de fungos (Tabela 2).

Tabela 2. Genes de proteínas G α já clonados de fungos. Adaptado de Bolker (1998) e Schmoll (2008).

Nome	Subgrupo	Organismo	Nº. acesso	Função biológica
Gpa1 (5Scg1)	I/II	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P08539	Sinalização por ferormônio
Gpa2	III (G α s)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P10823	Sensor de nutriente, falta de nitrogênio
Gpa2	III (G α s)	<i>Kluyveromyces lactis</i>	P54111	Regulação de AMPc
Cag1	I/II	<i>Candida albicans</i>	P28868	Sinalização por ferormônio
Gpa1	II	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	P27584	Sinalização por ferormônio
Gpa2	III (G α s)	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Q04665	Sensor de nutriente, falta de nitrogênio
Gna-1	I (G α i)	<i>Neurospora crassa</i>	Q05425	Fertilidade
Gna-2	II	<i>Neurospora crassa</i>	Q05424	Desconhecida
FadA	I (G α i)	<i>Aspergillus nidulans</i>	Q00743	Desenvolvimento assexual
Cpg1	I (G α i)	<i>Cryphonectria parasitica</i>	Q00580	Virulência
Cpg2	III (G α s)	<i>Cryphonectria parasitica</i>	L32177	Desconhecida
MagA	III (G α s)	<i>Magnaporthe grisea</i>	AF011340	Virulência
MagB	I (G α s)	<i>Magnaporthe grisea</i>	AF011341	Desenvolvimento de ascósporo
MagC	II	<i>Magnaporthe grisea</i>	AF011342	Desenvolvimento de ascósporo
Ctg1	I (G α s)	<i>Colletotrichum trifolii</i>	AF044894	Desconhecida
Pcg1	II	<i>Pneumocystis carinii</i> f. sp. <i>carinii</i>	U30791	Desconhecida
Pcg1	II	<i>Pneumocystis carinii</i> f. sp. <i>ratti</i>	U30790	Desconhecida
Gpa1	I (G α i)	<i>Ustilago maydis</i>	P87032	Desconhecida
Gpa2	II	<i>Ustilago maydis</i>	P87033	Sinalização por ferormônio
Gpa3	III (G α s)	<i>Ustilago maydis</i>	P87034	Patogenicidade e virulencia
Gpa4	IV	<i>Ustilago maydis</i>	P87035	Desconhecida.
Fill	III (G α s)	<i>Ustilago hordei</i>	U76672	Crescimento

Gpa1	III (G α s)	<i>Cryptococcus neoformans</i>	P54853	virulência, regula AMPc
Gpa1	I (G α i)	<i>Coprinus congregatus</i>	P30675	Regulação da sinalização por luz azul
Fga1	I (G α i)	<i>Fusarium oxysporum</i>	AB072451	crescimento vegetativo e conidiação e patogenicidade
Tga1	I(G α i)	<i>Trichoderma atroviride</i> IMI 206040	AY036905	micoparasitismo e conidiação
Tga1	I(G α i)	<i>Trichoderma atroviride</i> P1	AY190117	Formação de quitinase e metabólitos antifúngicos
Tga3	III (G α s)	<i>Trichoderma atroviride</i> P1	AF452097	Micoparasitismo, crescimento vegetativo e conidiação
TgaA	I(G α i)	<i>Trichoderma virens</i>	AY186729	Antagonismo contra <i>S. rolfsii</i>
TgaB	II	<i>Trichoderma virens</i>	AY168002	Desconhecida
Gna3	III (G α s)	<i>Trichoderma reesei</i>	ABJ55985	Regula a expressão de celulase mediada por luz

Muitos pesquisadores têm mostrado interesse em estudar os mecanismos de sinalização celular, envolvendo proteínas G, em fungos para tentar explicar alguns aspectos fisiológicos destes organismos (D'souza e Heitman, 2001). Experimentos com mutantes que perderam ou melhoraram as funções de G α e também de G $\beta\gamma$ tem indicado que as proteínas G estão envolvidas em processos tais como esporulação, reprodução, patogenicidade, metabolismo secundário, virulência, formação de estruturas de infecção e secreção de enzimas extracelulares de fungos ascomicetos e basidiomicetos (Bolker, 1998; Kronstad et al., 1998; D'Souza e Heitman, 2001; D'Souza et al., 2001; Mukherjee et al., 2004; Zeilinger et al., 2005).

Em *Trichoderma*, evidências da participação de proteínas G e AMPc em diversos processos já foram descritas. Das cascatas de sinalização celulares conhecidas que ocorrem nos eucariotos superiores e em leveduras, existem evidências de três delas em fungos do gênero *Trichoderma*: 1) a via de sinalização proteína cinase/fosfolipídeos; 2) cálcio/calmodulina, 3) AMPc/proteína cinase (Kubicek, 1998) e Proteína G/AMPc (Schmoll, 2008).

O efeito de AMPc, tetrafluoreto de alumínio (AlF $_4^-$) e mastoporam (ativadores de proteína G) no envelhecimento de *T. harzianum* sobre fibras de nylon foram descritos por Omero et al., (1999). Os autores encontraram que estes três compostos foram capazes de induzir o enrolamento do fungo nas fibras de nylon, indicando que a interação entre um

micoparasita e seu hospedeiro é muito mais complexa do que se imagina, envolvendo sinalização celular com participação de AMPc.

Firmino et al. (2002) estudaram o efeito de moléculas ativadoras e inibidoras de síntese de AMPc na indução de N-acetil- β -D-glicosaminidase do fungo *T. harzianum*, quando crescido na presença de quitina. Cafeína e IBMX (inibidores de fosfodiesterase), e dibutilil-AMPc (análogo solúvel de AMPc) inibiram a síntese da N-acetil- β -D-glicosaminidase. AlF_4^- , um ativador de subunidades $G\alpha$, diminuiu a síntese da N-acetil- β -D-glicosaminidase. Entretanto, neste trabalho não foi determinada a concentração intracelular de AMPc, bem como o nível de regulação da síntese da N-acetil- β -D-glicosaminidase. Evidências de que níveis altos de AMPc inibem a expressão do gene *nag1*, que codifica para N-acetil- β -D-glicosaminidase foram recentemente descritas (Silva et al., 2004).

Apesar de as cascatas de sinalização em *Trichoderma* começaram ser elucidadas desde 2002 (Rocha-Ramirez et al., 2002) somente recentemente um receptor ligado à proteína G foi caracterizado (Brunner et al., 2008). Em *T. atroviride* e *T. virens*, proteínas $G\alpha$ mostraram exercer um papel importante no antagonismo de fitopatógenos (Rocha-Ramirez et al., 2002; Mukherjee et al., 2004; Reithner et al., 2005; Zeilinger et al., 2005). Além disso, foi relatado que as proteínas MAP quinase afetam o processo de micoparasitismo por *T. virens* e por *T. atroviride*, bem como a resistência sistêmica de plantas contra fitopatógenos (Viterbo et al., 2005; Reithner et al., 2007).

As espécies de *Trichoderma* acima citadas são bastante próximas, entretanto, a análise da sinalização via proteína G revelou diferenças significantes entre essas espécies. Enquanto que em *T. atroviride* a Tga1 ($G\alpha_i$) afeta a expressão de algumas quitinases e produção de metabolitos antifúngicos (Reithner et al., 2005) e mostrou ser indispensável no controle de *R. solani* (Rocha-Ramirez et al., 2002) mutantes de *T. virens* ($\Delta tgaA$, $G\alpha_i$) enroloram, esporularam e controlaram *R. solani* da mesma forma que o parental (Mukherjee et al., 2004).

Em *T. reesei*, nenhuma cascata de sinalização via proteína G ainda foi elucidada, mas existem evidências de que o AMPc controla a expressão de celulasas, porém apenas na presença do indutor sofrorose (Sestak e Farkas, 1993).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a participação da proteína GNA3 e do mensageiro secundário AMPc nas vias da cascata de sinalização celular envolvidas no controle da expressão dos genes das celobiohidrolases (*cbh1* e *cbh2*) por celulose e sofrose em *T. reesei* e durante o antagonismo contra o fitopatógeno *P. ultimum*.

Objetivos específicos

- Clonar e caracterizar estruturalmente o gene *gna3* de *T. reesei*
- Construção de um mutante de *T. reesei* com GNA3 com atividade constitutiva (*gna3QL*)
- Avaliar a expressão de genes de celulase (*cbh1* e *cbh2*) em presença e na ausência de luz, tanto no tipo selvagem quanto no mutante de proteína G, *gna3QL* induzidos por celulose e sofrose crescidos em meio líquido.
- Avaliar a participação de GNA3 e AMPc no antagonismo contra *P. ultimum* e na produção de enzimas líticas durante o micoparasitismo.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Meios de cultura e soluções

Meio Mex

Extrato de malte	3 % (p/v)
Agar-Agar	2 % (p/v)

Solução para coleta de esporos

NaCl	0,80 % (p/v)
Tween 80	0,05 % (v/v)
Água destilada q.s.p	50,00 mL

Esterilizar por filtração com filtro de 0,20 µm e armazenar a temperatura ambiente.

Meio BDA

Infuso de batata	20 % (v/v)
Glicose	1 % (p/v)
Agar-Agar	2 % (p/v)

Meio Mínimo

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 % (p/v)
KH ₂ PO ₄	1,0 % (p/v)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,6 % (p/v)
Citrato de sódio.2H ₂ O	0,3 % (p/v)
Glicose	1,0 % (p/v)
Solução elementos traços 50X	1,0 X (v/v)
Agar-Agar	1,5 % (p/v)
Água destilada q.s.p	100,0 mL

Meio Mandels-Andreotti (1 L)

<i>Solução Mineral</i>	500,0 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,8 g/L

KH_2PO_4	4,0 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,6 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,8 g/L

<i>Tampão Citrato-fosfato</i> 0,1 M pH 5,0	480,0 mL
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2 M
Ácido cítrico	0,2M

<i>Solução elementos traços</i> 50X	20 mL
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250 mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	85 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	70 mg/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg/L

Ajustar o pH para 2,0 com H_2SO_4 , armazenar a temperatura ambiente.

Adicionar a essa solução

Fonte de carbono	10,0 g/L
Peptona	1,0 g/L
Uréia	0,3 g/L

Solução A

KH_2PO_4	0,1 M
Sorbitol	1,2 M
Água destilada q.s.p	100,0 mL

Ajustar o pH para 5,6 com KOH diluído. Autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

Solução B

CaCl_2	50 mM
TrisHCl 1M pH 7.5	10 mM
Sorbitol	1 M
Água destilada q.s.p	100 mL

Ajustar o pH para 7,5. Autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

PEG

CaCl ₂	50 mM
TrisHCl 1M pH 7.5	10 mM
PEG 6000	25 % (v/v)
Água destilada q.s.p	50 mL

Autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

Meio de cobertura (Overlay-medium)

Extrato de malte	3 % (p/v)
Agarose	2 % (p/v)
Sorbitol	1 M
Água destilada q.s.p	100 mL

Autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

Meio LB

Peptona	1,0 % (p/v)
Extrato de levedura	0,5 % (p/v)
NaCl	1,0 % (p/v)
Água destilada q.s.p	100,0 mL

Ajustar o pH para 7,2 com NaOH 5M.

Meio LBAamp

Peptona	1,0 % (p/v)
Extrato de levedura	0,5 % (p/v)
NaCl	1,0 % (p/v)
Agar-Agar	1,5 % (p/v)
Água destilada q.s.p	100,0 mL

Ajustar o pH para 7,2 com NaOH 5 M. Autoclavar por 20 min. Após resfriamento (65°C) adicionar 0,1 mL de ampicilina (100mg/ml em etanol) 1000 X.

Solução de X-gal

X-Gal	20 mg
N,N-Dimetilformamida	1 mL

Estocar a -20 °C

Solução de IPTG

IPTG em água ultra-pura 100 mM

Esterilizar por filtração (filtro de 0,20 µm), estocar a -20 °C.

Tampão de equilibrção QBT

MOPS pH 7,0 50 mM

NaCl 750 mM

Isopropanol 15 % (v/v)

Tampão de lavagem QC

MOPS pH 7,0 50 mM

NaCl 1 M

Isopropanol 15 % (v/v)

Tampão de eluição QF

Tris-HCl pH 8,5 50 mM

NaCl 1,25 M

Isopropanol 15 % (v/v)

Solução P1

Tris-HCl pH 8,0 50 mM

EDTA pH 8,0 10 mM

RNase A 100 µg/mL

Armazenar a 4°C uma vez adicionada a RNase.

Solução P2

NaOH 200 mM

SDS 1 % (p/v)

Solução P3

Acetato de potássio 3 M

Armazenar a 4°C

Tampão de extração de DNA

NaCl	1,4 M
Tris-HCl pH 7,5	0,1 M
EDTA	5 mM
Água destilada	100,0 mL

Autoclavar e armazenar a temperatura ambiente.

Tampão de amostra DNA 5X

Azul de bromofenol	250 mg
Glicerol	60 mL
Tris-HCl 150mM pH 7,6	33 mL
Água destilada	7 mL

Fenol saturado pH 8,0

Fenol cristalino	1,0 V
8-Hidroxiquinolona	0,1 % (p/v)
β -Mercaptoetanol	0,2 % (v/v)
Tampão Tris-HCl 100 mM	1,0 V
NaCl	100,0 mM

Homogeneizar repetidas vezes e deixar as fases se separarem. Repetir a operação até que a fase aquosa atinja pH 8,0. Estocar a 4 °C em frasco âmbar.

Clorofil

Clorofórmio	49 V
Álcool isoamílico	1 V

TAE 50X

Tris-HCl	242,0 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	100,0 mL
Ácido acético glacial	57,1 mL
Água destilada	1000,0 mL

Tampão TE

Tris-HCl	10 mM pH 8,0
EDTA	1 mM pH 8,0

Reagente de Chirgwin

Dissolva 250 g de Tiocianato de guanidina em 293 mL de água destilada e adicione 17,6 mL de citrato de sódio 0,75 M pH 7,0 e 26,4 mL lauril sarcozinato de sódio a 10 % (m/v). Dissolva em agitador magnético a 65 °C. A solução pode ser estocada a temperatura ambiente, mas é fotossensível. Estocar a -20 °C.

Fenol saturado pH 4,0

Fenol cristalino	1,0 V
8-Hidroxiquinolona	0,1 % (p/v)
β-Mercaptoetanol	0,2 % (v/v)
Tampão Acetato 100 mM	1,0 V
NaCl	100,0 mM

Homogeneizar repetidas vezes e deixar as fases se separarem. Repetir a operação até que a fase aquosa atinja pH 4,0. Estocar a 4 °C em frasco âmbar.

MOPS 10X

MOPS (ácio 4-morfolinopropano sulfônico)	41,85 g
Acetato de sódio trihidratado	6,80 g
EDTA	1,86 g
Água DEPC autoclavada	1000,00 mL

Ajuste o pH para 7,0 com NaOH 10 M e armazene a 4 °C em frasco âmbar.

Tampão de desnaturação para cada 1µL de RNA

Formamida	2,5 µL
Formaldeído	1,0 µL
MOPS 10X	0,5 µL
Solução de Brometo de etídio livre de RNase (400µg/ml)	0,5 µL

RNA dye

Azul de bromofenol	0,25 % (p/v)
--------------------	--------------

Xileno cianol 0,25 % (p/v)

SSC 20X

NaCl 3,0 M

Citrato de sódio 0,3 M

Água destilada q.s.p 2000,0 mL

Ajuste o pH para 7,0 com HCl

Solução de Denhardtts 50 X

Ficol 400 10 g

Polivinil pirrolidona 10 g

Albumina bovina Fração V 10 g

Água destilada 1000 mL

Estocar a -20 °C

Solução de Pré-hibridação - Southern Blots 50,0 mL

SSC 20X 15,0 mL

Solução de Denhardtts 50X 5,0 mL

SDS 10% 2,5 mL

DNA esperma de salmão ssDNA (10 mg/mL) 0,5 mL

Água destilada 25,0 mL

Solução de Pré-hibridação - Northern Blots 50,0 mL

SSC 20X 15,0 mL

Solução de Denhardtts 50X 5,0 mL

SDS 10% 2,5 mL

DNA esperma de salmão ssDNA (10mg/mL) 0,5 mL

Formamida 25,0 mL

Reagente de Bradford

Coomassie Brilliant Blue G-250 0,01 % (p/v)

Etanol 4,70 % (v/v)

Ácido fosfórico 8,50 % (v/v)

Dissolver 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de etanol 95%. A essa solução adicionar 100 mL de ácido fosfórico 85 %. Ajustar o volume para 1000 mL com água deionizada. Armazenar a 4 °C em frasco âmbar.

Reativo de ácido 3,5-dinitrossalicílico.

Solução I: a 300 mL de solução a 4,5 % de NaOH, adicionar 880 mL de solução a 1,0% de ácido dinitrossalicílico e 255 g de tartarato duplo de sódio e potássio.

Solução II: Adicionar a 10 g de fenol cristalino, 22 mL de NaOH a 10 % . Completar o volume para 100 mL.

Misturar muito bem a solução I e a solução II. Conservar em frascos bem fechados, armazenar a 4 °C. Esse reagente pode ser usado durante 1 ano pelo menos.

Oligonucleotídeos sintéticos específicos e sondas

Tabela 3. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR.

Oligo Nucleotídeo	Seqüência (5'→3')	Utilização/TM
<i>gna3aa5F</i>	GTTTGGCCCCGGATTGAAG	Clonagem do gene <i>gna3</i> e construção do vetor pB <i>gna3QL</i> / 58 °C
<i>gna3aa5R</i>	CCACTTCTTCCGCTCACTCCGTAGGCC	Clonagem do gene <i>gna3</i> e construção do vetor pB <i>gna3QL</i> / 58 °C
<i>gna3aa3F</i>	GGCTACGGAGTGAGCGGAAGAAGTG	Clonagem do gene <i>gna3</i> e construção do vetor pB <i>gna3QL</i> / 58 °C
<i>gna3aa3R</i>	ATATAGCTCCACGGCCAATTC	Clonagem do gene <i>gna3</i> e construção do vetor pB <i>gna3QL</i> / 58 °C
<i>gna3aa3NF</i>	<u>AATCTAGATTGAAGCGATCCCAGGATC</u>	Clonagem do gene <i>gna3</i> e construção do vetor pB <i>gna3QL</i> / 58 °C
<i>gna3aa5NR</i>	<u>ATGAATTCCACGGCCAATTCTTTG</u>	Clonagem do gene <i>gna3</i> e construção do vetor pB <i>gna3QL</i> / 58 °C
<i>gna3orfF</i>	GAATGCACTCCAATTGCTCAC	Reações de PCR para confirmação da mutação <i>gna3QL</i> /58 °C
<i>gna3orfR</i>	CACAGGTGCTCGTGAA CGTAC	Reações de PCR para confirmação da mutação <i>gna3QL</i> /58 °C
CBH1F	TCGGCCTGCACTCTCCAATC	Reações de PCR para

CBH1R	TGGAGTCCAGCCACAGCATG	obtenção da sonda cbh1/ 57 °C Reações de PCR para obtenção da sonda cbh1/ 57 °C
CBH2F	ATTCTCACCACGCTGGCTAC	Reações de PCR para obtenção da sonda cbh2/ 57 °C
CBH2R	CGGCGTAGTTGATGCACTC	Reações de PCR para obtenção da sonda cbh2/ 57 °C
trblr1F	TGTGCCTTTGTCGTTTGTG	Reações de PCR para obtenção da sonda blr1/55 °C
trblr1R	GACCGATATGACGTGGACC	Reações de PCR para obtenção da sonda blr1/55 °C
trblr2F	GCATGAGGAAGAAGGACG	Reações de PCR para obtenção da sonda blr2/55 °C
trblr2R	GGAACTGTACCGCAGTCAG	Reações de PCR para obtenção da sonda blr2/55 °C
env1neu1F	ATGCCGGCGTTGACATTAACCC	Reações de PCR para obtenção da sonda env1/55 °C
env1neu1R	ACGCATCTATTGGATATCTCCC	Reações de PCR para obtenção da sonda env1/55 °C

MÉTODOS

Origem e manutenção do fungo

O fungo *T. reesei*, linhagem mutante, auxotrófico para uridina, TU-6 (= ATCCMYA-256) foi obtido da coleção do Laboratório de Biotecnologia molecular da Research Area Gene Technology and Applied Biochemistry, Institute for Chemical Engineering, Vienna University of Technology, Áustria. Os fungos foram mantidos em meio MEX ou meio mínimo com repiques periódicos. Para o TU-6, o meio foi suplementado com 10 mM de uridina Sigma® em todos os experimentos.

Bactéria hospedeira para propagação de vetor

A linhagem de *E. coli* JM109 (Yanish-Perron et al., 1985), mantida em meio LB/glicerol a -80 °C foi utilizada para propagação de vetores e manipulação de DNA.

Condições de cultura

Para os experimentos de indução, as linhagens de *T. reesei* foram crescidos em Erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL de meio Mandels-Andreotti contendo 1 % de glicose, glicerol, celulose ou sofrorse, dependendo do experimento, a 200 rpm, em agitador orbital, e 28°C por 24 horas, no caso de indução por glicose e glicerol, 96 horas com celulose e 6 horas para sofrorse, onde o micélio foi previamente crescido em glicerol por 24 horas. Após a indução, os micélios foram coletados por filtração e congelados e estocados a -80°C e usados no isolamento de AMPc intracelular e RNA. O sobrenadante de cultura foi utilizado como fonte de celulase. Os experimentos de indução por celulose e sofrorse foram realizados tanto na presença quanto na ausência de luz.

Para a produção das enzimas líticas, uma suspensão de esporos (10^8 esporos/mL) foi inoculada em meio Mandels-Andreotti suplementado com 1 % de glicose como fonte de carbono. As culturas foram crescidas como anteriormente por 24 horas. Após esse tempo, os micélios foram coletados por filtração e lavados com 500 mL de solução salina 0,9 % estéril. 250 mg de micélio foram transferidos para meio mínimo (solução mineral) contendo 5 g/L de parede celular de *P. ultimum* como fonte de carbono. As culturas foram crescidas como anteriormente por 72 horas. Os micélios foram então coletados por filtração e congelados e estocados a -80°C e usados no isolamento de

AMPc intracelular. O sobrenadante de cultura foi dialisado contra água a 4°C, congelado e utilizado como fonte de enzimas líticas.

Para as extrações de DNA os fungos foram crescidos em meio Mex por 24 horas a 28°C a 200 rpm. Para a propagação dos vetores construídos, a linhagem de *E. coli* JM109 foi inoculada em meio LBAamp e incubada a 37°C a 200 rpm por 16 horas.

Purificação da parede celular de *P. ultimum*

Cerca de 10 a 20 discos de ágar (BDA) contendo micélio de *P. ultimum* foram inoculados separadamente em frascos de 1 L contendo 500 mL de meio BDA líquido. Estes frascos foram incubados à temperatura de 28°C sob agitação constante de 180 rpm em agitador rotatório por 7 dias. Após este tempo, o micélio foi coletado por filtração e utilizado na purificação de parede celular.

O micélio de *P. ultimum* foi primeiramente macerado com nitrogênio até a obtenção de um pó fino e branco. Após maceração, o micélio foi tratado com uréia (8 M p/v). Em seguida os extratos de parede celular foram centrifugados por 15 minutos sob rotação de 12.000 g, o sobrenadante das preparações foi descartado, e os precipitados lavados com água destilada. Os precipitados obtidos após as lavagens anteriores foram homogeneizados com uma solução de hidróxido de amônio (1 M v/v), centrifugados por 30 min a 12.000 g, e os precipitados lavados com água destilada como descrito anteriormente. Os precipitados da última lavagem foram ressuspensos em ácido fórmico 0,5 M e novamente centrifugados e lavados com água destilada como citado anteriormente. Na última lavagem o pH foi ajustado para pH 6,0 e os precipitados obtidos foram liofilizados e utilizados como fonte indutora (Mitchell e Taylor, 1968).

Preparação de DNA plasmidial

Pequena escala (Miniprep)

As preparações foram feitas utilizando o kit QIAGEN® Plasmid Purification. Células de *E. coli* transformadas com o plasmídeo de interesse, crescidas em 4 mL de meio LBamp durante 16 horas a 37 °C e 200 rpm, foram coletadas por centrifugação a 6.000 g por 3 min. O sedimento foi ressuspenso em 300 µL de solução P1. Foram adicionados 300 µL de solução P2 e as amostras foram homogeneizadas por inversão dos tubos por várias vezes. As amostras foram incubadas em gelo por 10 min e após, 300 µL de solução P3 foram adicionada e as amostras homogeneizadas novamente.

Após, as amostras foram centrifugadas por 20 min a 12.000 g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 900 µL de isopropanol. Os tubos foram incubados a -20°C de 30-60 min. Após esse período, os tubos foram centrifugados por 30 min a 12.000 g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com etanol 70 %. Após a retirada do etanol, as amostras foram secas ao ar e ressuspendidas em 30 µL de água ultra-pura.

Média escala (Midprep)

As preparações foram feitas utilizando o kit Qiagen® Plasmid Midi. O procedimento foi o mesmo descrito acima, porém com algumas modificações: o volume utilizado de meio LBamp foi de 50 mL. O sobrenadante obtido após a etapa de centrifugação, após a adição de solução P3, foi passado em coluna Qiagen-Tip 100 previamente equilibrada com 4 mL de tampão QBT. A coluna foi lavada duas vezes com 10 mL de tampão QC e o DNA foi então eluído com 5 mL de tampão QF. O material eluído foi precipitado com 3,5 mL de isopropanol a temperatura ambiente. Após centrifugação a 15000 x g por 30 min a 4°C o DNA foi lavado com 2 mL de etanol 70 %, seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 100 µL de água ultra-pura.

Digestão do DNA com enzimas de restrição

Sistemas de digestão simples e/ou dupla foram utilizados para avaliar o tamanho dos insertos nos plasmídeos ou para experimentos de Southern blot. Para tanto foram utilizados a reação padrão: 5 µL de DNA (200 ng/µL) (cromossomal ou plasmídeo), 2 µL de tampão apropriado, 1 µL de enzima (10 U/µL) e 12 µL de água ultra-pura. Os sistemas de digestão foram incubados a 37 °C por 2 horas. Para experimentos de Southern blot, 10 µL de DNA e 2 µL de enzima foram utilizados e o tempo de reação foi de 12 horas.

Análise de DNA em gel de agarose

Os géis foram preparados com agarose tipo II em TAE 1 X com brometo de etídio (0,5 µg/mL) à 1 %. Após a montagem em moldes e pentes apropriados, verteu-se a agarose fundida em microondas e esperou-se pela solidificação. As amostras de DNA a serem analisadas foram preparadas em tampão de amostra 1 X. A corrida

eletroforética foi feita em TAE 1 X até a completa separação dos corantes e resolução das bandas visualizadas em U.V. a uma voltagem constante de 80-90 V. Após a corrida os géis foram fotodocumentados.

Ligação de fragmentos de DNA

As reações de ligação de fragmentos de DNA foram realizadas utilizando o kit de ligação TAKARA[®]. A relação de DNA e vetor foram de 1:1 (v/v). A esse sistema foi adicionado 1 volume de mistura de ligação. O sistema de ligação foi incubado a 16°C por 30 min. Essa mistura foi utilizada diretamente na transformação de células de *E. coli* competentes.

Preparo de células de *E. coli* competentes para transformação

Colônias isoladas de *E. coli* foram crescidas em 5 mL de meio LB a 37°C e 200 rpm por aproximadamente 16 h. 500 µL desta suspensão foram inoculadas em 250 mL de meio LB e incubado a 16°C sob agitação 200 rpm até atingir uma D.O de 0,5 a 600 nm. A cultura foi então resfriada em banho de gelo e as células coletadas por centrifugação a 6.000 g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 30 mL de CaCl₂ 100 mM e incubadas em gelo por 30 min. A seguir centrifugou-se novamente nas mesmas condições e as células então foram ressuspensas em 10 mL de solução de CaCl₂ 100 mM e DMSO 1 %. A suspensão de células foi dividida em alíquotas de 100 µL, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

Transformação de células de *E. coli*

Células competentes de *E. coli* foram incubadas em gelo até seu descongelamento. Imediatamente após o descongelamento o plasmídeo (no máximo 2 µL) ou o sistema de ligação (no máximo 20 µL) foi adicionado e a suspensão incubada por 40 min em gelo. Após esse período, as células foram submetidas a um choque térmico a 42°C por exatamente 2 min e posteriormente, os tubos foram transferidos novamente para o gelo e incubados por mais 5 min. Foram adicionados a esse sistema 200 µL de meio LB e incubado a 37°C por 30 minutos para a recuperação das células. Todo o sistema foi semeado em placas contendo meio LBAamp. Estas placas foram

então incubadas a 37°C por 16 a 18 h. Quando necessário, o sistema de seleção X-Gal/IPTG foi utilizado para seleção de clones possivelmente positivos para transformação com o vetor pBluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, CA, USA) de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante.

Amplificação do DNA por PCR

Os sistemas de amplificação de DNA foram preparados em um volume final de 50 µL. A quantidade de DNA molde inicial foi de 2,5 ng. Os oligonucleotídeos específicos foram utilizados na concentração de 0,1 nM. O sistema foi composto por 2,5 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 2 U de *Taq* DNA polimerase ou *Pfu* DNA polimerase, no caso da construção do vetor pB*gna3*QL, ambas da Fermentas[®] e tampão da respectiva DNA polimerase na concentração final de 1 X. A reação foi realizada em termociclador e os ciclos foram padronizados para todas as reações, exceto para a temperatura de anelamento que foi diferente para cada par de oligo utilizado. A desnaturação inicial foi realizada a 95°C por 3 min, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 1 min; temperatura de anelamento para cada oligo (ver tabela 3) por 1 min e 72°C por 1,5 min e uma extensão final de 72°C por 10 min e 4°C por tempo indeterminado. Após a amplificação, 10 µL do sistema de reação foram analisados em gel de agarose.

Clonagem do gene *gna3* de *T. reesei* e construção do vetor pB*gna3*QL

A pesquisa com *T. reesei* entrou na era genômica em 2005 (<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>). Baseado nessas informações e no gene de proteína Gαs de *T. reesei* (n.º acesso DQ993172) depositado no GenBank, oligonucleotídeos específicos foram desenhados tanto para a clonagem quanto para a geração de uma versão de GNA3 que não possui atividade GTPásica, por PCR. O processo ocorreu em três reações separadas.

No primeiro passo, duas reações paralelas foram preparadas. Os oligos *gna3aa5F*-GTTTGGCCCCGGATTGAAG (304) e *gna3aa5R*-CCACTTCTCCGCTCACTCCGTAGCC (2223) foram utilizados para amplificação da região 5' e os oligos *gna3aa3F*-GGCTACGGAGTGAGCGGAAGAAGTG (2197) e *gna3aa3R*-ATATAGCTCCACGGCCAATTC (3591) para amplificação da região 3'. As bases marcadas em cinza representam o ponto de mutação e os números entre parêntesis o local onde o oligo se anela. Após a análise por eletroforese em gel de

agarose, os fragmentos esperados foram purificados, usando-se o kit QIAquick PCR purification (QIAGEN®). Depois os dois fragmentos foram misturados e utilizados como molde para uma terceira reação para a obtenção do fragmento mutado de ~3,2-kb (*gna3QL*). Os seguintes oligos *gna3aa5NF*-AATCTAGATTGAAGCGATCCCAGGATC (316) e *gna3aa3NR*-ATGAATTCACGGCCAATTCTTTG (3582) e, contendo os sítios de restrição (sublinhados) *EcoRI* e *XbaI*, respectivamente, foram utilizados. A figura 9 esquematiza o processo.

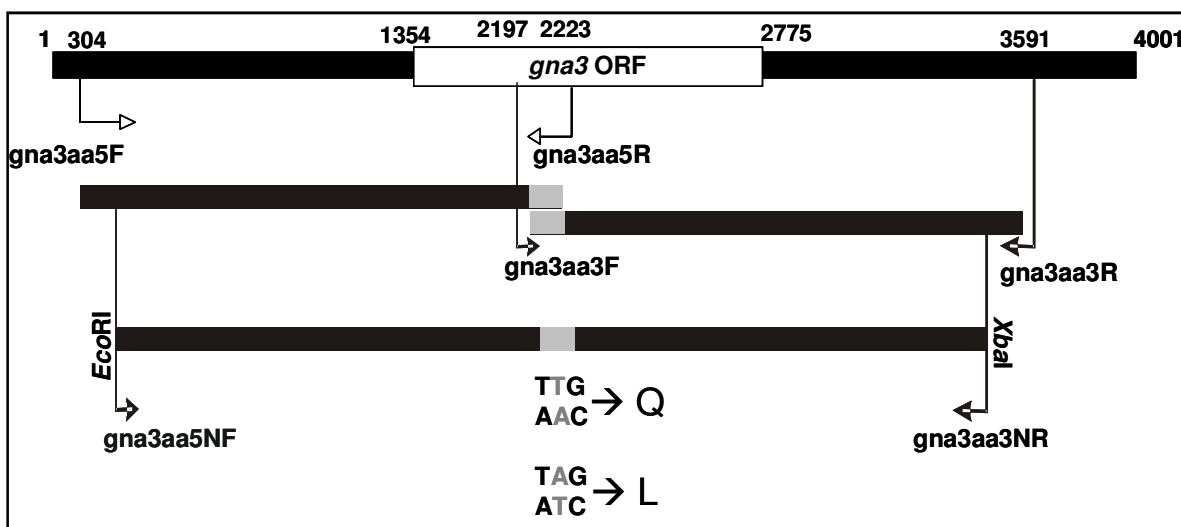


Figura 9. Representação esquemática da estratégia para obtenção do fragmento *gna3QL*. A primeira barra em preto representa o gene *gna3* com 1000 pb da região 5' e 3' e a ORF. As duas barras sobrepostas em preto representam os fragmentos obtidos da primeira etapa da PCR mutagênica já com as mutações inseridas, representado em cinza. A barra em preto com uma marca em cinza representa o fragmento mutado QL onde Q (glutamina) e L (Leucina).

Após a digestão com as respectivas enzimas de restrição, o fragmento foi clonado em *EcoRI*-*XbaI* no vetor pBluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, CA, USA) e o fragmento correspondente a *gna3QL*, submetido a seqüenciamento para a confirmação da inserção da mutação desejada.

Sequenciamento do fragmento *gna3QL*

Para o sequenciamento do fragmento *gna3QL*, um clone positivo foi selecionado e seu plasmídeo isolado. Após a confirmação da presença do inserto, através de digestão com enzimas de restrição, o plasmídeo foi encaminhado para sequenciamento automático pela empresa VBC-Biotech Services GmbH (Viena, Austria). As seqüências obtidas foram analisadas nos programas Blast (Altschul et al., 1990) e CLUSTAL V (Higgins e Sharp, 1988).

Transformação de *T. reesei*

Para a transformação de *T. reesei*, usou-se a técnica de protoplasto descrita por Gruber et al. (1990). Para a preparação dos protoplastos adicionou-se 0,075 g de enzima de lise (*Trichoderma harzianum*, Sigma L-1412) a 15 mL da solução A. A solução foi filtrada em filtro estéril de 0,20 µm em tubo tipo falcon estéril de 50 mL. Cerca de 2-3 mL desta solução foi colocada numa placa de petri (50 mm) onde foi adicionado um disco de celofane contendo o *Trichoderma* previamente germinado. Alternou-se a solução com os discos até a obtenção de 5 discos. O sistema foi incubado por 90 min a 30°C com agitação periódica. Após esse tempo, com a ajuda de uma espátula, os discos de celofane foram retirados, deixando-se os micélios dentro da placa. A suspensão de micélio foi pipetada repetidamente para se obter fragmentos pequenos de micélio. Após esse processo, a solução de micélio foi filtrada em funil estéril contendo lã de vidro e o filtrado coletado em um falcon estéril de 50 mL. O tubo foi então centrifugado por 10 min a 1.000 g a 4°C. cuidadosamente o sobrenadante foi decantado e o sedimento ressuspensionado em 4 mL de solução B. Novamente então, o tubo foi centrifugado nas mesmas condições, o sobrenadante decantado e os protoplastos então ressuspensionados em 600 µL de solução B.

Os protoplastos de *T. reesei* TU-6 foram co-transformados com 10 µg do vetor pB*gna3QL* e com 2 µg do fragmento de 2,7 kb correspondente ao gene *pyr4* excisado com *SalI* do vetor pFG1 (Gruber et al., 1990), que confere ao fungo prototrofia a uridina. Para tanto, 200 µL de protoplasto foram combinados com 10 µL da mistura de DNA e 50 µL de PEG em um falcon de 15 mL previamente resfriado em gelo. Mais 2 mL de PEG foram adicionados cuidadosamente e a mistura foi incubada por 5 min a 20 °C. Após esse tempo, 4 mL da solução B foi adicionado e misturado cuidadosamente. 1 mL dessa solução foi combinada com 4 mL de meio de cobertura previamente

temperado a 48 °C. A solução resultante foi colocada sob uma placa de petri contendo meio mínimo acrescido de sorbitol 1 M. Após 3-4 dias de incubação a 30 °C os transformantes foram isolados e transferidos para placa de petri de 30 mm contendo o mesmo meio acima descrito. Após a esporulação, os esporos foram isolados em meio Mex contendo Triton X-100 0,1 %. Esse processo foi repetido por três vezes até a obtenção de transformantes mitoticamente estáveis.

Extração do DNA total de *T. reesei*

Após o crescimento do fungo em meio Mex, o micélio foi macerado em nitrogênio líquido e imediatamente transferido para um tubo de polipropileno (eppendorf) contendo 800 µL de tampão de extração, 10 µL de RNase H (10 mg/mL) e 16 µL de β-Mercaptoetanol. A suspensão foi agitada em agitador tipo vórtex até a completa homogenização. Imediatamente, os tubos foram incubados a 65 °C por 20 minutos sob agitação. Após esse tempo, as amostras foram transferidas para o gelo e a extração se seguiu adicionando-se 400 µL de fenol saturado (pH 8,0) e 400 µL de clorofil. As amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas por 10 minutos a 12.000 g a 4°C. Os sobrenadantes foram então transferidos para tubos previamente preparados contendo 800 µL de clorofil, agitados e centrifugados como antes. Após, o sobrenadante foi transferido para outros tubos contendo 800 µL de isopropanol. As amostras foram agitadas gentilmente por inversão e incubadas em gelo por 5 min e então centrifugadas por 30 min a 12.000 g a 4°C. Após esse tempo, o isopropanol foi descartado e o DNA foi lavado com 300 µL de etanol 70%. Após a remoção do etanol, as amostras foram secadas a temperatura ambiente e ressuspendidas em 100 µL de ultra-pura autoclavada.

Para a retirada de moléculas de RNA remanescentes, as amostras foram tratadas com 10 µL de RNase A (10 mg/mL). A reação foi realizada a 37 °C por duas horas. Após esse período, as amostras foram estocadas a -20 °C.

Southern blot

Após a transformação com o vetor pB $gna3$ QL e o gene *pyr4*, o DNA dos transformantes foi isolado e digerido com *EcoRI/XbaI* e em outro sistema de digestão com *HindIII*. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8 % até a separação completa dos fragmentos desejados. O gel então foi submetido à transferência por capilaridade usando uma solução de NaOH 0,4 N. Os

fragmentos foram então transferidos para uma membrana de náilon Hybond N (GE Health Care[®]) por 16 horas. Após a transferência, a membrana foi fixada por 30 min a 80°C e submetida à hibridação.

Marcação e purificação de sonda radioativa

As sondas obtidas por de PCR, foram previamente purificadas pelo QIAquick PCR purification kit, QIAGEN[®] e ressuspendidas em 30 µL de água ultra-pura. Em um tubo colocou-se 11 µL de DNA (100 ng/µL) a ser marcado, 2 µL de tampão de random primer e 2 µL de Random primer (hexamerprimer, 0,05µg/µL), Fermentas[®]. O tubo foi incubado a 100°C por 3 min para proceder a desnaturação. Após, transferiu-se o tubo para o gelo e incubou-se por 15 min. A essa solução adicionou-se 2 µL de nucleotídeos, 2 mM (ATG), 2 µL ³²P dCTP (3.000 Ci/mmol, GE Health Care[®]) para Northern e 1 µL para Southern e 0,5µl de Klenow (10 U/µL, Fermentas[®]). O sistema foi incubado por 30-60 minutos a 38 °C em bloco aquecedor. Após esse tempo, adicionou-se 80 µL TE (pH 7,5-8,5) e inativou-se o sistema aquecendo-o a 75 °C por 10 min. A sonda foi então purificada através de coluna cromatográfica (seringa de 1 mL contendo resina Sephadex G50). A porcentagem de incorporação do nucleotídeo radioativo foi determinada medindo-se a radiação antes e depois da purificação em cintilador. Para a utilização, a sonda foi fervida por 5 min antes de ser adicionada à solução de hibridação.

Pré-Hibridação e Hibridação

Após a transferência dos ácidos nucléicos para a membrana, a mesma foi pré-hibridada por 30 minutos a 42°C (Northern) ou a 64°C (Southern) em garrafas de vidro apropriadas no forno de hibridização. Após, a sonda foi adicionada e a hibridação foi realizada por 16 horas nas mesmas condições citadas anteriormente. Após esse processo, a sonda foi descartada em recipiente apropriado ou estocada a 4°C por uma semana. A membrana foi então rinsada com uma solução 2 X SSC contendo 0,1 % de SDS. Depois a membrana foi lavada com a mesma solução por 15 minutos a 42°C (Northern) ou 64°C (Southern). Lavagens posteriores foram realizadas variando-se a estringência conforme desejado. Após as lavagens, a membrana foi envolta por película plástica e exposta a filme auto-radiográfico por tempo determinado de acordo com o experimento a -80°C.

Revelação dos filmes auto-radiográficos

A revelação dos filmes auto-radiográficos foi realizada em câmara escura por imersão do filme em solução reveladora GBX (Kodak®) por 30-60 segundos, interrupção em água por 30 segundos, seguidos de fixação por imersão em solução fixadora GBX (Kodak®) por 3 min, imersão em solução para retirada de background GBX (Kodak®) por 1 min e finalmente lavagem com água e secos ao ar.

Caracterização dos transformantes positivos

Os transformantes positivos, confirmados por Northern blot, foram submetidos a caracterização quanto ao crescimento vegetativo e observação da formação de esporos e comparados com a linhagem parental TU-6. Os fungos foram inoculados em meio MEX em placas de petri (90 mm) e incubados a 28 °C na presença e ausência de luz por 7 dias. Após esse período observou-se a presença ou não de esporos. Para a avaliação do crescimento vegetativo os fungos foram inoculados em meio MEX em tubos de 20 x 2 cm e incubados a 28 °C na presença e ausência de luz por 12 dias. O crescimento foi monitorado diariamente pela medida da distância percorrida.

Extração do RNA total de *T. reesei*

Todos os procedimentos envolvendo RNA foram realizados em condições livres de RNAses. Após os experimentos de indução, os micélios foram coletados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. Após, os micélios foram macerados em almofariz em presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino e branco. O material foi transferido para tubos de polipropileno previamente preparados contendo 700 µL de solução de Chirgwin previamente descongelada e 6 µL de β-Mercaptoetanol. Os tubos foram agitados vigorosamente em agitador tipo vórtex até a total dissolução do material triturado. Após esse procedimento, 70 µL de acetato de sódio 2 M pH 4, 700 µL de fenol equilibrado pH 4,0 e 200 µL de clorofil foram adicionados seguidos de agitação vigorosa após a adição de cada reagente. As amostras foram então incubadas em gelo por 15 min. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 min a 4°C. 900 µL do sobrenadante foi então transferido para tubos previamente preparados contendo 900 µL de isopropanol. Os tubos foram incubados a -20 °C por 1 h para a precipitação do RNA total. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 12 000 g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e o sedimento lavado com 300 µL de etanol 70 %

para a remoção dos sais. Cuidadosamente, o etanol foi removido e as amostras secas ao ar por aproximadamente 5 min. Finalmente o sedimento foi ressuspensionado em 100 μ L de água ultra-pura livre de RNAses. As amostras foram então utilizadas, após quantificação, em experimentos de Northern blot ou estocadas a -80 °C.

Quantificação de ácidos nucleicos

Para estimar a concentração de DNA as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 260 nm. Assumiu-se que uma unidade de absorvância correspondesse a 50 μ g/mL de DNA fita dupla e 40 μ g/mL de DNA fita simples.

Para a determinação da concentração de RNA adicionou-se 3 μ L de amostra a 900 μ L de água-DEPC em um tubo de 1,5 mL e agitou-se. A amostra foi então transferida para uma cubeta de quartzo e se determinou as leituras a 260 e depois a 280nm. Os resultados foram calculados seguindo a equação:

μ g de RNA/ μ L de amostra $\rightarrow C_{\text{RNA}} = (0.0625 \times E_{260} - 0.0355 \times E_{280}) \times \text{volume total} / \text{volume da amostra}$

A razão entre a leitura a 260 nm e 280 nm forneceu uma estimativa do grau de pureza da preparação, sendo utilizadas neste trabalho amostras que apresentaram razão igual ou superior a 1,8.

Alternativamente, concentrações de DNA e RNA foram estimadas em gel de agarose 1% com brometo de etídeo a 0,5 μ g/mL, por comparação visual com amostras padrão de concentrações conhecidas.

Northern blot

Após o isolamento e quantificação, 20 μ g de RNA total, com um volume máximo de 6 μ L, foram misturados com 27 μ L de tampão de desnaturação para RNA. As amostras foram incubadas por 30 min a 65 °C e colocadas imediatamente no gelo. Após a adição de 3 μ L de RNA dye, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,2 % em condições desnaturantes (18 % de formaldeído). O tampão de corrida utilizado foi MOPS na concentração 1 X. A corrida foi realizada com voltagem constante de 80 V. Para a transferência das amostras de RNA foram utilizadas membranas de náilon Hybond N⁺ (GE Health Care[®]), pelo método descrito por Sambrook et al. (1989). A membrana e dois pedaços de papel Whatman n° 3 (3mm)

foram cortados do mesmo tamanho do gel. Todos os componentes da transferência foram equilibrados em SSC10 X por 10 min. A transferência foi realizada por um período de 20 h. Após esse período os RNAs foram fixados a membrana, incubando-se a mesma a 80 °C por 30 min e então utilizada no processo de hibridação.

Extração e dosagem de AMPc

Após o crescimento do fungo em meio Mandels-Andreotti ou MEX, o micélio foi coletado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido. Para dosagem de AMPc, o micélio foi macerado até a obtenção de um pó branco e fino. As amostras então foram transferidas para tubos de polipropileno e imediatamente pesados. A seguir, a estes tubos, foram adicionados 10 volumes de HCl 0,1 M. Os tubos foram então centrifugados a 600 g a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi usado diretamente para as dosagens de AMPc utilizando o kit “direct cAMP enzyme immunoassay” Sigma[®], conforme instruções do fabricante. A concentração de AMPc foi expressa por concentração total de proteínas obtidas do mesmo extrato utilizado para as dosagens de AMPc.

Determinação da atividade enzimática e dosagens de proteínas

A atividade de celulase (FPase) utilizando papel de filtro como substrato foi medida como descrito por Mandels, Andreotti e Roche (1976). Uma tira de 1 x 6 cm de papel de filtro Whatman nº1 (50 mg) foi adicionada em um tubo de ensaio em seguida foram adicionados 500 µL de tampão citrato-fosfato 100 mM pH 5,0 e 500 µL de solução enzimática. A mistura foi incubada a 50 °C por 60 minutos. Após esse tempo, a concentração de açúcar redutor formada foi medida pelo método de ADNS segundo Miller (1959) por espectrofotometria a 550 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 mM de açúcar redutor por hora de reação.

A atividade de β-1,3-glicanase foi determinada pela mistura de 50 µL da amostra com 100 µL de tampão acetato de sódio (50 mM pH 5,0) contendo 0,25 % (p/v) de laminarina (Sigma). A mistura foi incubada a 40° C por 30 minutos. A concentração de açúcar redutor foi determinada por espectrofotometria a 550nm pelo método de ADNS (Miller, 1959), utilizando-se glicose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1

μmol de açúcar redutor por minuto de reação.

A atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAGase) foi determinada pela mistura de 50 μL da amostra, 100 μL de substrato (PNP-NAG 5 mM) e 350 μL de tampão acetato de sódio (50 mM pH 5,0) e incubadas a 37 °C por 15 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 1 mL de carbonato de sódio 0,5 M. A concentração de p-nitrofenol (pNP) liberada foi determinada por espectrofotometria a 405 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de pNP por minuto de reação.

A atividade de endoquitinase foi determinada pela reação com quitina coloidal (0,5 %) em tampão acetato de sódio (50 mM pH 5,5). Alíquotas de 500 μL de amostra foram incubadas com 500 μL de quitina coloidal sob agitação por 12 horas a 37 °C. A concentração de açúcar redutor foi determinada por espectrofotometria a 550 nm pelo método de DNS (Miller, 1959), utilizando N-acetil- β -D-glicosamina como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de açúcar redutor em uma hora de reação.

Para dosar a atividade de fosfatases ácidas, a mistura de reação consistiu de 350 μL de tampão citrato fosfato (100 mM pH 4,8), 100 μL de p-nitrofenil fosfato e 50 μL de solução enzimática. A mistura foi incubada a 37° C por 15 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 1 mL de hidróxido de sódio 100 mM. A absorbância determinada a 405 nm. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de pNP por minuto de reação.

A atividade proteolítica foi determinada incubando-se 0,2 mL da amostra com 0,5 mL de solução de azocaseína 0,4% em tampão citrato-fosfato (100 mM pH 5,0) em tubos tipo Eppendorff de 2,0 mL. A mistura foi incubada por 15 minutos a 37 ° C. Após esse tempo a reação foi parada com a adição de 0,7 mL de solução de TCA 20 % (m/v). Os tubos foram centrifugados a 12000 g por 15 minutos e 1 mL do sobrenadante transferido para tubos de ensaio contendo 0,2 mL de NaOH 3 M e a absorbância determinada a 440 nm. Uma unidade (U) de protease foi definida o correspondente de 1 unidade de absorbância por minuto de reação.

A atividade de lipase foi determinada utilizando o método espectrofotométrico com o p-nitrofenil-palmitato (p-NPP, Sigma-Aldrich Co., Wisconsin, US). 100 μL de enzima foram misturados com 100 μL de p-NPP 7 mM e 700 μL de tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0. A mistura foi incubada a 37 °C por 15 minutos. A reação foi

interrompida pela adição de 100 µL de carbonato de sódio 0,5M. A quantidade de pNP liberado foi medida a 405 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmoL de pNP por minuto de reação.

A concentração de proteínas foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando-se albumina bovina (Sigma) como padrão. A reação foi conduzida pela adição de 100 µL de amostra e 1 mL do reagente de Bradford. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse tempo, a leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro a 595 nm.

Avaliação da atividade antagonista de *T. reesei* sobre *P. ultimum*

A atividade de antagonismo de *T. reesei* sobre *P. ultimum* foi estudada através de confronto direto em placa em condições de normais de iluminação. Para isso discos de 5 mm das culturas foram tomados da margem de crescimento ativo do antagonista (*T. reesei*) e do fitopatógeno (*P. ultimum*), crescidos em meio BDA e transferidos para placa contendo meio BDA a uma distância de 4 cm um do outro. Após 24 horas do início da interação a avaliação foi realizada pela visualização da zona de interação com auxílio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Discos de cultura de 5 mm foram retirados das áreas de interação e fixados em solução à base de glutaraldeído 2 % e paraformaldeído 2 %, em tampão cacodilato 50 mM pH 7,2 por 12 horas a 4 °C. Após a fixação o material sofreu quatro lavagens em tampão cacodilato 50 mM pH 7,2 e foi pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio e tampão cacodilato em uma proporção 1:1 (v/v) por 1 hora no escuro. Posteriormente, o material sofreu uma série de quatro lavagens com tampão cacodilato 50 mM pH 7,2 e, em seguida foi desidratado em série aquosa de acetona a concentração de 30, 50, 70, 85, 95 e 100 %. O material permaneceu por 15 minutos em cada uma das concentrações, sendo que para a concentração final de 100 % o material recebeu duas lavagens de 10 minutos cada. Logo após a desidratação, foi feita a secagem ao ponto crítico, utilizando-se o equipamento de secagem ao ponto crítico Balzers CPD 030 (Bal-Tec, Fuerstentum, Liechtenstein). Em seguida o material foi vaporizado com ouro, durante 150 segundos, usando-se o “Sputter Coater” Balzers SCD 50 (Bal-Tec, Fuerstentum, Liechtenstein), completando-se assim o preparo do material para observação ao MEV. As

eletromicrografias foram realizadas com auxílio do microscópio Jeol, modelo JSM 840-AE (Jeol Ltda, Tóquio, Japão).

RESULTADOS

Clonagem e caracterização do gene *gna3* de *T. reesei*

Com base na seqüência do gene *tga3* de *T. atroviride* (Zeilinger et al. 2005), um ortólogo foi identificado no banco de dados da seqüência genômica de *T. reesei* (<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>) e essa seqüência foi utilizada para o desenho de oligonucleotídeos específicos para a amplificação e clonagem do gene. Após o sequenciamento, o gene correspondente consiste em uma seqüência aberta de leitura (ORF) predita de 1423 pb interrompida por 5 introns (taxado de cinza) e codifica para uma proteína de 356 aminoácidos (Figura 10). A seqüência de aminoácidos apresentou 97% de identidade com Tmk3 de *H. atroviridis* (*T. atroviride*), 91% com GP-3 alpha (nº acesso GenBank EAA76506.1) de *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*), 88% com MagA (nº acesso GenBank AAB65425.1) de *Magnaporthe grisea*, 86 % com GNA-3 (nº acesso GenBank AAG21364) de *N. crassa*, e 77% com GanB (nº acesso GenBank AAF12813) de *Emericella nidulans* (*Aspergillus nidulans*), as quais são consistentes com as funções de GNA3 e com as respectivas distâncias filogenéticas desses fungos.

A análise da região promotora correspondente a 1 kb amontante do códon de iniciação revelou a presença de um complementar para CCAAT-box na posição -120 (em negrito), 8 sítios de ligação complementar para Cre1(5' SYGGRG 3') (em negrito, itálico e sublinhado) e a seqüência complementar 5' CTGTGCTGTGCTGTGCTGTGCTGTGCTGTGC 3' na posição -774 (sublinhado), contendo 5 motivos sobrepostos de ligação EUM1, 5' CTGTGC 3, descritos recentemente por (Schmoll et al. 2005) em genes que são regulados por luz e um único sitio de ligação complementar EUM1 na posição -924 (tachado de preto) (Figura 10).

-1000 tgctgctgctgctccttgtaatagtattacgattctacaagtaatcatccagctgcaactggcttccaggc
 -929 acctdgcacagggcgacgcccacttggttggtacctgtcctgcaacaagaaaagcctcgcgggcaggggca
 -858 cgctcactttggcagcgcctcgacacttctgctcagcctgggtgcgacggccaaagcctcacagctcctc**cc**
 -787 **cggcacctccac**agcacagcacagcacagcacagcaacgagtcacaacctcctcgacaggcgagtc
 -716 tgcttccgcgcgccgagtccttgggaccgtcaccgtcaccgtccttttctgtcg**ccccggccggag**atct
 -645 gacgcctttcatcattgcccagcccggcacttgtgcttttgcggcggtcatctttcgtctccatcctt
 -574 ctttttgcttctccatctcttctctctccattctctccgctcctcccactaataactactcttcatcttt
 -503 ctctccccccatctaagctcacctctcgaaaaaccc**ccccgc**cgacctgctgcagctggttctgcgact
 -432 gcttgtgagcttctactgctgttggagacctactgctaccgcttctgctgcttacctacctcttattac
 -361 ttgaccttcccacgacatttggcgc**ctccgc**cgccgcattttctgccaact**ctccgc**taagctgcaac
 -290 **ccccagct**caggcgactcgat**caat**accatcccgacttttctgctcgtccccttccgaccagcagcaagcct
 -219 cagatcccaaacggacaacagacgacaagagccgctaagcatcgccgcccgcgctgcccgtacatcatcgt
 -148 cctcgagtgcgcccgtatgctgtgta**attgg**ctgcatggcaaaccaccttttggatccaaatcgcttc
 -77 gtctaccgattcgtcaagtcctcaaggaacgctgctcactctcgtcaggaatcgaagcgtgctgaagactcg
 -6 cccaccATGGGCGGCTGCATGAGCTCCAACAATGACGAGGTAGAGCAGAAAAAGAGGAGTCAGGCCATCGA
 1 M G G C M S S N N D E V E Q K K R S Q A I D

 65 CAAGGAGCTCGACGAGGACTCGAAACGACTACGGAAAGAATGCAAGATTCTATTGTAG**gtacgcttcccc**
 23 K E L D E D S K R L R K E C K I L L L

 136 **ccctccccgctgaatgcactccaattgctcaccgtcctgcttcttctag**GCTCCGGAGAGAGCGGCAAGTC
 42 G S G E S G K S

 207 GACGATTGTCAAGCAGATGAAGATTATCCACCTAAAGGGATACTCAGAAGAGGAGCTGTACAACCTACCGGC
 50 T I V K Q M K I I H L K G Y S E E E L Y N Y R

 278 CGACTGTCTTCAAGAACCTGGTCGAGTGTGCCAAAGCCGTCATCACGCCATGCAGCAGTTTGACATCGAG
 73 P T V F K N L V E C A K A V I T A M Q Q F D I E

 349 CTCGAGAAGGAGGAGAACAGAGCATACGCCACTTCTTGATAGACTACCAGCCGGAATCCGGGCCGCAAGC
 97 L E K E E N R A Y A D F L I D Y Q P E S G P Q A

 420 TCGCATCGACCCCAAGGTGGGCCTTGCCGTGCAGGCCATATGGAGCGACCCGGCCAAGGACCAGCTGATGG
 121 R I D P K V G L A V Q A I W S D P A K D Q L M

 491 AGCACCAGACGGAGTTCTACCTCATGGATTCTGCCGAGTA**gtaagtgcgccacgacgcattgccccccggt**
 144 E H Q T E F Y L M D S A E Y

 562 **tgatgctccagctctgaccataccgcctctgtag**CTTTTTCCAGGAAGCAATGCGCATCGTCGCGCCCAA
 157 F F Q E A M R I V A P N

 633 CTAATTGCCAATGAGATGGACGTGCTGCGTGCCCGAACAAAAACCACCGGCATCTACGAAACGCGTTTCC
 169 Y L P N E M D V L R A R T K T T G I Y E T R F

 704 AGATGGGCCAGCTGAGCATCCA**gtacgcttcacgagcacctgtggatthtagttccctgaagcttatccccg**
 192 Q M G Q L S I H

 775 **gcctccgctttcgaaacgcttttgaccaacggctgctgacctgtcccctctag**CATGTTTCGACGTCGGCGGG
 200 M F D V G G

 846 CAACGGAGTGAGCGGAAGAAGTGGATACTGCTTTGAAAACGTCACATCCATCATCTTCTGTGTTGCCCT
 206 Q R S E R K K W I H C F E N V T S I I F C V A L

 917 CAGCGAGTACGACCAGGTTCTCCTGGAGGAGAGCAGTCAG**gtaagcctgggcccaggtcccgcgctttgcg**
 230 S E Y D Q V L L E E S S Q

 988 **gcgctgatgctgactcgaccaacgcag**AATCGCATGATGGAGAGCTTATTGCTCTTGGACTCCGTGGTCA
 243 N R M M E S L L L F D S V V

 1059 ACTCAGCTGGTTTATGCGGACAAGCATCATCTTCTCAACAAGGTGGACATATTCAAGCAGAAGCTC
 257 N S R W F M R T S I I L F L N K V D I F K Q K L

 1130 GGTGCTTACCCTTATCCAACACTTTCCCGACTACACCGCGGCACCGATGTCAACAAGGCTGCCAATA
 281 G R S P L S N Y F P D Y T G G T D V N K A A K Y

 1201 TCTGCTATGGCGGTTCAACCAGGTCAACCGAGCACATCTCAACCTATACCCACA**gtgagtgacgatatgaa**
 305 L L W R F N Q V N R A H L N L Y P H

1272 **cgattcaaagctgccttgagcacttgactaacctgactgtccgtcatag**CCTCACACAAGCCACCGACA
 323 L T Q A T D
 1343 CATCGAATATCCGGCTCGTCTTTGCGGCAGTCAAGGAGACTATCCTCAACAACGCGCTCAAGGATTCGGGC
 329 T S N I R L V F A A V K E T I L N N A L K D S G
 1414 ATCCTCTAAgtctattctgtttgacttctctactgtccagatcaaccatcgatctatcctcttcgccaaag
 253 I L *
 1485 agggcgcagggatatacgcgcggattccactacagctatccggttgccgataatgatttagccaacgcgcgc
 1556 gagattcccgggtccgacgggtgcatgggccttctggcattctctcaaaccatcacgttctttcccatcggc
 1627 gatgacgacggagcccccttttggcgacgatcatggaccaaggcacctgcaaacactcaacgcctcgatctg
 1698 ttactttttctttctactattgtttcagcaaggcgcggtcactcattcgctcagacgatattcttcatctcc
 1769 ttgctcgtctttgtttccgccaccccgattgtttggttgccgatcacggtacagattccgcgcggcgact

Figura 10. Sequência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do gene *gna3*. A sequência em negrito representa CCAAT-box; As sequências taxadas em cinza representam os 5 íntrons presentes no gene *gan3*; as sequências em negrito, itálico e sublinhadas representam os sítios de ligação para Cre1; a sequência sublinhado representa 5 motivos sobrepostos de ligação para EUM1; a sequência tachada de preto representa o motivo de ligação isolado de EUM1.

Construção do vetor pB*gna3*QL

Para avaliar o envolvimento de Gna3 na indução de genes de celulase em *T. reesei*, um mutante carregando uma versão de *gna3* com atividade GTPásica intrínseca extinta, foi construído. Para tanto o aminoácido glutamina (Q) localizado na posição 206 da proteína, foi substituído por leucina (L), por PCR mutagênica. Mutações semelhantes em fungos tanto em $G\alpha$ s quanto em $G\alpha_i$, já foram realizados por outros autores (Regenfelder et al. 1997; Segers and Nuss 2003). Todos esses trabalhos têm mostrado que a troca desses aminoácidos leva ou a uma diminuição ou abolição total da atividade GTPásica intrínseca de $G\alpha$, permitindo uma ação constitutiva da mesma. A figura 11 mostra a análise eletroforética dos produtos de PCR (painel A) de PCR mutagênica (painel B) obtidos com os oligos específicos durante a construção do vetor pB*gna3*QL tendo como molde DNA total de *T. reesei*.

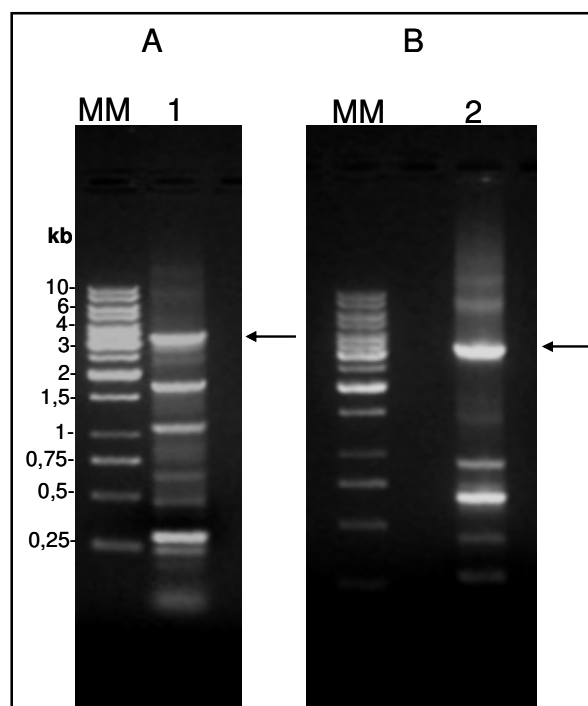


Figura 11. Análise eletroforética em gel de agarose 1 % com brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g/mL}$) dos produtos de PCR (A) e PCR mutagênica (B). As setas indicam o fragmento de ~ 3,2 kb correspondente ao gene *gna3*. MM- marcador molecular Gene Ruler™ 1kb DNA ladder Fermentas.

O fragmento de ~ 3,2 kb correspondente ao *gna3*QL foi retirado do gel, purificado, digerido com *EcoRI/XbaI* e clonado em pBluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, CA, USA) nos mesmos sítios. Após a transformação de *E. coli*, 10 colônias positivas para o sistema de seleção X-Gal/IPTG foram escolhidas e seus plasmídeos isolados. Os plasmídeos foram digeridos com *BamHI* e *EcoRI/XbaI* para a confirmação da inserção do fragmento e os resultados dos dois sistemas de digestão estão apresentados na figura 12.

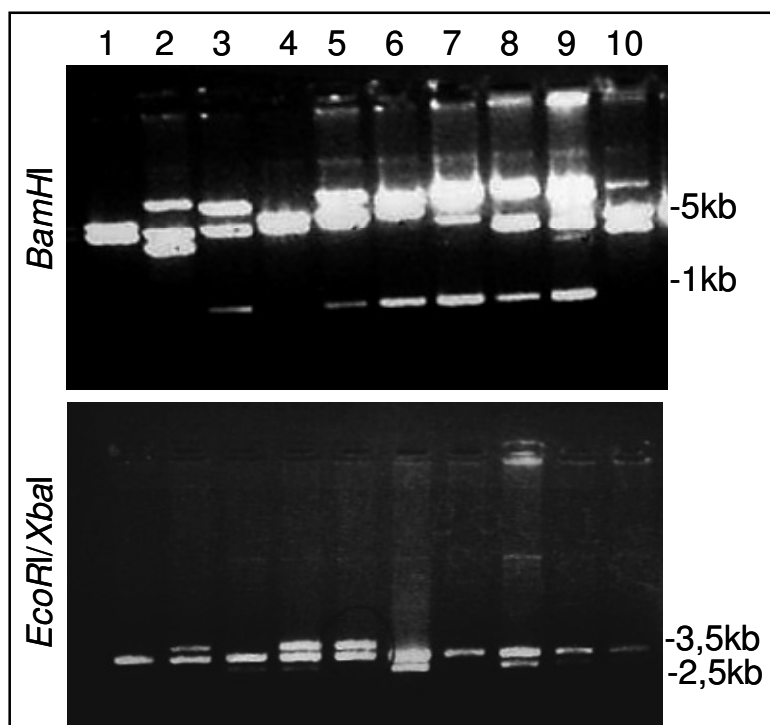


Figura 12. Análise eletroforética em gel de agarose 1 % com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) dos produtos da digestão com enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI/*Xba*I. Os números ao lado das figuras referem-se ao marcador de massa molecular Gene Ruler™ 1kb DNA ladder Fermentas.

Para a digestão com *Bam*HI os fragmentos esperados foram de 5286 e 930 pb, uma vez que o inserto apresenta um único sitio de restrição, sendo o outro sito localizado no vetor. Já para o sistema *Eco*RI/*Xba*I, os fragmentos esperados foram de 3284 e 2932 pb referente ao inserto e ao vetor respectivamente. Como se pode observar na figura 12, o clone 6 apresentou os fragmentos esperados em ambos os sistemas de digestão e foi então escolhido para sequenciamento.

A figura 13 mostra o alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidos a partir da seqüência de nucleotídeos obtidos após o sequenciamento do fragmento *gna3*QL do clone 6 e da seqüência *Gna3* disponível no banco de dados do genoma de *T. reesei*.

Gna3	1	MGGCMSNNDEVEQKKRSQAIDKELDEDESKRLRKECKILLGSGESGKSTIVKQMKIIHL	60
Gna3QL	1	MGGCMSNNDEVEQKKRSQAIDKELDEDESKRLRKECKILLGSGESGKSTIVKQMKIIHL	60
Gna3	61	KGYSEEELYNYRPTVFKNLVECAKAVITAMQQFDIELEKEENRAYADFLIDYQPESGPQA	120
Gna3QL	61	KGYSEEELYNYRPTVFKNLVECAKAVITAMQQFDIELEKEENRAYADFLIDYQPESGPQA	120
Gna3	121	RIDPKVGLAVQAIWSDPAKDQLMEHQTEFYLMDSAIEYFFQEAMRIVAPNYLPNEMDVLRA	180
Gna3QL	121	HIDPKVGLAVQAIWSDPAKDQLMEHQTEFYLMDSAIEYFFQEAMRIVAPNYLPNEMDVLRA	180
Gna3	181	RTKTTGIYETRFQMGQLSIHMFVGGQ ^R RSERKKWIHCFENVTSIIFCVALSEYDQVLLEE	240
Gna3QL	181	RTKTTGIYETRFQMGQLSIHMFVGG ^L RSERKKWIHCFENVTSIIFCVALSEYDQVLLEE	240
Gna3	241	SSQNRMMESLLLFDVSVNSRWFMRTSIIILFLNKVDIFKQKLGRSPLSNYFPDYTGTDVN	300
Gna3QL	241	SSQNRMMESLLLFDVSVNSRWFMRTSIIILFLNKVDIFKQKLGRSPLSNYFPDYTGTDVN	300
Gna3	301	KAAYLLWRFNQVNRAHLNLYPHLTQATDTSNIRLVFAAVKETILNNALKDSGIL*	356
Gna3QL	301	KAAYLLWRFNQVNRAHLNLYPHLTQATDTSNIRLVFAAVKETILNNALKDSGIL*	356

Figura 13. Alinhamento da seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento *gna3QL* com a seqüência Gna3 de *T. reesei* (<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>). As letras marcadas em cinza mostram o ponto de mutação desejado. O alinhamento foi realizado no programa BLAST (Altschul et al., 1990).

O alinhamento mostrou que a mutação desejada foi obtida com sucesso. Apesar de o processo de amplificação, durante a construção do vetor, ter sido feito com *Pfu* DNA polimerase, a qual possui uma maior fidelidade durante a síntese de uma nova molécula de DNA, ocorreu também uma mutação na posição 121. Assim, durante a PCR um ou mais nucleotídeos podem ter sido inseridos de forma errada, codificando para um aminoácido diferente, histidina (H) no lugar de serina (R). Entretanto, não existem dados na literatura que demonstrem que mutações que não sejam nas posições 206, 204 e 181, alterem a função das proteínas G α s (Coleman et al., 1994; Segers e Nuss 2003).

Análise por Southern blot dos transformantes de *T. reesei* com o vetor pB*gna3QL*

No total 568 transformantes foram detectados, destes 145 foram plaqueados em meio MEX e após 3 etapas de purificação de cultura monospórica, 49 transformantes foram estáveis e selecionados para análise por Southern blot. Dentre estes 20

esporularam normalmente, 20 não esporularam e 9 esporularam de forma tardia. Estes dados são importantes, pois diversos trabalhos relatam a influencia de proteína G α no processo de esporulação em fungos (Zeilinger et al., 2005). A figura 14 mostra o mapa de restrição do gene *gna3* e do vetor pB*gna3*QL. Após a extração de DNA genômico dos transformantes, o mesmo foi submetido a dois sistemas de digestão. O primeiro com as enzimas *Eco*RI/*Xba*I para verificar a integração do cassete de transformação e o segundo sistema com a enzima *Hind*III para a verificação do número de cópias dessa integração no genoma de *T. reesei*.

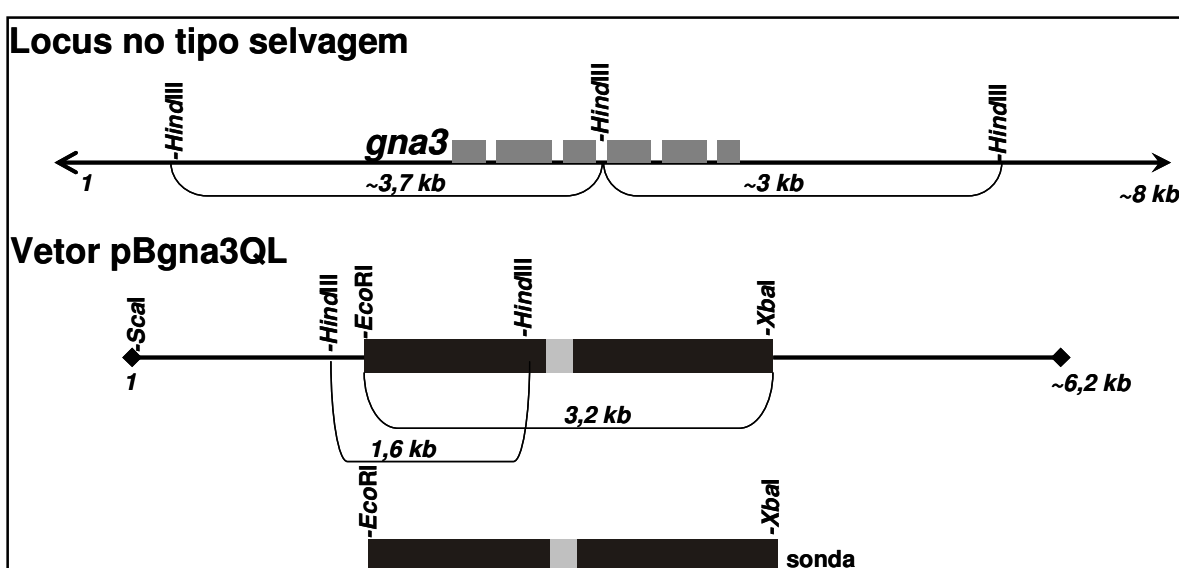


Figura 14. Mapa de restrição do gene *gna3* e do vetor pB*gna3*QL mostrando o tamanho esperado dos fragmentos após a digestão com as enzimas *Eco*RI/*Xba*I e *Hind*III. Os quadrados em cinza no lócus do tipo selvagem representam os 6 éxons do gene *gna3*.

Após a digestão com as enzimas citadas, o produto destas digestões foram separados por eletroforese em gel de agarose 1 % e posteriormente transferidos para membrana de náilon e então hibridados com a sonda *gna3*QL de ~3,2 kb excisada do vetor pB*gna3*QL. Os resultados do experimento de Southern blot estão mostrados na figura 15. Como se pode observar na figura 15A, o fragmento esperado de ~3,2 kb, referente a digestão com *Eco*RI/*Xba*I, foi observado em três transformantes, S1A, S1B e N14A, onde os dois primeiros apresentaram esporulação tardia e o último não esporulou. Entretanto, quando analisado a frequência de integração do cassete no

genoma do fungo, apenas os transformantes S1B e N14A foram positivos (figura 15B). Ao que parece o cassete de transformação se integrou com apenas uma cópia no genoma do fungo visto que além dos fragmentos referentes ao gene *gna3*, de ~3,7 e ~3 kb, apenas o fragmento de 1,6 kb foi identificado nos transformantes positivos com digestão com *HindIII*.

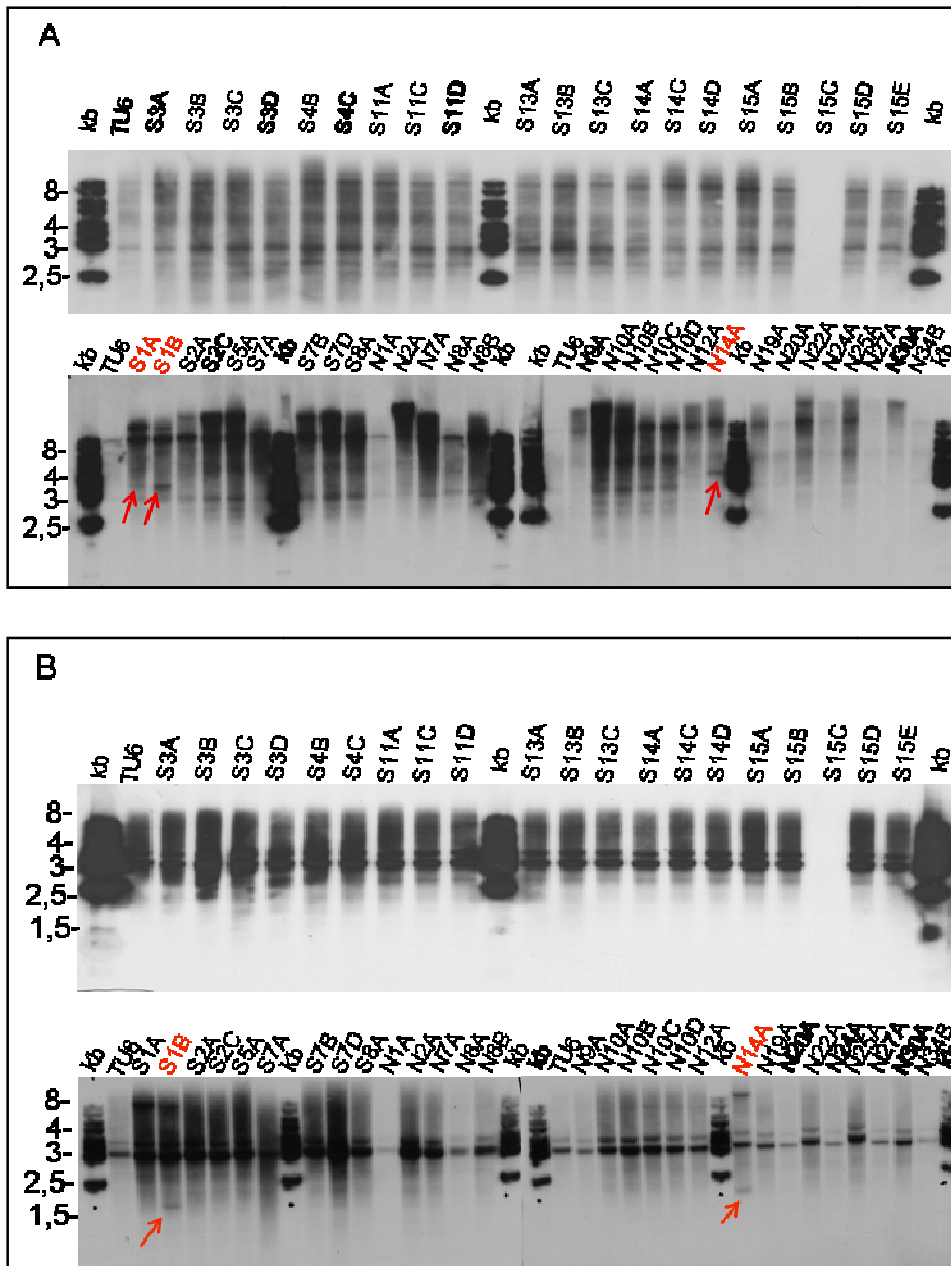


Figura 15. Análise por Southern blot do perfil de hibridação do DNA total dos transformantes de *T. reesei* digerido com *EcoRI/XbaI* (Painel A) e *HindIII* (painel B) e hibridados com a sonda *gna3QL*. A nomenclatura dos transformantes seguiu o seguinte padrão: a primeira letra refere-se ao comportamento observado no processo de esporulação (S= esporulou, ou esporulou tardiamente) e (N= não esporulou); o número que se segue representa o número da placa a qual o transformante foi isolado; e a letra representa a ordem em que o transformante foi retirado da placa. As setas mostram os fragmentos esperados gerados após a digestão. kb refere-se ao marcador de massa molecular Gene Ruler™ 1kb DNA ladder Fermentas.

Caracterização dos transformantes e dosagem de AMPc

Os dois mutantes positivos foram submetidos à caracterização quanto ao crescimento em placa e em tubos (“race tubes”) (Merrow et al., 2001). Nenhuma diferença entre os dois mutantes foi observada nesses experimentos, portanto a partir de agora serão apresentados resultados referente a um mutante denominado de *gna3QL*. A figura 16 mostra os resultados destes experimentos.

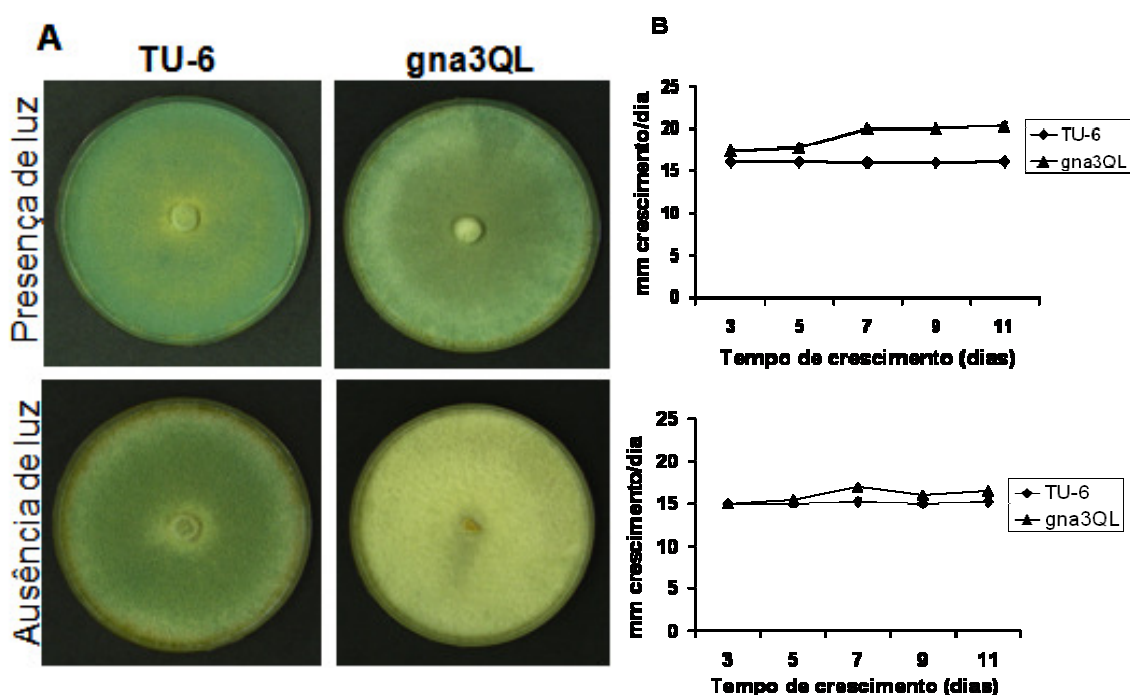


Figura 16. Crescimento em placa (painel A) e em tubo (painel B) do mutante *gna3QL* e na linhagem parental TU-6. Os fungos foram inoculados em meio MEX e incubados a 28°C por 7 dias (A) e 12 dias (B), na presença ($25 \mu\text{mol f\u00f3tons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$; 1800 lux) e na ausência de luz. Os gr\u00e1ficos representam a m\u00e9dia de dois experimentos independentes.

O mutante *gna3QL* apresentou consider\u00e1vel diminui\u00e7\u00e3o na esporula\u00e7\u00e3o em meio MEX quando comparado com seu parental TU-6 em presen\u00e7a de luz e n\u00e3o esporulou na aus\u00eancia de luz (Figura 16A). Em rela\u00e7\u00e3o ao crescimento vegetativo, o mutante *gna3QL* e o TU-6 n\u00e3o apresentaram diferen\u00e7as significativas no crescimento, em aus\u00eancia de luz ap\u00f3s 12 dias de incuban\u00e7\u00e3o. Entretanto, na presen\u00e7a de luz, o mutante *gna3QL* cresceu a uma taxa di\u00e1ria de 20 % a mais do que a linhagem parental TU-6 (Figura 16B). Estes

dados sugerem que o gene *gna3* em *T. reesei* esteja envolvido nos processos de crescimento e esporulação e que estes são diretamente influenciados por luz.

Para confirmar se o mutante *gna3QL* tinha a atividade de adenilato ciclase constitutivamente ativada e conseqüentemente os níveis intracelulares de AMPc aumentado, o conteúdo deste segundo mensageiro foi quantificado e comparado com o parental TU-6. Os fungos foram crescidos em meio MEX por 4 dias a 28 °C em presença constante de luz. O micélio foi coletado e macerado em nitrogênio líquido e submetido à extração do AMPc. A concentração de AMPc foi expressa por proteína total quantificada no mesmo material (Figura 17).

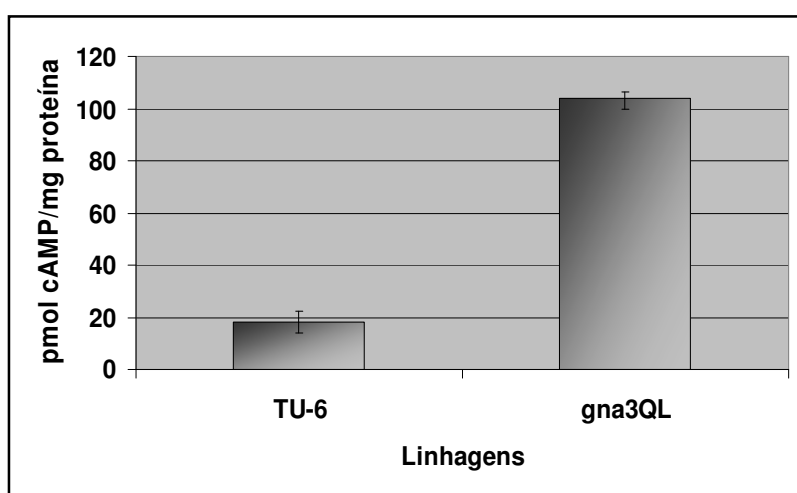


Figura 17. Concentração de AMPc na linhagem TU-6 e no mutante *gna3QL*. Os resultados foram expressos como média de três experimentos independentes com desvio padrão.

Os resultados mostram que o mutante *gna3QL* possui um conteúdo intracelular de AMPc de aproximadamente 6 vezes maior do que a linhagem parental TU-6, ou seja, $103,9 \pm 2,42$ e $18,2 \pm 4,1$ (pmol AMPc/ mg proteína) respectivamente.

Avaliação da expressão dos genes de celulase *cbh1* e *cbh2* por Northern blot e avaliação da atividade enzimática

Para verificar a influência da mutação Q206L no controle da expressão dos genes de celulase *cbh1* e *cbh2*, análises por Northern blot foram realizadas para a detecção do acúmulo de transcritos dos referidos genes. Os fungos foram inoculados em

meio Mendels-Andreotti, suplementados com 1% de celulose. Após 48, 72 e 96 horas de crescimento, os micélios foram coletados e o RNA total isolado. Após a separação do RNA por eletroforese em gel de agarose em condições desnaturantes, os mesmos foram transferidos para membrana de náilon e hibridizados com as sondas *cbh1* e *cbh2* obtidas por PCR. Os resultados estão apresentados na figura 18.

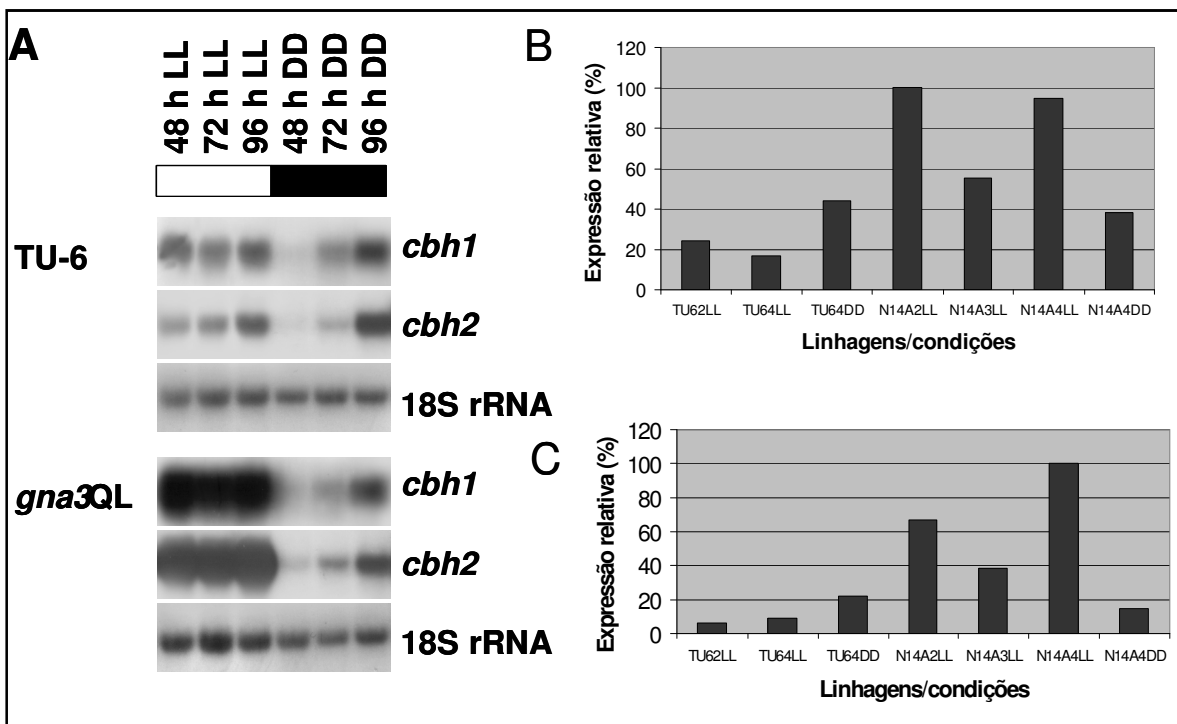


Figura 18. Análise da expressão dos genes de celulase, *cbh1* e *cbh2*, por Northern blot (painel A) após indução por celulose e quantificação por densitometria dos filmes radiográficos, gene *cbh1* (painel B) e *cbh2* (painel C). 20 μ g de RNA total foram utilizados por linha. LL, presença constante de luz (25 μ mol fótons. m^{-2} . s^{-1} ; 1800 lux); DD, ausência de luz. Tempos de incubação: 2, 48 horas; 3, 72 horas e 4, 96 horas. Para as quantificações a expressão foi normalizada pelo 18S e expressos em porcentagem. N14A=*gna3QL*

A figura 18A mostra que os genes *cbh1* e *cbh2* tiveram sua expressão aumentada no mutante *gna3QL* em relação a linhagem parental TU-6, porém esse aumento só foi observado em presença constante de luz. Alguns pontos foram submetidos à quantificação por densitometria e as análises mostram que essa expressão chegou a mais de 5 vezes tanto para o gene *cbh1* (figura 18B) quanto para *cbh2* (figura 18C). Em

contraste, nenhuma diferença significativa foi observada na expressão dos genes *cbh1* e *cbh2* no escuro entre TU-6 e *gna3QL*.

Para confirmar se o efeito deste aumento nos níveis de transcritos de *cbh1* e *cbh2* reflete também em um aumento da atividade celulolítica total, os sobrenadantes oriundos da mesma indução foram submetidos à avaliação de atividade enzimática de celulase total pelo método da fita de celulose (FPase). Os resultados são mostrados abaixo na figura 19.

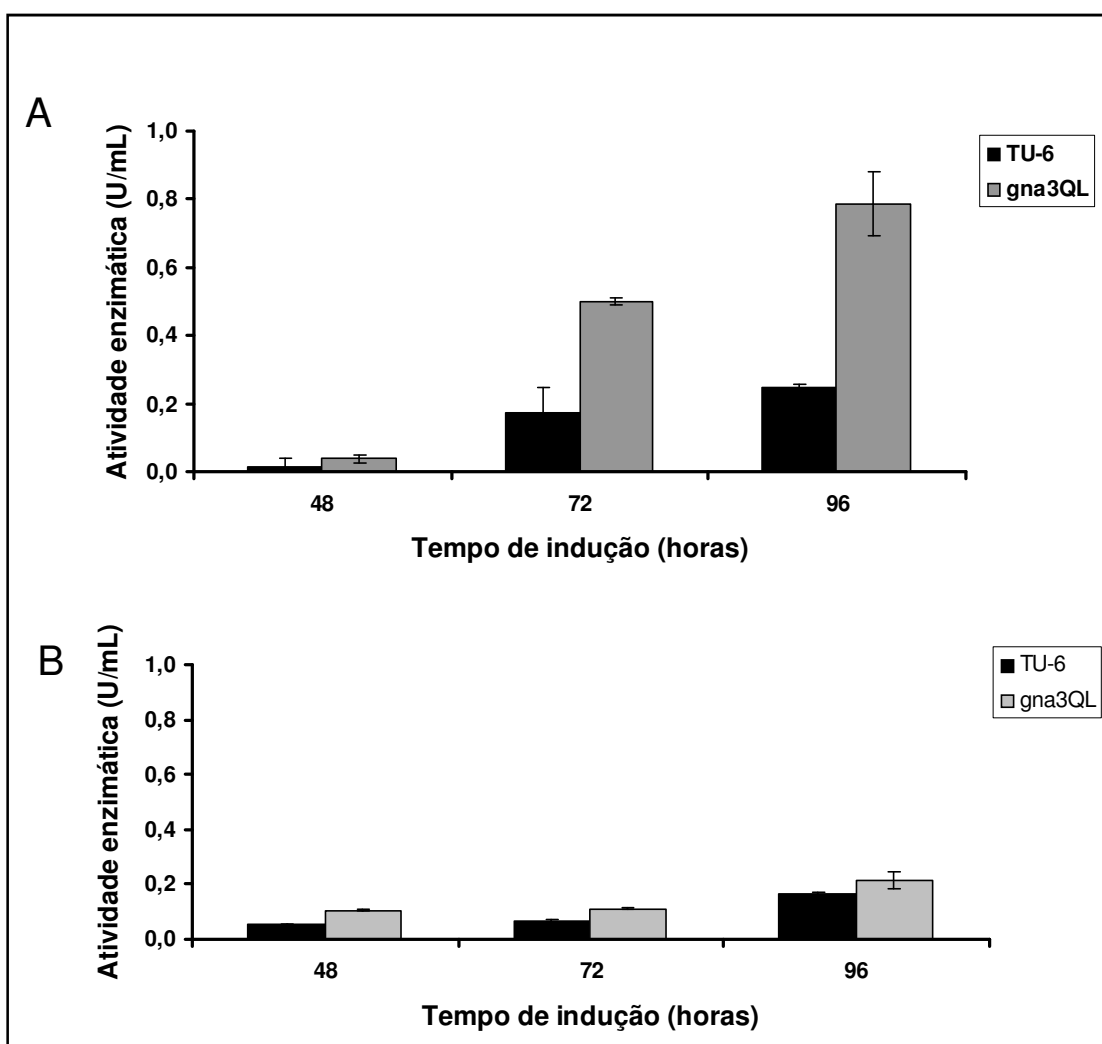


Figura 19. Atividade de celulase total (FPase) produzida pelo mutante *gna3QL* e pela linhagem parental TU-6 induzidos por celulose em presença constante de luz ($25 \mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 1800 lux) (A) e no escuro (B). Os fungos foram inoculados em meio Mendels-Andreotti, suplementados com 1 % de celulose. Ap\u00f3s 48, 72 e 96 horas de incubac\u00e3o, o sobrenadante foi recolhido e usando como fonte de celulase.

Os gráficos revelam que o mutante *gna3*QL apresentou uma maior atividade de celulase total do que a linhagem parental TU-6 em presença de luz (figura 19A). Após 96 horas de cultivo os valores de atividade do mutante *gna3*QL chegaram a ser aproximadamente 3 vezes maiores do que da linhagem TU-6, ou seja, $0,78 \pm 0,1$ e $0,24 \pm 0,01$ U/mL respectivamente. Os dados da figura 19B confirmam que a produção de celulase é influenciada por luz (Schmoll et al., 2005), pois uma menor atividade de celulase foi detectada tanto no mutante *gna3*QL quanto no seu parental TU-6 quando comparado com os experimentos realizados em presença de luz. Os valores encontrados para a atividade de celulase após 96 horas de indução no mutante *gna3*QL e no TU-6 não tiveram diferenças significativas sendo de $0,21 \pm 0,03$ e $0,16 \pm 0,01$ (U/mL) respectivamente. Os resultados demonstram que a via de sinalização para a expressão de celulase, em presença de celulose, por *T. reesei* pode ocorrer por *gna3* e este processo é influenciado por luz.

Outro indutor bastante interessante em termos de fisiologia do *T. reesei*, é a sofrorose. Acredita-se que a formação de celulase induzida por esse dissacarídeo ocorra por uma sinalização diferente daquela induzida por celulose (Fowler e Brown, 1992). Sendo assim a expressão dos genes *cbh1* e *cbh2* também foi avaliada nesta fonte de carbono. Os fungos foram crescidos primeiramente em meio Mendels-Andreotti suplementados com 1% de glicerol por 24 horas. Após esse período os micélios foram coletados, lavados com solução NaCl 0,9% e transferidos para o mesmo meio só que suplementados com 2 mM de sofrorose. Após 0, 2, 4 e 6 horas de incubação, tanto no claro quanto no escuro, os micélios foram coletados e o RNA total isolado. Após a separação dos RNAs em gel de agarose 1 % desnaturante, os mesmos foram transferidos para membrana de náilon e hibridados com as sondas *cbh1* e *cbh2* como anteriormente. Os resultados seguem na figura 20.

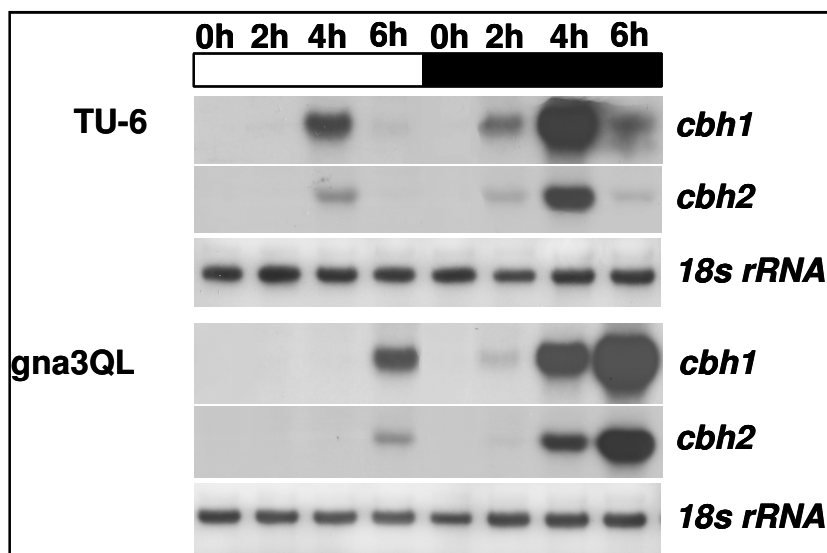


Figura 20. Análise da expressão dos genes de celulase, *cbh1* e *cbh2*, por Northern blot após indução por soforose. 20 μg de RNA total foram utilizados por linha. A barra acima da figura representa a condição do experimento: \square presença constante de luz (25 μmol fótons. m^{-2} . s^{-1} ; 1800 lux); \blacksquare ausência de luz.

A análise da figura 20 sugere que realmente a sinalização da formação de celulase por *T. reesei* quando induzido por soforose ou celulose possam ocorrer por vias distintas, uma vez que se observa um comportamento diferente no acúmulo de transcritos de *cbh1* e *cbh2* quando comparado com a figura 18. Diferente das induções com celulose, tanto o *gna3QL* e TU-6 apresentaram um maior acúmulo dos transcritos *cbh1* e *cbh2* no escuro. Além disso, o mutante *gna3QL* não apresentou um aumento na expressão de *cbh1* e *cbh2* em relação a linhagem TU-6 tanto no claro quanto no escuro. O que parece ter acontecido foi um retardamento de 2 horas para a transcrição desses genes no mutante *gna3QL*.

Foi avaliado também, o envolvimento de *gna3* na indução direta da expressão de celulase independente de indutor. A questão é se *gna3* estiver ligado diretamente com um receptor que sinaliza para a presença de celulose ou outro indutor, o mutante *gna3QL* teria uma expressão constitutiva de celulase. Para confirmar essa hipótese os fungos TU-6 e o mutante *gna3QL* foram cultivados em presença de glicerol e glicose (fontes de carbono não indutoras de celulase) por 24 horas no escuro e depois transferidos para o claro e após 15, 30 e 60 min os micélios foram coletados e o RNA

total isolado. Os resultados da análise da expressão dos genes de celulase *cbh1* e *cbh2* estão apresentados abaixo na figura 21.

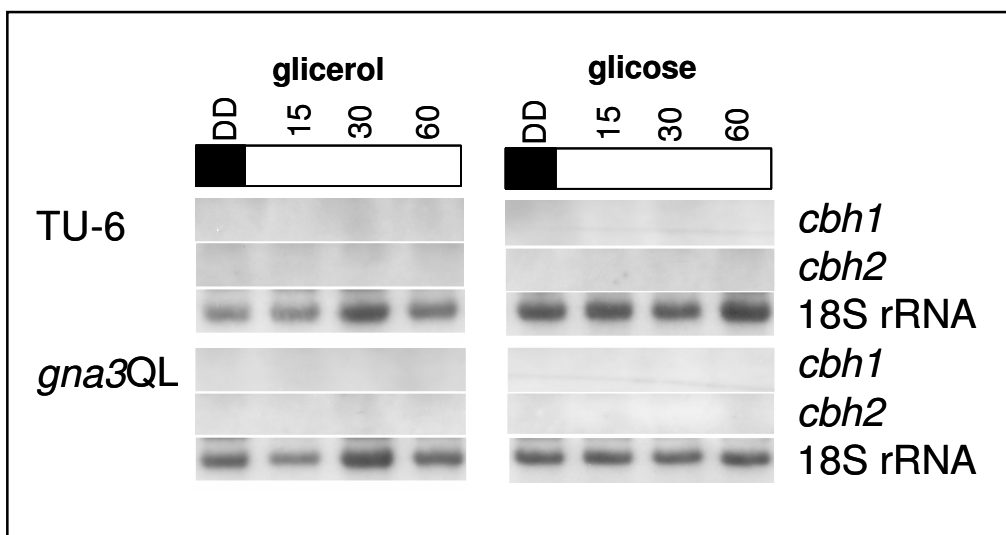


Figura 21. Análise da expressão dos genes de celulase, *cbh1* e *cbh2*, por Northern blot em meio contendo glicerol e glicose. 20 μ g de RNA total foram utilizados por linha. A barra acima da figura representa a condição do experimento: \square presença constante de luz (25 μ mol fótons. m^{-2} . s^{-1} ; 1800 lux); \blacksquare ausência de luz. Os números acima da figura representam o tempo de incubação em minutos. DD, pré-incubação por 24h no escuro.

Nenhum RNAm de *cbh1* ou *cbh2* foi detectado em TU-6 ou em *gna3QL* tanto em presença de glicerol ou glicose no claro ou no escuro (figura 21). Os resultados sugerem que a ativação constitutiva de GNA3 não leva nem a uma desrepressão catabólica nem a uma expressão constitutiva de celulases. Assim, mesmo que GNA3 participe do processo de indução da expressão de celulase, este é dependente de um indutor.

Análise da expressão de *gna3* e outros genes reguladores de luz (*blr1*, *blr2* e *env1*) por Northern blot

Foi constatado que *gna3* influencia a expressão de genes de celulase, porém somente em presença de luz. Nesse sentido foi analisado se a luz também regula a expressão do gene *gna3*. Para tanto, RNA total proveniente da mesma indução com celulose foi submetido à hibridação com a sonda pBgna3QL *EcoRI/XbaI*. Outros genes conhecidos por sofrerem regulação por luz também foram utilizados neste experimento

com duas finalidades: primeiro como controle do processo, ou seja, se os experimentos sofreram influência pela presença de luz ou não, uma vez que esses genes só se expressam em presença de luz (Schmoll et al., 2005); e segundo se a ativação constitutiva de G α s influencia na expressão desses genes. Neste ultimo caso, se positivo, a proteína G α s seria uma ligação entre a sinalização por luz e sinalização para indução por celulose. As sondas para *blr1*, *blr2* e *env1* foram obtidas por PCR. Os resultados desta análise estão mostrados na figura 22.

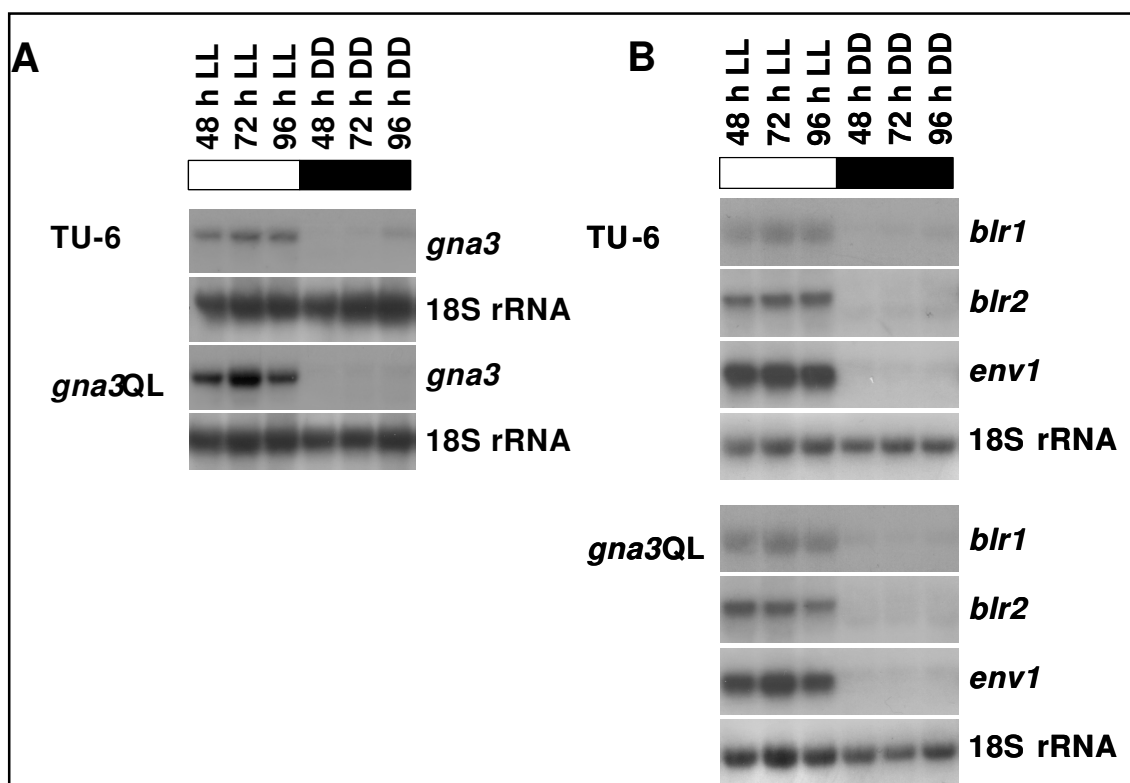


Figura 22. Análise da expressão dos genes *gna3* (painel A) e *blr1*, *blr2* e *env1* (painel B), por Northern blot após indução por celulose. Os micélios foram crescidos em meio Mandels-Andreotti suplementados com 1% de celulose microcristalina em presença constante de luz (25 μmol fótons. m^{-2} . s^{-1} ; 1800 lux) LL ou em ausência de luz DD por 48, 72 e 96 horas. 20 μg de RNA total foram utilizados por linha.

Os dados demonstram que o gene *gna3* sofre regulação pela luz, uma vez que um acúmulo de transcrito só foi observado em presença de luz, tanto em *gna3QL* quanto em TU-6 (figura 22A). Cabe ressaltar que a intensa quantidade de transcrito de *gna3* no mutante *gna3QL* pode ser resultado da cópia adicional do gene gerado durante

a transformação e não devido um aumento real gerada pela mutação Q206L propriamente dita.

Uma vez constatado que a expressão de celulase aumenta no mutante *gna3QL* na presença de luz foi investigado se a transcrição de outros genes regulados por luz, *blr1*, *blr2* e *env1* poderia sofrer influência devido à mutação em *gna3*. Os resultados da figura 23B mostraram que os genes *blr1*, *blr2* e *env1* são transcritos somente em presença de luz após o crescimento do fungo em celulose microcristalina e que essa transcrição específica em presença de luz não foi influenciada pela mutação Q206L no gene *gna3*. Estes resultados sugerem que *gna3* pode sinalizar para a transcrição de genes de celulase, porém atua ao um nível diferente à via de sinalização para sensor de luz.

Análise da capacidade antagonista de TU-6 e *gna3QL* contra *P. ultimum*

O envolvimento de Gna3 no antagonismo de *T. reesei* contra *P. ultimum* após três dias de crescimento em placa foi testado e os resultados mostrados na figura 23. Como se pode observar tanto a linhagem parental TU-6 quanto o mutante *gna3QL* foram capazes de inibir o crescimento de *P. ultimum* no confronto direto em placa. O mutante *gna3QL* cresceu mais rápido e esporulou menos do que a linhagem parental TU-6 nos primeiros 3 dias. Entretanto, ambos *gna3QL* e TU-6 cresceram menos e demoraram mais tempo para tomar toda a placa, quando comparados com *T. harzianum* ALL42 conhecido por sua atividade antagonista contra outros fitopatógenos.

A análise por MEV mostrou importantes mudanças na estrutura da parede celular e no crescimento de *P. ultimum* na zona de interação com *T. reesei* 24 horas após o contato (Figura 23). Na zona de confronto não foi observado enrolamento do *Trichoderma* sobre o *P. ultimum*, evento típico do processo de antagonismo. Porém, a possibilidade de que esse enrolamento tenha acontecido antes de 24 após o contato, não pode ser descartada. A figura 23 mostra que a linhagem parental TU-6 não foi capaz de formar orifícios na parede do fitopatógeno, mas esta se mostrou com aparência enfraquecida após 3 dias de interação. Por outro lado, o mutante *gna3QL* produziu uma grande quantidade de orifícios na parede de *P. ultimum*, mais do que o *T. harzianum* ALL42.

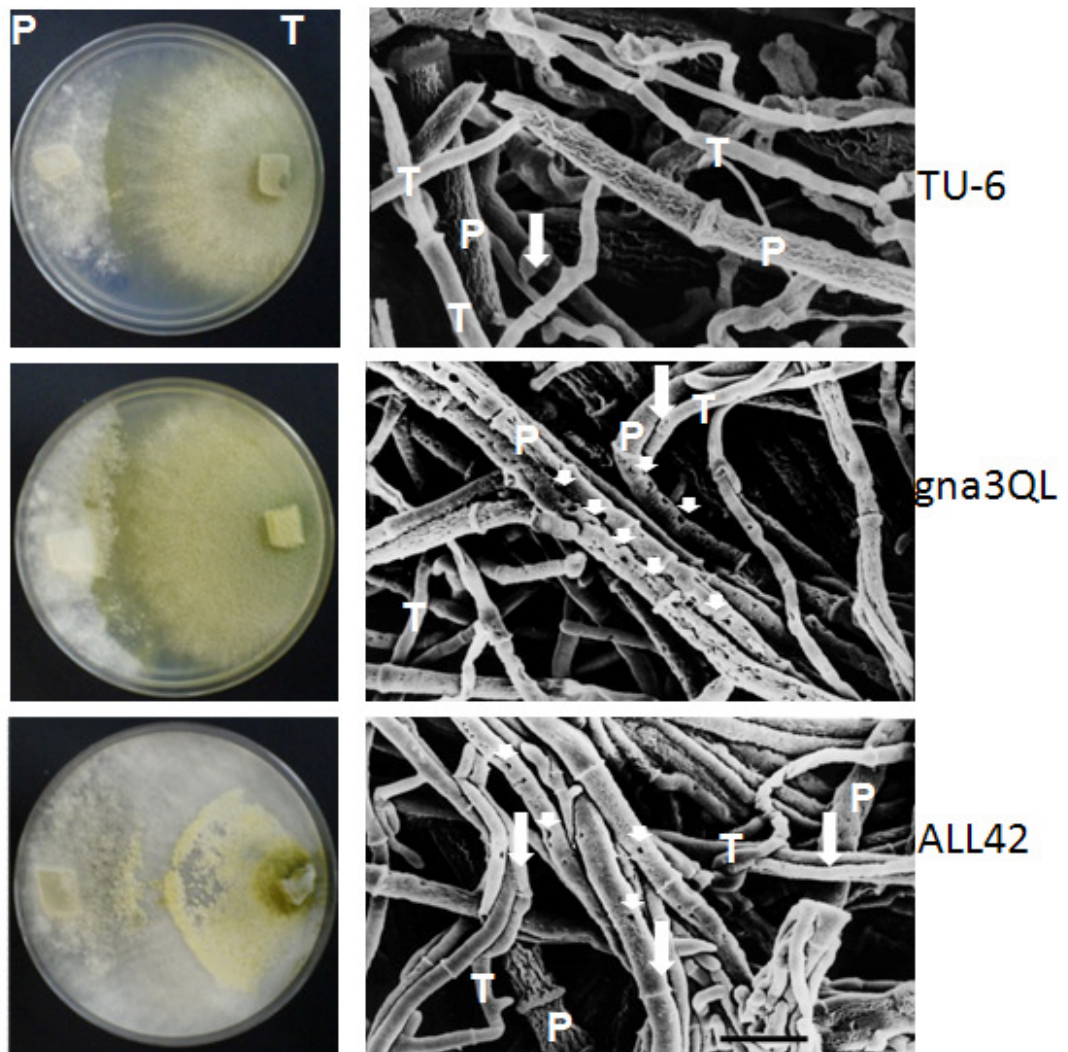


Figura 23. Fotografias do confronto direto em placa e microscopia eletrônica de varredura entre *T. reesei* (TU-6), *T. reesei* (*gna3QL*) and *T. harzianum* (ALL42) e *P. ultimum*, após 3 dias de inoculação. T= *Trichoderma*; P = *P. ultimum*; Bar = 10 μ m. As setas grandes indicam o contato entre T e P. As setas pequenas mostram os orifícios causados pela interação entre T e P. As análises por MEV foram feitas com aumento de 1.800 X.

Análise do conteúdo intracelular de AMPc

Com o intuito de verificar se a ativação constitutiva de GNA3 realmente promove um aumento nos níveis intracelulares de AMPc, o conteúdo de AMPc foi determinado após 72 horas de incubação do *Trichoderma* com parede celular de *P. ultimum* em meio líquido. Os resultados estão apresentados na figura 24. O mutante

gna3QL apresentou uma alta concentração intracelular de AMPc ($294 \pm 12,7$ pmol.mg⁻¹ proteína) quando comparado com o parental TU-6 ($102,23 \pm 6,4$ pmol.mg⁻¹ proteína) enquanto que o *T. harzianum* ALL42 apresentou $259,96 \pm 10,6$ pmol.mg⁻¹ proteína.

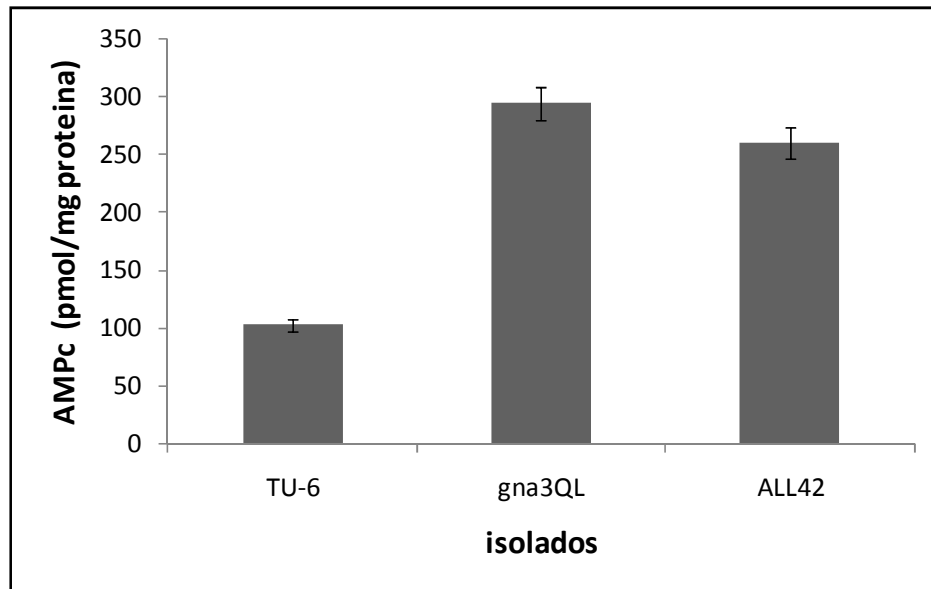


Figura 24. Conteúdo intracelular de AMPc de *T. reesei* (TU-6), *T. reesei* (*gna3QL*) e *T. harzianum* (ALL42) após 72 horas de incubação com parede celular de *P. ultimum* como fonte de carbono em meio líquido. Os resultados foram expressos como média de três experimentos independentes com desvio padrão.

Avaliação da atividade das enzimas líticas induzidas por parede celular de *P. ultimum*

Fatores como crescimento, enrolamento e produção de apressórios por si só não garantem um sucesso no controle biológico por *Trichoderma* sp. (Almeida et al., 2007). Espécies de *Trichoderma* precisam, além dos fatores citados, produzir enzimas líticas que degradem a parede celular do fitopatógeno (Viterbo et al., 2002). A produção de enzimas líticas por *T. reesei* (TU-6 and *gna3QL*) and *T. harzianum* (ALL42) induzidas por parede celular de *P. ultimum* foi testada. Os fungos foram previamente crescidos em meio Mandels-Andreotti contendo glicose como fonte de carbono e posteriormente transferidos para o mesmo meio contendo parede celular de *P. ultimum* como fonte de carbono. Após 72 horas de incubação a quantidade de proteínas secretadas e a atividade das enzimas líticas foram determinadas.

A figura 25 mostra a quantidade de proteína produzida por TU-6, *gna3QL* e ALL42. O ALL42 produziu uma maior quantidade de proteína ($107,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em relação a TU-6 ($83,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e *gna3QL* ($79,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$). No caso de TU-6 e *gna3QL*, os resultados sugerem que a mutação gerada na proteína GNA3 não afetou a taxa de produção de proteínas totais no *T. reesei*, porém não exclui a possibilidade de alteração no perfil das proteínas totais produzidas.

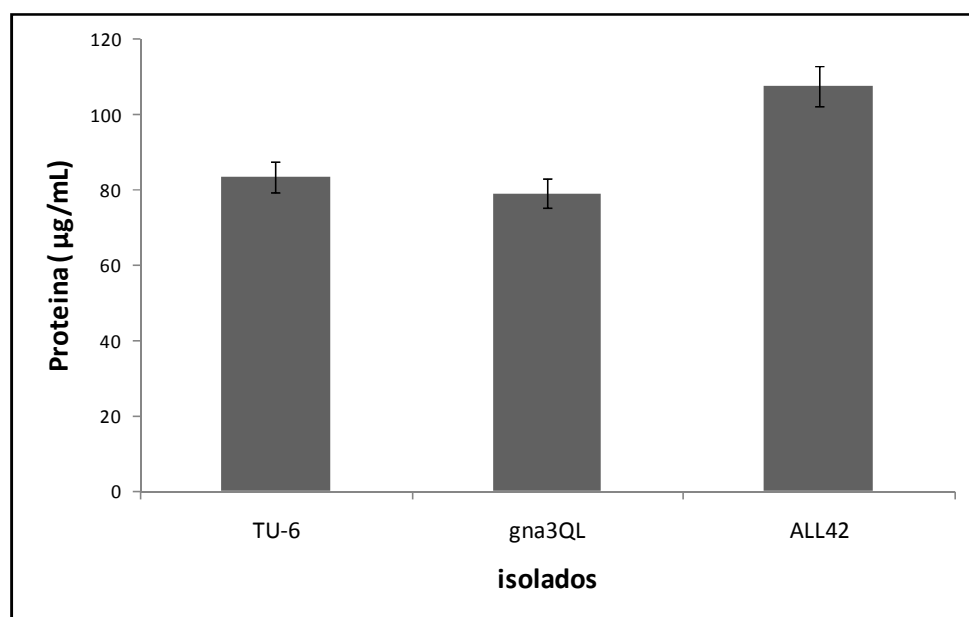


Figura 25. Conteúdo de proteínas totais produzidas por *T. reesei* (TU-6 e *gna3QL*) e *T. harzianum* (ALL42) após 72 horas de indução por parede celular de *P. ultimum* em meio líquido. Os resultados foram expressos como média de três repetições com desvio padrão menores do que 5%.

A figura 26 mostra a atividade de celulase dos isolados de *Trichoderma* estudados. TU-6 foi o melhor produtor de celulase ($10,3 \text{ U. mL}^{-1}$) seguido do *gna3QL* ($6,64 \text{ U. mL}^{-1}$) e ALL42 ($3,76 \text{ U. mL}^{-1}$). Apesar de o *Pythium* spp. apresentar uma grande quantidade de celulose em sua parede celular, cerca de 18% do total de polissacarídeo (Blaschek et al., 1992), o TU-6 não apresentou uma melhor ação antagonista, indicando que a celulase pode não ser importante no micoparasitismo. Outro fato é que esse experimento foi realizado em condições normais de laboratório, ou seja, na presença e ausência de luz (dia/noite), podendo explicar a razão de *gna3QL* não ter apresentado uma maior atividade de celulase. Além disso, como mostrado

anteriormente, a fonte de carbono utilizada para indução de celulase pode interferir na expressão dos genes de celulase.

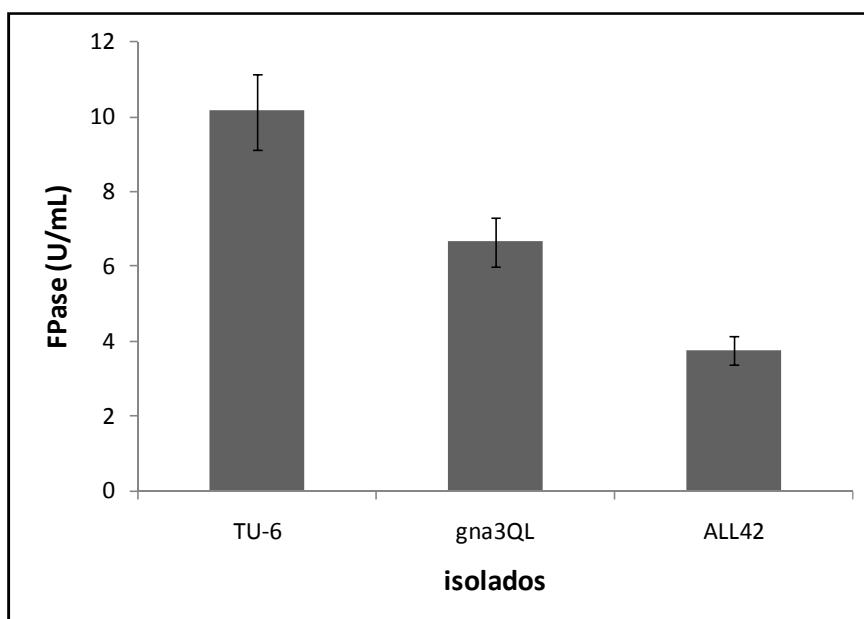


Figura 26. Atividade de celulase (FPase) produzida por *T. reesei* (TU-6 e *gna3QL*) e *T. harzianum* (ALL42) após 72 horas de indução por parede celular de *P. ultimum* em meio líquido. Os resultados foram expressos como média de três repetições com desvio padrão menor do que 5%.

Considerando que a parede celular dos fitopatógenos em geral é formada em sua maior parte por glicana e quitina, a atividade de β -1,3-glicanases, endoquitinase e NAGase também foram determinadas.

O mutante *gna3QL* mostrou um padrão semelhante na produção de endoquitinase e NAGase (Figura 27 e 28), aproximadamente 2 vezes mais do que o parental TU-6. A produção de endoquitinases pelo ALL42 ($0,71 \text{ U. mL}^{-1}$) foi maior do que em TU-6 ($0,19 \text{ U. mL}^{-1}$) e *gna3QL* ($0,36 \text{ U. mL}^{-1}$). O mesmo padrão também foi observado para NAGase, ou seja, ALL42 ($12,91 \text{ U. mL}^{-1}$), TU-6 ($0,63 \text{ U. mL}^{-1}$) e *gna3QL* ($2,62 \text{ U. mL}^{-1}$). Um dado interessante é que mesmo em pequena concentração na parede celular de *P. ultimum*, menos de 1% do total de polissacarídeos (Bartnicki-Garcia, 1968), a quitina é capaz de induzir uma alta atividade enzimática em *T. harzianum*, o que demonstra uma possível especialização deste fungo na produção de quitinases.

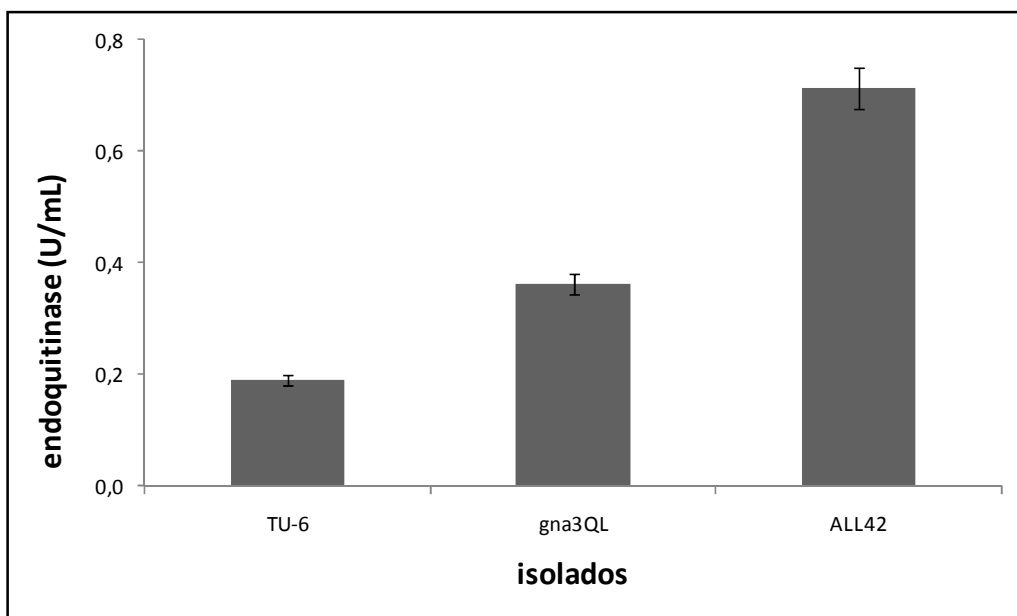


Figura 27. Atividade de endoquinase produzida por *T. reesei* (TU-6 e *gna3QL*) e *T. harzianum* (ALL42) após 72 horas de indução por parede celular de *P. ultimum* em meio líquido. Os resultados foram expressos como média de três repetições com desvio padrão menor do que 5%.

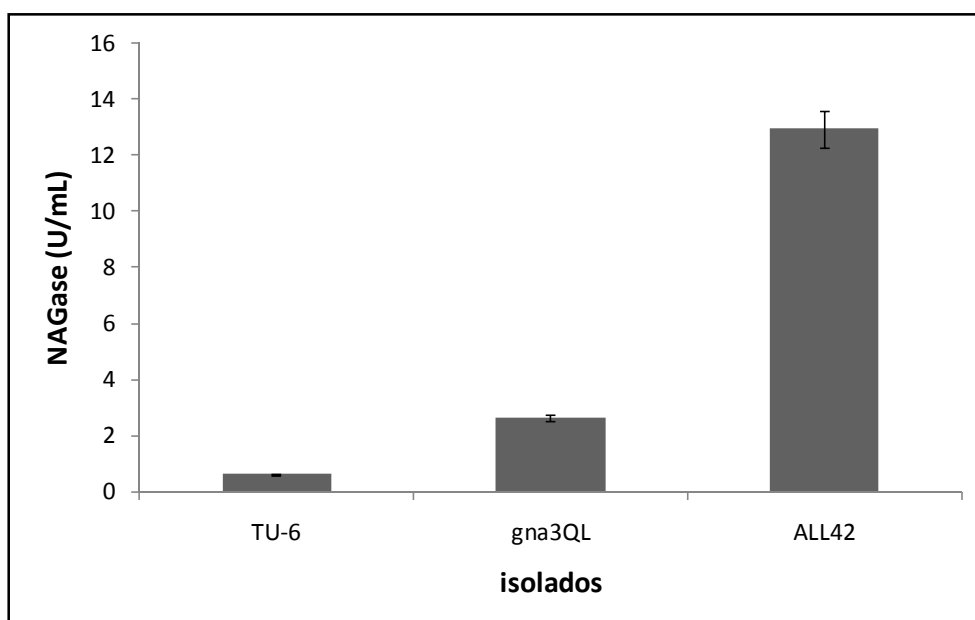


Figura 28. Atividade de NAGase produzida por *T. reesei* (TU-6 e *gna3QL*) e *T. harzianum* (ALL42) após 72 horas de indução por parede celular de *P. ultimum* em meio líquido. Os resultados foram expressos como média de três repetições com desvio padrão menor do que 5%.

A atividade de β -1,3-glicanase tem sido reportada como sendo importante no micoparasitismo (Almeida et al., 2003; Marcello et al., 2008). A figura 29 mostra que o mutante *gna3QL* produz uma grande quantidade de β -1,3-glicanase, 5 U.mL⁻¹, quando comparado com o parental TU-6 (2 U.mL⁻¹). Por outro lado, o controle usado ALL42 apresentou uma alta produção de β -1,3-glicanase (12,81 U.mL⁻¹). O fato de *P. ultimum* ter uma grande quantidade de glucana na composição de sua parede celular pode explicar em parte a melhor habilidade de *gna3QL* em antagonizar *P. ultimum* frente ao seu parental TU-6.

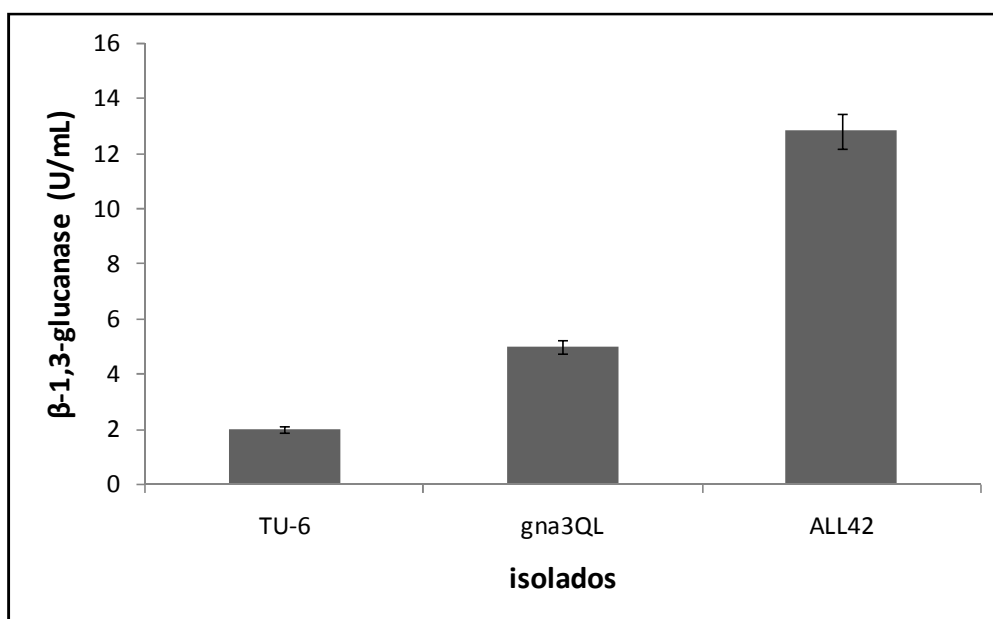


Figura 29. Atividade de β -1,3-glicanase produzida por *T. reesei* (TU-6 e *gna3QL*) e *T. harzianum* (ALL42) após 72 horas de indução por parede celular de *P. ultimum* em meio líquido. Os resultados foram expressos como média de três repetições com desvio padrão menor do que 5%.

A atividade de protease também foi avaliada e os resultados estão apresentados na figura 30. Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre as atividades de protease apresentadas por *gna3QL* e TU-6, 0,51 U.mL⁻¹ e 0,62 U.mL⁻¹ respectivamente. Por outro lado, o ALL42 mostrou uma alta atividade proteolítica (1,86 U.mL⁻¹) quando comparado com as linhagens de *T. reesei* estudadas. Esses resultados sugerem que a protease pode estar envolvida no micoparasitismo, porém não é determinante para um bom antagonismo, uma vez que TU-6 e *gna3QL* apresentaram

atividades parecidas, porém antagonismos diferentes. De qualquer forma, a regulação da produção de serina-protease na presença de parede celular de *P. ultimum* parece não ser dependente de GNA3 e/ou AMPc.

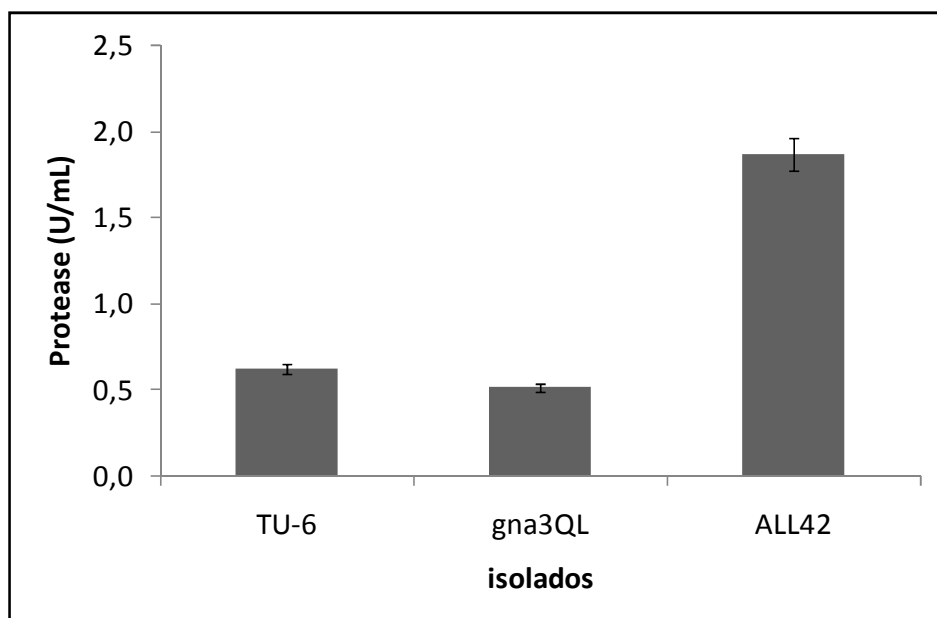


Figura 30. Atividade de protease produzida por *T. reesei* (TU-6 e *gna3QL*) e *T. harzianum* (ALL42) após 72 horas de indução por parede celular de *P. ultimum* em meio líquido. Os resultados foram expressos como média de três repetições com desvio padrão menor do que 5%.

Dados de literatura têm mostrado que além de glucana, quitina e celulose, a parede de *Pythium* spp. apresenta outros compostos importantes como lipídeos e fosfato (Bartnicki-Garcia, 1968; Ruiz-Herrera, 1992). Diante disso, a atividade de lipase e fosfatase ácida também foram avaliadas.

A figura 31 mostra que o mutante *gna3QL* apresentou uma maior atividade de lipase do que o parental TU-6, 2,94 e 1,37 U.mL⁻¹ respectivamente enquanto que o ALL42 apresentou uma atividade de lipase de 4 U.mL⁻¹. A função dos lipídeos na parede celular de fungos ainda é pouco estudada. Nossos resultados mostram indícios de que a produção dessa enzima por *Trichoderma* pode ser influenciada pela ação de GNA3 e/ou AMPc.

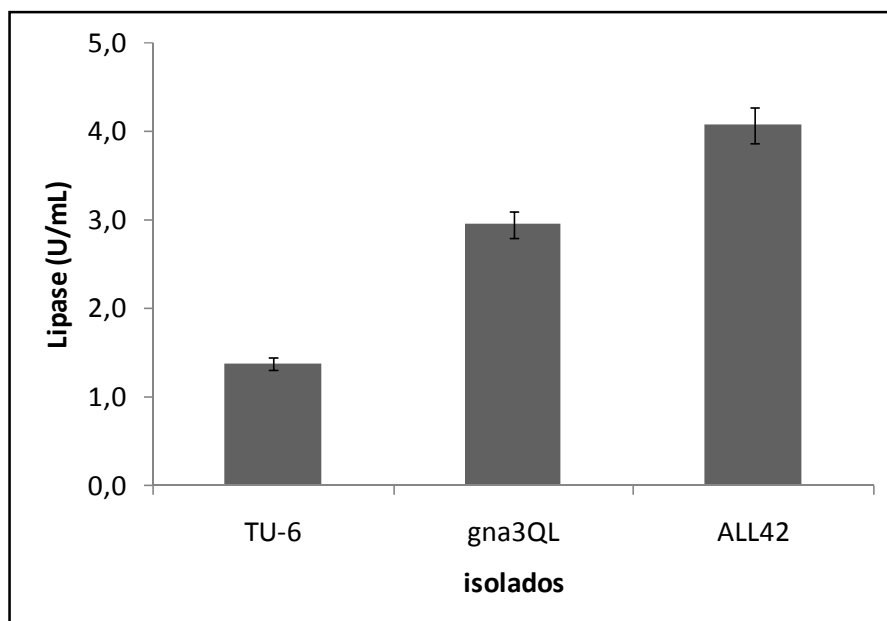


Figura 31. Atividade de lipase produzida por *T. reesei* (TU-6 e *gna3QL*) e *T. harzianum* (ALL42) após 72 horas de indução por parede celular de *P. ultimum* em meio líquido. Os resultados foram expressos como média de três repetições com desvio padrão menor do que 5%.

Outro componente da parede celular de fungos que vem sendo estudado é o fosfato. Ele pode ser encontrado de 0,1 a 2% do peso seco da parede (Ruiz-Herrera, 1992). A figura 32 mostra a atividade de fosfatase ácida das linhagens estudadas. Como se pode observar, o mutante *gna3QL* possui uma alta atividade desta enzima, 11,81 U.mL⁻¹, sugerindo uma relação positiva entre formação de fosfatase ácida e ativação constitutiva de GNA3 e/ou aumento de AMPc. O parental TU-6 apresentou uma atividade de fosfatase ácida maior do que ALL42, 4,88 e 1,81 U.mL⁻¹ respectivamente. O papel das fosfatases no micoparasitismo ainda não é bem esclarecido, mas parece estar relacionado com competição por nutrientes (Altomare et al., 1999).

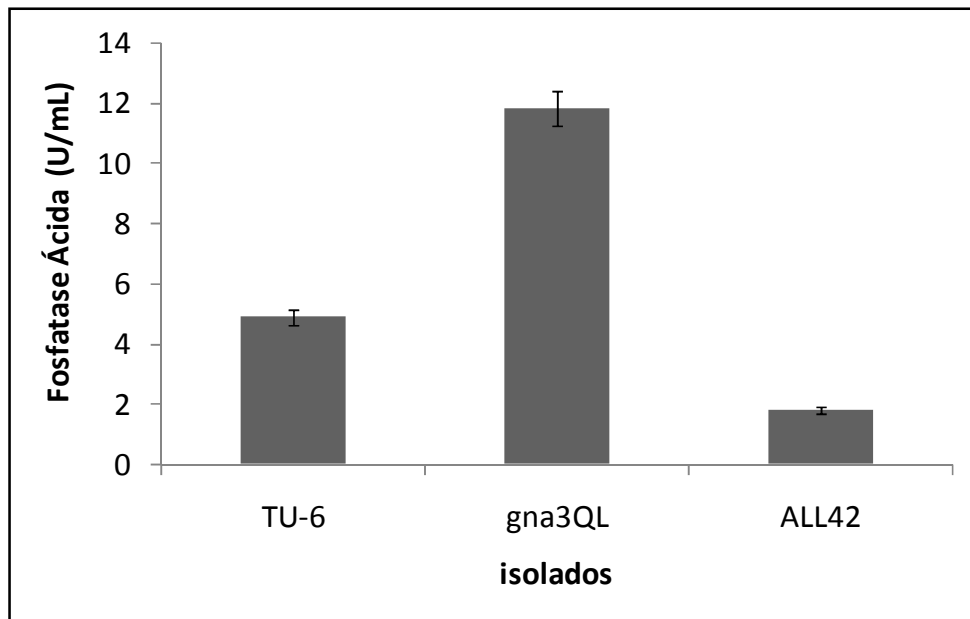


Figura 32. Atividade de fosfatase ácida produzida por *T. reesei* (TU-6 e *gna3QL*) e *T. harzianum* (ALL42) após 72 horas de indução por parede celular de *P. ultimum* em meio líquido. Os resultados foram expressos como média de três repetições com desvio padrão menor do que 5%.

DISCUSSÃO

Neste trabalho foi reportada a clonagem e caracterização de um ortólogo *gna3* de *T. reesei*. A estrutura da proteína e as conseqüências na mutação constitutiva, como inibição da fotoconidiação e elevado conteúdo intracelular de AMPc, estão de acordo com estudos prévios incluindo outras espécies de *Trichoderma*, indicando que *gna3* é um homólogo funcional do subgrupo III das proteínas G-alfa de fungos. Foi apresentado também nesse estudo um novo dado de que a expressão do gene *gna3* foi fortemente estimulada pela luz, sugerindo que a principal função de Gna3 pode ocorrer sob influencia de luz (Figura 22). Essa estimulação da expressão dependente de luz pode ser correlacionada com a presença de motivos EUM1 encontrados na região 5' amontante do códon de iniciação (Figura 10). Esse motivo já foi encontrado em regiões promotoras de genes de celulase, (*cbh1* e *cbh2*) e em reguladores de luz azul, *blr1* e *blr2* em *T. reesei* bem como em genes que regulam luz e fonte de carbono, *env1* e no seu homólogo *vvd* em *N. crassa* (Schmoll et al. 2005). Até o presente momento, a função fisiológica da estimulação da transcrição de *gna3* por luz ainda não é clara, mas pode estar relacionado com a fotoindução da conidiação, uma vez que em ausência de luz, tanto a expressão de *gna3* quanto da esporulação foram comprometidos (Figuras 22 e 16).

Um dos objetivos desse trabalho foi avaliar o envolvimento de Gna3 de *T. reesei* na via de transdução de sinal durante a produção de celulase induzida por celulose e sofrose. Wang e Nuss (1995) reportaram a evidência do envolvimento de outra proteína G (CPG-1) na biosíntese de celulase em *Cryphonectria parasitica*. Se o sinal for realmente recebido por um receptor ligado a proteína G, a ativação constitutiva de Gna3 deveria permitir uma expressão dos genes de celulase independente do indutor. Esse parece não ser o caso neste estudo, uma vez que os resultados mostraram que os genes de celulase *cbh1* e *cbh2* não foram expressos no mutante *gna3QL* em presença de glicerol e a repressão catabólica, típica para esses genes, foi mantida (Figura 21). Esse resultado também está consistente com o fato de que a adição de AMPc ao meio de cultura, na ausência de um indutor, não leva a formação de celulase (Sestak e Farkas 1993). Por outro lado, o mesmo trabalho relata que essa mesma adição aumenta a indução, em duas vezes, fato esse observado em no presente estudo (Figura 18). Esses resultados significariam teoricamente que não existe um receptor extracelular ligado a proteína G que sinalize para a formação de celulase a partir de celulose. Entretanto, esta conclusão deve ser tratada com cautela uma vez que a ativação constitutiva, ao contrário

da deleção de *gna3*, ainda permite a atuação das subunidades beta e gama da proteína G, já que a cópia de *gna3* do tipo selvagem ainda está presente no genoma do mutante. Muitos trabalhos têm demonstrado que essas subunidades podem interagir com diferentes efetores após a ativação da proteína G (Gautam et al. 1998; Cabrera-Vera et al. 2003). Nosso estudo, por outro lado, não exclui a existência de um receptor ligado a proteína G o qual poderia ativar a indução de celulase via as subunidades beta e gama da proteína G.

Apesar de o fato de não se detectar uma transcrição independente do indutor no mutante *gna3QL*, a ativação constitutiva de GNA3 claramente aumentou tanto a expressão quanto a atividade de celulase na presença de celulose sob luz constante ao passo que não alterou a transcrição no escuro (Figuras 18 e 19). Por outro lado, quando se utilizou sofrorose como indutor, os resultados foram diferentes, houve um aumento da transcrição no escuro e um retardo na expressão tanto no escuro quanto no claro (Figura 20). Esses resultados reforçam a idéia de que as induções por sofrorose e celulose possuem circuitos diferentes de sinalização que até podem se interconectar, mas a um nível diferente da sinalização por proteína G (Schmoll e Kubicek, 2003). A ativação da expressão de celulase em *T. reesei* é ativada por luz (Schmoll et al., 2005). Esse fato poderia ser interpretado simplesmente em termos de que existe um envolvimento da Gna3 na sinalização por luz em *T. reesei*. Entretanto, o mutante *gna3QL* não afetou a expressão de genes luz-dependente como *blr1* e *blr2* e *env1* (Figura 22), o que indica que o efeito luz-dependente de GNA3 na indução de celulase não é realizado por esse circuito de regulação. Além do mais, existem dados que demonstram que o ortólogo de *gna3* em *N. crassa* não está envolvido na sinalização por luz (Ballario e Macino, 1997).

Outra explicação para o efeito indireto da luz na transcrição de genes de celulase pode estar relacionados aos achados de Gresik et al. (1991) que relatam que a iluminação promove uma despolarização da membrana plasmática de *T. viride* e um concomitante influxo de íons potássio, resultando em uma acidificação do meio intracelular causado pelo influxo compensado de íons hidrogênio. A acidificação intracelular é conhecida em *S. cerevisiae* por promover a ativação de adenilato ciclase dependente de proteína G por um ortólogo de Gna3 (Gpa2, Thevelein e Winde, 1999). Além do mais, Silva et al. (2004) demonstraram que a adição do protonóforo dinitrofenol, aumenta os níveis intracelulares de AMPc em *T. harzianum* ao passo que inibem a degradação do mesmo pela inativação da fosfodiesterase (Brandão et al., 1998). De acordo com isso, tem sido reportado que a iluminação pode causar um

aumento transitório nos níveis intracelulares de AMPc e a fosforilação de várias proteínas intracelulares dependentes de proteína quinase A (Gresik et al., 1989). Assim, a luz promove um aumento no AMPc intracelular o qual conhecidamente aumenta a taxa de formação de celulase (Sestak e Farkas, 1993). Parece plausível que este seja o mecanismo de estimulação da expressão de genes de celulase pela luz, como já descrito por Schmoll et al. (2005). Uma vez que a adição de AMPc exógeno estimula a formação de celulase, um aumento intracelular de AMPc causado pela ativação constitutiva de GNA3 poderia ter o mesmo efeito, o qual está em concordância com o aumento da transcrição de genes de celulase observados no mutante *gna3QL* em presença de celulose e luz (Figura 18).

Outro objetivo deste trabalho foi avaliar a participação de GNA3 e AMPc no antagonismo de *P. ultimum* e na produção de enzimas líticas durante o micoparasitismo pelo *T. reesei*. Espécies de *Trichoderma* vem sendo amplamente utilizadas na agricultura como agentes de controle biológico contra uma série de fungos fitopatógenos (Benítez et al., 2004). Entretanto, o estudo de *T. reesei*, um fungo tipicamente utilizado em indústria, como agente de controle biológico contra *P. ultimum* começou recentemente (Seidl et al., 2006). Apesar de existir um consenso de como o *Trichoderma* atua durante o processo de micoparasitismo, as bases moleculares e bioquímicas deste processo ainda não estão elucidadas (Woo et al., 2006). Muitos trabalhos sugerem a participação de componentes de cascatas de sinalização celular tais como, proteínas G, AMPc e MAP quinase, no controle do micoparasitismo (Reithner et al., 2007).

O primeiro passo para o micoparasitismo é o reconhecimento do fitopatógeno pelo *Trichoderma*. Existem evidências de moléculas presentes na parede do fungo que estimulam esse reconhecimento e que podem estar relacionadas com AMPc (Omero et al., 1999). Zeillinger et al. (2005) reportaram que TGA3, uma proteína similar a GNA3, possui um papel importante na transdução de sinal durante o reconhecimento do hospedeiro, uma vez que mutantes $\Delta tga3$ foram incapazes de parasitar *R. solani*, *B. cinerea* e *S. sclerotium*. Esses achados são interessantes uma vez que como esperado para *gna3QL*, nós obtivemos resultados opostos na taxa de crescimento e mudanças morfológicas na estrutura do hospedeiro durante o antagonismo (Figura 23). Além do reconhecimento, existem evidências de que mudanças nos padrões de enrolamento e produção de enzimas hidrolíticas são mediadas por proteínas G e não só pelo um simples aumento de AMPc (Rocha-Ramirez et al, 2002; Zeillinger et al., 2005).

Alguns autores tem sugerido a participação de AMPc no controle de uma série de funções durante o antagonismo de fitopatógenos por *Trichoderma* sp. (Omero et al., 1999; Rocha-Ramírez et al., 2002; Zeilinger et al., 2005; Reithner et al., 2005). Entretanto, alguns dados de literatura demonstram que não existe um padrão na produção e degradação de AMPc durante o micoparasitismo por espécies de *Trichoderma*. Isso se deve ao fato de que em resposta ao um estímulo do meio, como presença de elicitores, produzidos pelo hospedeiro, pH e luz, mudanças bioquímicas no *Trichoderma* ocorrem e um rápido aumento e diminuição nos níveis de AMPc é observado (Kolarova et al., 1992). Desta forma, para se avaliar a participação de AMPc em alguns processos como micoparasitismo é mais seguro usar mutantes como *gna3QL* do que mutantes deleção para proteína G ou ainda moduladores de produção de AMPc, uma vez que esses mutantes produzem uma quantidade constante de AMPc. Mesmo assim, algumas conclusões devem ser avaliadas com cautela uma vez que AMPc está envolvido em outras cascatas de sinalização celular que não via proteína G e efeitos indiretos dessas moléculas são comumente observados.

Apesar de o crescimento e enrolamento serem importantes para o micoparasitismo, por si só não garantem sucesso no controle biológico (Alemida et al., 2007). *Trichoderma* sp. também precisam produzir diversas enzimas que consigam degradar a parede celular do patógeno (Viterbo et al., 2002). A produção de enzimas hidrolíticas tem sido frequentemente enfatizada como um dos maiores fatores que contribuem para uma boa atividade de controle biológico por parte do *Trichoderma* sp. (Kubicek et al., 2001). Entretanto, alguns autores sugerem que um sinergismo entre a produção de enzimas hidrolíticas e antibióticos possa ser a explicação para um sucesso no controle biológico (Schirmböck et al., 1994).

A maioria das enzimas hidrolíticas produzidas por *Trichoderma* sp. são indutivas (Ulhoa e Peberdy, 1993; Kubicek et al., 2001) e portanto moléculas que compõem a parede celular dos fitopatógenos possuem papel importante na secreção de enzimas por parte do *Trichoderma*. Entretanto, nossos resultados mostraram que esse fato não pode ser tomado como regra. *T. reesei* produz uma considerável quantidade de celulase, entretanto, esse não parece ser o ponto utilizado durante o micoparasitismo contra *P. ultimum*. Este fato também foi evidenciado em outros estudos. Roberts e Lumdsen (1990) não detectaram atividade de celulase durante o crescimento de *Gliocadium virens* (= *T. virens*) em meio suplementado com parede celular de *P. ultimum*. Além disso, Seidl et al. (2006) demonstraram que o antagonismo de *P. ultimum* por *T. reesei*

parece não necessitar de celulase, uma vez que o mutante 9978 (negativo para a produção de celulases) conseguiu tanto antagonizar o fungo quanto fornecer proteção a planta tal quanto o tipo selvagem. Por fim, a produção de celulase induzida por parede celular de *P. ultimum* não se comportou da mesma forma quando induzida por celulose na presença de luz, confirmando a relação luz/GNA3/celulase.

Outras enzimas bastante estudadas e correlacionadas ao processo de micoparasitismo também foram alvo de nosso estudo. A regulação da formação de endoquitinase e NAGase tem sido estudada em vários níveis (Silva et al., 2004; Zeillinger et al., 2005; Reithner et al., 2007). Ao que parece tanto proteína G da classe III quanto da classe I regulam a expressão de quitinases (Rocha-Ramirez et al., 2002; Zeillinger et al., 2005; Reithner et al., 2007). Nossos dados sugerem que GNA3 e AMPc participam da formação de endoquitinase e NAGase durante o micoparasitismo de *T. reesei* contra *P. ultimum*. Entretanto, alguns dados de literatura são discrepantes a respeito da natureza da regulação e especialmente do papel de AMPc nesse processo. Esse fato sugere que *Trichoderma* sp. possuem uma variedade de estratégias moleculares que podem ser usadas em diferentes combinações que dependem do meio e das condições de cultura (Schirmböck et al., 1994).

A atividade de β -1,3-glicanase tem sido reportada como sendo importante no processo de micoparasitismo (Almeida et al., 2003; Marcello et al., 2008). Até o presente momento, nenhum trabalho correlacionando a expressão desta enzima, proteína G e AMPc por *Trichoderma* foi publicado. Entretanto, Viterbo et al. (2002) relatou o envolvimento de glicanases no antagonismo de *Phytium* por *Trichoderma*. Essas observações, juntamente com o fato de que celulase não é essencial para o antagonismo de *P. ultimum* por *T. reesei*, poderiam explicar a superior habilidade micoparasítica do mutante *gna3QL* quando comparado com seu parental TU-6 (Figuras 23 e 29). Esses achados dão suporte a idéia de que as β -1,3-glicanases possuem um papel importante no micoparasitismo contra *P. ultimum* e agora nós temos evidências de que a regulação da formação dessa enzima em *T. reesei* pode ser associada com proteína G e/ou AMPc.

O papel das proteases tem sido amplamente estudado nos processos metabólicos de fungos do gênero *Trichoderma* (Viterbo et al., 2002). Apesar de alguns estudos sugerirem o envolvimento de proteases no controle biológico por *Trichoderma* (Schirmböck et al., 1994; Flores et al., 1997; De Marco and Felix, 2002), nem a atividade dessas enzimas nem a regulação das mesmas foram correlacionadas com níveis intracelulares de AMPc (Viterbo et al., 2002; Rocha-Ramírez et al., 2002). Esses

dados dão suporte aos nossos resultados, uma vez que a atividade constitutiva de GNA3 com um aumento dos níveis de AMPc não levaram um aumento na formação de proteases por *T. reesei* durante o antagonismo de *P. ultimum* (Figura 30).

Outras enzimas, menos estudadas, como lipase e fosfatase ácida tiveram sua atividade avaliada durante esse estudo. A parede de diversos fungos descritos na literatura como sendo fitopatógenos possuem lipídeos e fosfato em sua composição (Bartnicki-Garcia, 1968; Ruiz-Herrera, 1992). Nossos resultados mostraram que a produção de lipase foi alterada no mutante *gna3QL* em presença de parede celular de *P. ultimum* (Figura 31). O papel dos lipídeos na parede celular ainda não está elucidado. Alguns trabalhos sugerem que os lipídeos contribuem para a rigidez da parede de alguns fungos ou podem conferir propriedades hidrofóbicas a certas estruturas celulares como esporangióforos e esporos (Bartnicki-Garcia, 1968). De qualquer forma, apresentamos aqui indícios de que a regulação da formação desta enzima pode estar relacionada com GNA3.

O fosfato tem sido identificado em quase todas as paredes celulares de fungos analisados variando de 0,1 a 2% do peso seco da parede (Ruiz-Herrera, 1992). O papel da fosfatase ácida no micoparasitismo tem sido sugerido por alguns autores. O fosfato pode ser solubilizado e estocado na biomassa de *Trichoderma* para ser liberado em uma forma fácil quando preciso. De forma interessante, fungos como *Pythium* e *Rhizoctonia* são incapazes de solubilizarem fosfatos (Altomare et al., 1999), sugerindo um sinergismo entre EDPCs e competição por nutrientes entre *Trichoderma* e fito patógenos durante a proteção da planta.

O fato de o mutante *gna3QL* ter apresentado uma melhor atividade micoparasítica frente ao seu parental TU-6 e que a presença de parede celular de *P. ultimum* sinalizar para a produção de EDPCs, aliado ao fato de que algumas dessas enzimas poderem ser reguladas por GNA3, sugerem que a cascata de sinalização do antagonismo pode ser regulada por um mecanismo comum. Estudos mais aprofundados, utilizando outros mutantes para genes da via proteína G/AMPc/Proteína cinase, poderão fornecer ferramentas importantes para o entendimento do processo de micoparasitismo contra *P. ultimum* por *T. reesei*.

CONCLUSÕES

- A mutação Q206L na proteína GNA3 de *T. reesei* afeta o processo de esporulação e crescimento do fungo e esse processo é dependente de luz.
- A expressão do gene *gna3* de *T. reesei* é fortemente influenciada pela presença de luz
- A expressão de genes de celulase *cbh1* e *cbh2* são influenciadas por GNA3, porém somente em presença de luz quando induzidos por celulose.
- A expressão de genes de celulase *cbh1* e *cbh2* induzida por sofrorose não é influenciada por GNA3 em presença de luz, mas sim no escuro, sugerindo vias de sinalização diferentes.
- A proteína GNA3 parece estar envolvida no processo de antagonismo de *P. ultimum* por *T. reesei*.
- A mutação Q206L na proteína GNA3 de *T. reesei* promoveu um aumento nos níveis intracelulares de AMPc e na produção de EDPCs como endoquitinase, N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAGase), β -1,3-glicanase, lipase e fosfatase ácida.
- A mutação Q206L na proteína GNA3 de *T. reesei* parece não influenciar na formação de celulase e protease durante o antagonismo de *P. ultimum* por *T. reesei*.

PERSPECTIVAS

- Promover a clonagem de outros genes de proteína G, subunidade G α i, Adenilato ciclase e Proteína cinase A, bem como a obtenção de mutantes para esses genes.
- Promover a deleção do gene *gna3* e analisar suas conseqüências nos processos de produção de celulase e no micoparasitismo contra *P. ultimum*.
- Analisar a capacidade de *T. reesei* e seus respectivos mutantes, no antagonismo de outros fungos fitopatógenos.
- Estudar pelo uso de mutantes, o processo de sinalização da luz na produção de celulase por *T. reesei*.
- Analisar o transcriptoma de diferentes mutantes para proteína G durante o processo de produção de celulase em presença de celulose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAO-NETO; ROSSINI, C. H.; EL-GOGARY, S.; HENRIQUE-SILVA, F.; CRIVELLARO, O.; EL-DORRY, H. Mitochondrial functions mediate cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. *Biochemistry*. V.34, p. 10456-10462, 1995.

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

ALTOMARE, C.; NORVELL, W.A.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G.E. Solubilization of Phosphates and Micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl Env Microbiol.* v. 65, n.7, p. 2926-2933.1999.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool, *J Mol Biol.* v.215, p. 403-410. 1990.

ARO, N.; SALOHEIMO, A.; ILMÉN, M.; PENTTILÄ, M. ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*, *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 24309-24314, 2001.

BALLARIO, P.; MACINO, G. White collar proteins: PASSing the light signal in *Neurospora crassa*. *Trends Microbiol.* v.5, p.458-462, 1997.

BARNETT, H. L.; BRINDER, F. L. The fungal host-parasite relationship. *Ann. Rev. Phytopathol.* v.11, p. 273-292, 1973.

BARTNICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 22 p. 87-108, 1968.

BECKER, D., C. BRAET, H. BRUMER, 3RD, M. CLAEYSSSENS, C. DIVNE., Engineering of a glycosidase Family 7 cellobiohydrolase to more alkaline pH optimum: the pH behaviour of *Trichoderma reesei* Cel7A and its E223S/A224H/L225V/T226A/D262G mutant. *Biochem. J.* v. 356 p.19-30. 2001.

- BENHAMOU, N.; CHET, I. Cellular and Molecular Mechanisms Involved in the Interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 63, n.5, p. 2095–2099, 1997.
- BENITEZ, T.; RINCON, A.M.; LIMON, M.C.; CODON, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* v.7 n.4 p.249-260. 2004.
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. Nov. *Canadian Journal of Botany.* v.62, p.924-31, 1984.
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachibasium*. *Canadian Journal of Botany.* v.69, p.2373-417, 1991.
- BLASCHEK, W.; KÄSBAUER, J.; KRAUS, J.; FRANZ, G. *Pythium aphanidermatum*: culture, cell-wall composition, and isolation and structure of antitumour storage and solubilised cell-wall (1→3),(1→6)-beta-D-glucans. *Carbohydr. Res.* v. 231, p. 293-307, 1992.
- BOLKER, M. Sex and crime: heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis. *Fungal Genet Biol.* v.25, p.143-156, 1998.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* v.72, p.248-254, 1976.
- BRUNNER, K. et al. *Trichoderma* G protein-coupled receptors: functional characterisation of a cAMP receptor-like protein from *Trichoderma atroviride*. *Curr. Genet. in press.* 2008
- BUCHERT, J.; HEIKINHEIMO, L. New cellulase processes for the textile industry. EU–project report. *Carbohydr. Eur.* v.22, p. 32-34, 1998.
- BUCHERT, J.; OKSANEN, T.; PERE, J.; SIIKA-AHO, M.; SUURNÄKKI, A.; VIKARI, L. Application of *Trichoderma reesei* enzymes in pulp and paper industry In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. *Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications.* London. 1998. Taylor & Francis, Ltd.

CABRERA-VERA, T. M. et al. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr. Rev.* v.24, p.765-781, 2003.

CARLE-URIOSTE, J.C. et al. Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. *J. Biol. Chem.* v.2, p.169 -10174, 1997.

CARRARO, D.M. et al. A region of the cellobiohydrolase I promoter from the filamentous fungus *Trichoderma reesei* mediates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*, dependent on mitochondrial activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v.253, p. 407-414, 1998.

COLEMAN, D. E. et al. Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* v.265, p.1405-1412, 1994.

CZIFERSZKY, A.; SEIBOTH, B.; KUBICEK, C.P. The Snf1 kinase of the filamentous fungus *Hypocrea jecorina* phosphorylates regulation-relevant serine residues in the yeast carbon catabolite repressor Mig1 but not in the filamentous fungal counterpart Cre1. *Fungal Genet Biol.* v.40, n.2, p.166-75, 2003.

CZIFERSZKY, A.; MACH, R. L.; KUBICEK, C. P. Phosphorylation positively regulated DNA binding of the carbon catabolite repressor Cre1 of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) *J. Biol. Chem.* v.277, p.14688-14694, 2002.

D' SOUZA, C. A. et al. Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase Controls Virulence of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Molecular and Cellular Biology* v.21 n.9, p. 3179-3191, 2001.

DE MARCO, J.L; FELIX, C. R. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. *BMC Biochemistry* 3 <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/3/3>. 2002.

DOHLMAN, H. G.; THORNER, J.; CARON, M. G. ; LEFKOWITZ, R. J. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* v.60, p. 653-688, 1991.

DOWZER, C. E. A.; KELLY, J. M. Analysis of the creA gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* *Mol. Cell. Biol.* v. 9, p. 5701 – 5709, 1991.

DRUZHININA, I.S. et al. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet Biol.* v.42, n.10, p. 813-28, 2005.

DRUZHININA, I.S. et al. Global Carbon Utilization Profiles of Wild Type, Mutant and Transformant Strains of *Hypocrea jecorina*, *Appl Environ Microbiol.* v.72, n3, p. 2126-33, 2006.

D'SOUZA, C.A; HEITMAN, J. Conserved cAMP signaling cascades regulate fungal development and virulence. *FEMS Microbiol Rev.* v. 25, p.349-364, 2001.

ELAD, Y.; KAPAT, A. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*, *Eur J Plant Pathol.* v.105, p.177-189, 1999.

ELAD, Y., CHET, I. & HENIS, Y. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*- Scanning Electron Microscopy and Fluorescence Microscopy. *Phytopathology.* v.73, p. 85-88, 1983.

ELAD, Y.; LIFSHITZ, R.; BAKER, R.. Enzymatic activity of the mycoparasite *Pythium nunn* during interaction with host and non-host fungi. *Physiol. Plant. Pathol.* v.27, p. 131-148. 1985.

FARKAS, V.; GRESIK, M.; KOLAROVA, N.; SULOVA, Z.; SESTAK, S. Biochemical and physiological changes during photo-induced conidiation and derepression of cellulase synthesis in *Trichoderma*. In KUBICEK, C.P; EVELEIGH, D.E; ESTERBAUER, W.; STEINER, W.; KUBICEK-PRANZ, E.M. *Trichoderma reesei cellulase: biochemistry, genetics, physiology, and application*. Cambridge. Graham House. 1990. p. 139-155,

FERREIRA, N.L. Industrial exploitation of renewable resources: from ethanol production to bioproducts development. *J Soc Biol.* v.202, n.3, p.191-9, 2008.

FIRMINO, A. A. P. et al. O. Involvement of G proteins and cAMP in the production of chitinolytic enzymes by *Trichoderma harzianum*. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.33 p.169-173, 2002.

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

FOWLER, T.; BROWN, R. D. J.R. The *bgl1* gene encoding extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei* is required for rapid induction of the cellulase complex, *Mol. Microbiol.* v.6, p.3225-3235, 1992.

FRIEDL M. A. et al. Photostimulation of *Hypocrea atroviridis* growth occurs due to a cross-talk of carbon metabolism, blue light receptors and response to oxidative stress. *Microbiology*. v. 154, n. 4, p.1229-41, 2008.

FRITSCHER, C.; MESSNER, R.; KUBICEK, C. P. Cellobiose metabolism and cellobiohydrolase I biosynthesis in *Trichoderma reesei*, *Exp. Mycol.*, v.14, p. 451-461, 1990.

GALANTE, Y.; DE CONTI, A.; MONTEVERDI, R. Application of *Trichoderma* enzymes in the food and feed industries.. In: HARMAN, G. AND KUBICEK, C. *Trichoderma and Gliocladium, Enzymes, biological control and commercial applications* v. 2. Pp. 327-342, 1998.

GAMA P., F. M. *Mecanismo bioquímico da acção de celulasas de Trichoderma reesei*. 1996. Tese (doutorado). Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho. Portugal

GAMS, W.; BISSETT, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C.P., HARMAN, G.E. *Trichoderma & Gliocladium*. London: Taylor & Francis Ltd., 1998. p.3-34.

GANCEDO, J.M. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev.* v. 62, n.2, p. 334-61, 1998.

GAUTAM, N.; DOWNES, G.B; YAN, K.; KISSELEV, O. The G-protein betagamma complex. *Cell Signal* v.10, p.447-455, 1998.

GREMEL G, DORRER M, SCHMOLL M. Sulphur metabolism and cellulase gene expression are connected processes in the filamentous fungus *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*). *BMC Microbiol.* 2008, *in press*.

GRESIK, M.; KOLAROVA, N.; FARKAS, V. Light-stimulated phosphorylation of proteins in cell-free extracts from *Trichoderma viride*. *FEBS Lett* v.248, p.185-187, 1989.

GRITZALI, M.; BROWN, R. D. The cellulase system of *Trichoderma*: relationships between purified extracellular enzymes from induced or cellulose-grown cells, *Adv. Chem. Ser.*, v.181, p.237-260, 1979.

GRUBER, F. et al. The development of a heterologous transformation system for the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* based on a pyrG-negative mutant strain. *Curr. Genet.* v.18, p. 71-76, 1990.

HARAN, S.; SCHICKELER, H.; CHET, I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* v.142, p. 2321-2331, 1996.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts, *Nat. Rev. Microbiol.* v.2, p. 43-56, 2004.

HARTL, L.; KUBICEK, C.P; SEIBOTH, B. Induction of the gal pathway and cellulase genes involves no transcriptional inducer function of the galactokinase in *Hypocrea jecorina*. *J Biol Chem.* 22 , 282, 25, 18654-9, 2007.

HEIKINHEIMO, L.; BUCHERT, J. Synergistic effects of *Trichoderma reesei* cellulases on the properties of knitted cotton fabric. *Textile Res. J.* v.71, p.672-677, 2001.

HEIKINHEIMO, L. et al. Treating denim fabrics with *Trichoderma reesei* cellulases. *Textile Res. J.* v.70, p. 969-973, 2000.

HEINTZEN, C.; LOROS, J. J. ; DUNLAP, J. C. The PAS protein VIVID defines a clock-associated feedback loop that represses light input, modulates gating, and regulates clock resetting. *Cell* v.104, p. 453-464, 2001.

HEPLER, J. R; GILMAN, A. G. G proteins. *TIBS* v.17, p. 383-387, 1992.

HIGGINS, D.G.; SHARP, P.M. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* v.73 p. 237-244, (1988).

HIGGINS, J. B.; CASEY, P. J. The role of prenylation in G-protein assembly and function. *Cell Signal* v. 8, p.433-437, 1996.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* spp. in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts., *Plant Dis.* v. 87, p. 4-10. 2003.

ILMÉN, M. et al. Functional analysis of the cellobiohydrolase I promoter of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*, *Mol. Gen. Genet.* v. 253, p.303-314, 1996.

ILMÉN, M. et al. Regulation of cellulase expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*, *Appl. Environ. Microbiol.* v.63, p.1298-1306, 1997.

ILMÉN, M.; THRANE, C.; PENTTILÄ, M. The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full length and a truncated mutant gene, *Mol. Gen. Genet.* v.251, p.451-460, 1996.

INBAR, J.; CHET, I. Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers. *J. Bacteriol.* v.174, p. 1055-1059, 1992.

KAYS, A.M et al. Regulation of conidiation and adenylyl cyclase levels by the Galpha protein GNA-3 in *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol* v.20, p. 7693-7705, 2000.

KLEIN, D., EVELEIGH, D.E. Ecology of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C.P., HARMAN, G.E. *Trichoderma & Gliocladium*. London: Taylor & Francis Ltd., 1998. p.57-74.

KLEUSS, C. et al. Mechanism of GTP hydrolysis by G-protein α subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v.91, p.9828-9831, 1994.

KOLAROVA, N.; HAPLOVA, J.; GRESIK, M. Light-activated adenyl cyclase from *Trichoderma viride*. *FEMS Microbiol Lett* v.93, p.275-278, 1992.

KREDICS, L. et al. Clinical importance of the genus *Trichoderma*. A review, *Acta Microbiol Immunol Hung.* v.50, p.105-117, 2003.

KRONSTAD, J. et al. Signaling via cAMP in fungi: interconnections with mitogen-activated protein kinase pathways. *Arch. Microbiol.* v.170, p.395-404, 1998.

KUBICEK, C. P.; PENTTILÄ, M. E. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma* In Harman, G. E. ; Kubicek, C. P. *Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. London, UK. Taylor and Francis Ltd. 1998. p. 49-72.

KUBICEK, C. P., Involvement of a conidial bound endoglycanase and a plasma membrane bound β -glucosidase in the induction of endoglycanase synthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*, *J. Gen. Microbiol.*, v.133, p.1481-1487, 1987.

KUBICEK, C. P. et al. *Trichoderma*: from genes to biocontrol, *J Plant Pathol.* v. 83, p.11-23, 2001.

KUBICEK, C. P. et al. Triggering of cellulase biosynthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*: involvement of a constitutive, sophoroseinducible and glucose-inhibited β -diglucoside permease, *J. Biol. Chem.*, v.268, p.19264-19268, 1993.

KUBICEK, C. P. et al. Properties of the conidial-bound cellulase system of *Trichoderma reesei*, *J. Gen. Microbiol.*, v.134, p.1215-1222, 1988.

KULLING, C. M. et al. Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma ech42* gene expression before mycoparasitic contact. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 66 p.2232-2234, 2000.

LAI, R. K. et al. The gamma subunit of transducin is farnesylated. *Proc Natl Acad Sci U S A* v. 87, p.7673-7677, 1990.

MACH, R.L; ZEILINGER, S. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol.* v.60 n.5, p.515-22, 2003.

- MACH, R. L. et al. The *bgl1* gene of *Trichoderma reesei* QM9414 encodes an extracellular, cellulose-inducible β -glucosidase involved in cellulase induction by sophorose, *Mol. Microbiol.* v.16, p. 687 – 697, 1995.
- MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol Bioeng Symp* v.6, p. 21-33, 1976.
- MANDELS, M.; ANDREOTTI, R. Problems and challenges in the cellulose to cellulase fermentation. *Proc Biochem.* v.13, p. 6-13, 1978.
- MANDELS, M.; REESE, E. T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J Bacteriol* v.79, p. 816-826, 1960.
- MARCELLO, C. M et al. Expression analysis of the exo- β -1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum* (in press [doi:10.1016/j.micres.2008.08.002](https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.002)), 2008.
- MATTOON, J.R; CARAVAJAL, E.; GUTHRIE, D. Effects of hap mutations on heme and cytochrome formation in yeast. *Curr Genet.*, v.17, p.179-183, 1990.
- MAURER, K.H. Development of new cellulases. In: VAN; E.E, J.; MISSET, O.; Baas, E. *Enzymes in detergency*. New York. Marcel Dekker, Inc. p. 175-202, 1997.
- MERROW, M.et al. A fungus among us: the *Neurospora crassa* circadian system. *Semin Cell Dev Biol* v.12, p. 279-285, 2001.
- MIETTINEN–OINONEN, ARJA. *Trichoderma reesei* strains for production of cellulases for the textile industry. *Espoo VTT Publications* 550. p .96, 2004.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p.426-428, 1959.
- MITCHELL, A.D; TAYLOR, I.E. Cell-wall proteins of *Aspergillus niger* and *Chaetomium globosum*. *J. Gen. Microbiol.* v.59, p.103-109, 1969.
- MONTENECOURT, B. B.; EVELEIGH, D. E. Selective screening methods for the isolation of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*, *Adv. Chem. Ser.* V.181, p. 289-301, 1979.

MONTERO, M. et al. BGN16.3, a novel acidic beta-1,6-glucanase from mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413, *FEBS J.* v.272, p.3441-3448, 2005.

MORIKAWA, Y. et al. Cellulase induction by lactose in *Trichoderma reesei* PC-3-7, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 44, p. 106-111, 1995.

MUKHERJEE, P.K. et al. Role of two G-protein alpha subunits, TgaA and TgaB, in the antagonism of plant pathogens by *Trichoderma virens*. *Appl Environ Microbiol* v.70, p. 542-549, 2004.

NARENDJA, F.M; DAVIS, M.A; HYNES, M.J. AnCF, the CCAAT binding complex of *Aspergillus nidulans*, is essential for the formation of a DNase I-hypersensitive site in the 5' region of the amdS gene. *Mol Cell Biol.* v.19, n.10, p. 6523-31, 1999.

NEER, E. J. Heterotrimeric G proteins: Organizers of Transmembrane Signals. *Cell* v. 80, p .249-257, 1995.

NIERSTRASZ, V.; WARMOESKERKEN, M. Process engineering and industrial enzyme applications. In: Cavaco–Paulo, A.; Gübitz, G. *Textile processing with enzymes*, England . Woodhead Publishing Ltd. 2003. p. 120-157.

OMERO, C. et al. G proteins activators and cAMP promote mycoparasitic behavior in *Trichoderma harzianum*. *Mycol Res* v.103, n.12, p.1637-1642, 1999.

PERE, J. ET AL. Enhancement of TMP reject refining by enzymatic modification of pulp carbohydrates . A mill study. In: VIIKARI, L.; LANTTO, R. *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: 8th ICBPPI Meeting, Progress in Biotechnology*, Elsevier Science B.V. 2002. v. 21, p. 281-290.

PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J.; McDOUGALL, B. M. Noncellulytic fungal β -glucanases: their physiology and regulation. *Enzyme Microbiol. Technol.* v.15, p.178-192, 1993.

RAMEZANI-RAD, M. The role of adaptor protein Ste50-dependent regulation of the MAPKKK Ste11 in multiple signalling pathways of yeast. *Curr Genet* v.43, p.161-170. 2003.

RAO,M.B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases., *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62 n. 3, p. 597-635, 1998..

REGENFELDER, E. et al. G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals. *EMBO J.* v.16, p. 1934-1942, 1997.

REITHNER, B. et al. The G protein alpha subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genet Biol* v.42, p.749-760, 2005.

REITHNER, B. et al. Signaling via the *Trichoderma atroviride* mitogen-activated protein kinase Tmk 1 differentially affects mycoparasitism and plant protection. *Fungal Genet Biol* v.44 n.11, p.1123-33, 2007.

RIFAI, R.W. A revision of the genus *Trichoderma*. C.M.I. - *Mycological Papers*, v.116, p.1-56, 1969.

ROBERTS, D.P.; LUMSDEN, R.D. Effect of extracellular metabolites from *Gliocladium virens* on germination of sporangia and mycelial growth of *Pythium ultimum*. *Phytopathology* v.80, p. 461-465, 1990.

ROCHA-RAMIREZ, V. et al. *Trichoderma atroviride* G-protein alpha-Subunit Gene tga1 Is Involved in Mycoparasitic Coiling and Conidiation. *Eukaryotic Cell* v.1 n.4, p. 594-605, 2002.

ROCHA-RAMIREZ, V. et al. *Trichoderma atroviride* G-protein alpha-subunit gene tga1 is involved in mycoparasitic coiling and conidiation, *Eukaryot Cell.* v.1, p.594-605, 2002.

RUIZ-HERRERA, J. Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis, and Assembly, *CRC Press*, ISBN 0849366720, 1992.

SALOHEIMO, A. et al. Isolation of the ace1 gene encoding a Cys(2)-His(2) transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter cbh1 of *Trichoderma reesei*, *J. Biol. Chem.*, v.275, p.5817-5825, 2000.

SALOHEIMO, M. et al. Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* beta-glucosidase BGLII (cel1A), *Appl. Environ. Microbiol.* v.68, p. 4546-4563, 2002.

SALOHEIMO, M. et al. cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. *Eur. J. Biochem.* v.249, p.584-591, 1997.

SAMUELS, G. J.; REHNER, S. A. Toward a concept of genus and species in *Trichoderma*. In: LUMSDEN, R.D. & VAUGHN, J.L. *Pest Management: Biologically based technologies*. American Chemical Society, Washington, District of Columbia, 1993. p.186-188.

SAMUELS, G.J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.*, v.100, n.8, p.923-35, 1996.

SAMUELS, G. J. et al. *Trichoderma* Online. Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved August 31, 2006, from <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>.

SANZ, L. et al. Expression of an alpha-1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*, *FEBS J.* v. 272, p. 493-499, 2005.

SCHIRMBÖCK M. et al. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol* v. 60, p. 4364–4370, 1994.

SCHMOLL, M. The information highways of a biotechnological workhorse-signal transduction in *Hypocrea jecorina*. *BMC Genomics* v. 9, p. 430, 2008.

SCHMOLL, M.; FRANCHI, L.; KUBICEK, C.P. Envoy, a PAS/LOV domain protein of *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*), modulates cellulase gene transcription in response to light. *Eukaryot Cell* v. 4, p.1998-2007, 2005.

SCHMOLL, M. et al. Cloning of genes expressed early during cellulase induction in *Hypocrea jecorina* by a rapid subtraction hybridization approach. *Fungal Genet Biol* v.41, p. 877-887, 2004.

SCHMOLL, M.; KUBICEK, C. P. Regulation of *Trichoderma* cellulase formation: lessons in molecular biology from an industrial fungus, *Acta Microbiol Immunol Hung.* v.50, p.125-145, 2003.

SCHUSTER A. et al. Impact of light on *Hypocrea jecorina* and the multiple cellular roles of ENVOY in this process. *BMC Genomics*. v.8, p.449, 2007.

SEABY, D. *Trichoderma* as a weed would or pathogen in mushroom cultivation In: Harman, G. E.; Kubicek, C. P. *Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. London. 1998 Taylor and Francis Ltd. p. 267-287.

SEGERS, G. C.; NUSS, D. L. Constitutively activated Galpha negatively regulates virulence, reproduction and hydrophobin gene expression in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genet Biol* v.38, p. 198-208, 2003.

SEIBOTH, B. et al. The D-xylose reductase of *Hypocrea jecorina* is the major aldose reductase in pentose and D-galactose catabolism and necessary for beta-galactosidase and cellulase induction by lactose. *Mol Microbiol*. v. 66, n.4, p. 890-900, 2007.

SEIBOTH, B. et al. Role of the bga1-encoded extracellular {beta}-galactosidase of *Hypocrea jecorina* in cellulase induction by lactose. *Appl Environ Microbiol*. v. 71, n.2, p.851-7, 2005.

SEIBOTH, B. et al. Role of four major cellulases in the triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*, *J. Bacteriol*. v.179, p.5318-5320, 1997.

SEIBOTH, B.; HOFMANN, G.; KUBICEK, C. P. Lactose metabolism and cellulase production in *Hypocrea jecorina*: the *gal7* gene, encoding galactose-1- phosphate uridylyltransferase, is essential for growth on galactose but not for cellulase induction, *Mol. Genet. Genomics* v.267, p.124-132, 2002.

SEIBOTH, B. et al. Disruption of the *Trichoderma reesei* *cbh2* gene coding for cellobiohydrolase II leads to a delay in the triggering of cellulase formation by cellulose, *J. Gen. Microbiol.* v.138, p. 1259-1264, 1992.

SEIDL, V. et al. Antagonism of *Pythium* blight of zucchini by *Hypocrea jecorina* does not require cellulase gene expression but is improved by carbon catabolite derepression. *FEMS Microbiol Lett* v.257, n.1, p.145-51, 2006.

SESTAK, S.; FARKAS, V. Metabolic regulation of endoglucanase synthesis in *Trichoderma reesei*: participation of cyclic AMP and glucose-6-phosphate. *Can J Microbiol* v.39, p.342-347, 1993.

SILVA, R.N. et al. Regulation of N-acetyl-b-D-glucosaminidase produced by *Trichoderma harzianum*: evidence that cAMP controls its expression. *Res Microbiol* 155:667-671, 2004.

SILVA, R.N.; KUBICEK, C.P.; SCHMOLL, M. Light- and inducer-dependent modulation of cellulase gene expression by the G-alfa protein GNA3 of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). In: 8TH European Conference on *Fungal Genetics, Cell Biology and Signal Transduction*, Vienna, Austria, p. 150, 2006.

SJÖSTRÖM, E. In: *Wood Chemistry Fundamentals and Applications*. New York. 1981. Academic Press. P. 49.

STERNBERG, D.; MANDELS, G. R., Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose, *J. Bacteriol.*, v.139, p.761-767, 1979.

STRAUSS, J. et al. Cre1, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*, *FEBS Lett.* v.376, p.103-07, 1995.

SUAREZ, M. B. et al. Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*. Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease, *Fungal Genet Biol.* 42, 924-934, 2005.

SUNNARBORG, S.W. et al. Expression of the yeast glycogen phosphorylase gene is regulated by stress-response elements and by the HOG MAP kinase pathway. *Yeast* v.18, p.1505-1514, 2001.

SUURNÄKKI, A. et al. *Trichoderma reesei* cellulases and their core domains in the hydrolysis and modification of chemical pulp. *Cellulose* v.7, p.189-209, 2000.

SZAKMARY, K.; WOTAWA, A.; KUBICEK, C. P. Origin of oxidized cellulose degradation products and mechanism of their promotion of cellobiohydrolase I biosynthesis, *J. Gen. Microbiol.* v.137, p. 2873-2878, 1991.

TAKASHIMA, S. et al. Cloning of a gene encoding a putative carbon catabolite repressor from *Trichoderma reesei*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* v.60, p.173-176, 1996.

TEERI, T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Tibtech.* v.15: p.160-167, 1997.

THEVELEIN, J.M; DE WINDE, J.H. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* v.33, p. 904-918, 1999.

TODD, R. B. et al. FacB, the *Aspergillus nidulans* activator of acetate utilization genes binds dissimilar DNA sequences, *EMBO J.* v.17, p.2043-54, 1998.

TREITEL, M. A.; KUCHIN, S.; CARLSON, M. Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* v.18, p.6273-6280, 1998.

TURNER, G. E.; BORKOVICH, K. A. Identification of a G protein α subunit from *Neurospora crassa* that is a member of the G_i family. *J. Biol. Chem.* v.268, n.20, p. 14805-14811, 1993.

ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F. Effect of carbon sources on chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Mycol. Res.* v.97, p. 45-48, 1993.

UMILE, C.; KUBICEK, C. P. A constitutive, plasma-membrane bound β -glucosidase in *Trichoderma reesei*, *J. Appl. Biochem.* v.4, p. 356-363, 1986.

URLAUB, R. Enzymes in fruit and vegetable juice extraction. In: Whitehurst, R. and Law, B. *Enzymes in food technology*. Sheffield, Academic Press, CRC Press. 2002. p. 145-183.

VAHERI, M. P.; LEISOLA, M.; KAUPINEN, V. Transglycosylation products of the cellulase system of *Trichoderma reesei*, *Biotech. Letts.* v.1, p.41-46, 1979.

VAN DRIEL, R.; FRANSZ, P.F.; VERSCHURE, P.J. The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J Cell Sci* v.116:4067-4075, 2003.

VASSEUR, V.; VAN MONTAGU, M.; GOLDMAN, G. H. *Trichoderma harzianum* genes induced during growth on *Rhizoctonia solani* cell walls. *Microbiology* v.141, p. 767-774, 1995.

VEHVILÄINEN, M. et al. Celsol –Biotransformation of cellulose for fibre spinning. In: KENNEDY, J.F.; PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A. *The Chemistry and Processing of Wood and Plant Fibrous Materials*. Cambridge. Woodhead Publishing Limited. 1996. p. 197-204.

VITERBO, A. et al. *Trichoderma* mitogen-activated protein kinase signaling is involved in induction of plant systemic resistance. *Appl Environ Microbiol.* v.71, n.10, p.6241-6, 2005.

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, 2002.

WANG, P.; NUSS, D.L. Induction of a *Cryphonectria parasitica* cellobiohydrolase I gene is suppressed by hypovirus infection and regulated by a GTP-binding-protein-linked signaling pathway involved in fungal pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* v.92, p.11529-11533, 1995.

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

WHIPPS, J. M., LUMSDEN R. D., (1991) Biological control of *Pythium* species. *Biocontrol Sci Technol* 1:75-90.

WOO, S.L. et al. The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma* spp., Phytopathogenic Fungi, and Plants. *Phytopathol* v.96, p. 81-185, 2006.

WOOD, T. M. Mechanism of cellulose degradation by enzymes from aerobic and anaerobic fungi. In: COUGHLAN, M. P. *Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation*. London. Elsevier. 1989. p. 17-35.

ZEILINGER, S. et al. Signal transduction by Tga3, a novel G protein alpha subunit of *Trichoderma atroviride*. *Appl Environ Microbiol* v.71, p.1591-1597, 2005.

ZEILINGER, S. et al. Nucleosome transactions on the *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cellulase promoter cbh2 associated with cellulase induction. *Mol Genet Genomics*. v.270, n.1, p. 46-55, 2003.

ZEILINGER, S. et al. The *Hypocrea jecorina* Hap 2/3/5 protein complex binds to the inverted CCAAT-box (ATTGG) within the cbh2 (cellobiohydrolase II gene) activating element, *Mol. Genet. Genomics* v. 266, p. 56-63, 2001.

ZEILINGER, S.; MACH, R. L.; KUBICEK, C. P. Two adjacent protein binding motifs in the cbh2 (cellobiohydrolase II-encoding) promoter of the fungus *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cooperate in the induction by cellulose, *J. Biol. Chem.* v.273, p. 34463-34471, 1998.

ANEXOS

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORAMENTO

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

Relacionados com a Tese

1. SILVA, R. N. ; STEINDORFF, A. S. ; ULHOA, Cirano José ; FELIX, C. R. .
Análise da expressão de N-acetilglicosaminidase e quitinase em mutantes de *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) para proteína G subunidades Galfa s e Galfa i com ausência de atividade GTPasica. In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília.
2. SCHMOLL, Monika ; FRIEDL, Martina ; SILVA, R. N. ; DORRER, Marcel ; KUBICEK, Christian P . Stages and impact of crosstalk between light response and cellulase signal transduction in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). In: 8TH EUROPEAN CONFERENCE ON FUNGAL GENETICS, 2006, Viena, 2006.
3. SILVA, R. N. ; KUBICEK, Christian P ; SCHMOLL, Monika . Light- and inducer-dependent modulation of cellulase gene expression by the Galfa protein GNA3 of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). In: 8TH EUROPEAN CONFERENCE ON FUNGAL GENETICS, 2006, Viena, 2006.
4. SILVA, R. N. ; STEINDORFF, A. S. ; SILVA, Silvana P. da ; ULHOA, Cirano Jose ; FELIX, C. R. . Evaluation of Celullase activity in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) construct strains bearing a dominant active allele of GNA3 (=Lacking GTPase acitivity) under light induction. In: VII Seminario Brasileiro de Tecnologia Enzimatica, 2006, Caxias do Sul. Anais do VII ENZITEC, 2006.

Outros Trabalhos

1. STEINDORFF, A. S. ; MARCELLO, C. M. ; SILVA, R. N. ; ULHOA, Cirano Jose . Expression of the exo-beta-1,3-glucanase from the mycoparasitic *Trichoderma asperellum*. In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasilia. 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007.
2. BARROS, M. C. ; SILVA, R. N. ; MONTEIRO, Valdirene Neves ; ULHOA, Cirano Jose . Avaliação do efeito de tunicamicina na glicosilação da alfa-amilase produzida por *Cryptococcus flavus* e sua consequência na secreção, estabilidade e atividade da enzima. In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasilia. 24º congresso brasileiro de microbiologia, 2007.
3. STEINDORFF, A. S. ; MARCELLO, C. M. ; R. N. Silva ; C. J. Ulhoa . Análise da Expressão da Exo-beta-1,3-glucanase produzida Pelo Agente de Controle Biológico *Trichoderma asperellum*. In: XV Seminário de Iniciação Científica, 2007, Goiânia. Anais do IV COMPEEX, 2007.
4. RAMADA, M. H. S. ; SILVA, R. D. N. ; ULHOA, C. J. . Purificação da alfa-amilase de *Cryptococcus flavus* após tratamento com tunicamicina. In: IV Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão, 2007, Goiânia. Anais do IV Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão, 2007.
5. RAMADA, M. H. S. ; SILVA, R. D. N. ; ULHOA, C. J. . Purificação e Caracterização da alfa-amilase de *Cryptococcus flavus* após tratamento com tunicamicina, um inibidor de N-glicosilação. In: 24 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília. Anais do 24 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007.

6. GALDINO, A. S. ; Silva, R.N ; Moraes, L.M.P ; Ulhoa, C.J ; Torres, F.A.G .
Expression of an alpha-amilase gene from *Cryptococcus flavus* in *Saccharomyces cerevisiae* and some properties of the recombinant enzyme.. In:
24 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília-DF. Anais do 24
Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007.

7. MINAFRA, C. ; LOPES JUNIOR, C. ; LOPES, A. C. ; SILVA, R. N. . Perfil
bioquímico e nutricional do balanço eletrolítico e protéico dietéticos sobre as
aminotransferases do tecido hepático de frangos de corte. In: 43ª reunião anual
da sociedade brasileira de zootecnia, 2006, João Pessoa. Anais do 43ª reunião
anual da sociedade brasileira de zootecnia, 2006.

8. MORAIS, G. ; MINAFRA, C. ; SILVA, R. N. . Efeito do balanço eletrolítico e
níveis de proteína bruta sobre as aminotransferases no tecido renal de pintos de
corte de um a 21 dias de idade. In: 43ª Reunião anual da sociedade brasileira de
zootecnia, 2006, João Pessoa. Anais do 43ª Reunião anual da sociedade
brasileira de zootecnia, 2006.

ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

Relacionados com a tese

1. SILVA, R. N.; SCHUSTER, A.; KUBICEK, C. P.; SCHMOLL, M. The G-alpha
protein GNA3 of *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*) regulates
cellulase gene expression in the presence of light. Eukariotic Cell, submetido,
2008.

2. SILVA, R. N.; STEINDORFF, A. S.; ULHOA, C. J.; FÉLIX, C. R.
Involvement of G-alpha protein GNA3 in production of cell wall-degrading
enzymes by *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) during mycoparasitism
against *Pythium ultimum*, Biotechnology Letters, submetido, 2008.

Outros Trabalhos

1. BARROS, M. C. ; SILVA, R. N. ; RAMADA, M.S. ; GALDINO, A. S.; MORAES, L. M. P. ; TORRES, F. A. G.; ULHOA, C. J. The influence of N-glycosylation on biochemical properties of Amy1, an alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *Current Microbiology*, submetido, 2008.
2. MARCELLO CM, STEINDORFF AS, DA SILVA SP, SILVA RD, MENDES BATAUS LA, ULHOA CJ. Expression analysis of the exo-beta-1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiol Res.* in press, 2008 Sep 17.
3. SILVA, R. N.; QUINTINO, F. P.; MONTEIRO, V. N.; ASQUIERI, E. R. Production of glucose and fructose syrup from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) starch using enzymes produced by microorganisms isolated from Brazilian Cerrado soil. *Sbcta*, submetido, 2008.
4. ALMEIDA, Fausto Bruno dos Reis ; CERQUEIRA, F. M. ; SILVA, R. N. ; ULHOA, Cirano Jose ; LIMA, A. L. . Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, v. 29, p. 1189-1193, 2007.
5. ULHOA, Cirano Jose ; SILVA, R. N. . Biotecnologia Farmacêutica e seus desafios. *Extensão e Cultura (UFG)*, v. 1, p. 61-64, 2007.