



Universidade de Brasília

Instituto de Biologia

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular)

Vesículas extracelulares secretadas por *Trichoderma harzianum* durante a interação com *Sclerotinia sclerotiorum*.

Gabrielle Rosa Silva

Orientadora: Dra. Prof Eliane Ferreira Noronha

Dezembro, 2024

Gabrielle Rosa Silva

Vesículas extracelulares secretadas por *Trichoderma harzianum* durante a interação com *Sclerotinia sclerotiorum*.

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas modalidade Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Molecular.

Orientadora: Prof. Dra. Eliane Ferreira Noronha

Dezembro, 2024

Gabrielle Rosa Silva

Vesículas extracelulares secretadas por *Trichoderma harzianum* TR 274 durante a interação com *Sclerotinia sclerotiorum*.

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas ênfase em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Molecular.

Data defesa: _____ / _____ / _____.

Banca examinadora:

Externa à Instituição - Raphaela De Castro Georg - UFG

Externa à Instituição - Valdirene Neves Monteiro - UEG

Interno - 2122696 - Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Interna - 2222088 - Eliane Ferreira Noronha

Externo à Instituição - Pedro Ricardo Vieira Hamann - USP

O Presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES).

Dedicatória

Dedico essa Tese à minha avó, Maria Imaculada da Silva, que sempre esteve ao meu lado, uma mulher preta, que foi mãe de 5 solo e que superou cada obstáculo da vida com um sorriso, e que nunca deixou faltar amor e carinho dentro de casa. Mulher esta que me incentivou a estudar, mesmo não sendo alfabetizada.

Agradecimentos

A minha mãe, Glorimar, que sempre esteve ao meu lado, que fez o possível para que eu realizasse mais um sonho da minha vida. Quero que saiba que cada conquista minha é fruto do seu apoio.

Ao Cirano José Ulhoa, que me acolheu e me fez apaixonar pela ciência quando eu estava com 15 anos e ainda cursando o ensino médio. Quero que entenda que essa Tese é o fruto da semente que foi plantada. Agradeço profundamente por cada ensinamento, pelo apoio em momentos desafiadores e pela confiança em minhas capacidades. O Cirano é e sempre será o meu espelho.

A Eliane Ferreira Noronha, minha oreindatora, que me apoiou, impulsunou e fez crescer dentro do ambiente acadêmico. Professora, quero que saiba que a sua dedicação e exemplo me inspirou em cada etapa deste trabalho e seguirão como uma referência para mim. Minha gratidão por você é imensa, pois sem o seu apoio e incentivo, esta conquista não seria possível.

Aos amigos e colegas do laboratório de Enzimologia da UnB e da UFG, que compartilharam comigo não apenas o espaço de pesquisa, mas também desafios, conquistas, risadas e aprendizados ao longo dessa jornada. Vocês foram fundamentais nos momentos de dúvida e cansaço, sempre prontos para apoiar e motivar. Obrigada por cada conversa, cada ida ao RU para que vocês pudessem me dar algum conselho e incentivo, que tornaram o caminho mais leve e enriquecedor. Este trabalho é também o reflexo da nossa amizade, que seguirão como parte das minhas melhores lembranças. A todos vocês, minha sincera gratidão.

Aos programas da CAPES e ao CNPQ pelo suporte financeiro. Ao pessoal da FARMATEC da Universidade Federal de Goiás e da USP, em especial ao Professor Dr. Fausto Bruno dos Reis Almeida, pelos direcionamentos da pesquisa.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, cuja parceria e apoio foram fundamentais ao longo desta jornada. Aos meus estudantes, que me enxergam como exemplo na carreira científica e me inspiram a crescer a cada uma de suas conquistas. A todos vocês, minha sincera gratidão, pois eu sei que estou construindo um caminho de aprendizado e evolução.

Resumo

Os agentes de biocontrole pertencentes ao gênero *Trichoderma*, desempenham um papel fundamental na diminuição do uso de agentes químicos para o controle de pragas, principalmente fungos fitopatogênicos. A interação entre *Trichoderma sp.* e fungos fitopatogênicos envolve comunicação molecular complexa, na qual o agente de biocontrole secreta moléculas que atuam no reconhecimento e colonização dos patógenos, resultando em mudanças metabólicas e estruturais no hospedeiro. Os três principais mecanismos são observados nesta interação: micoparasitismo, competição e antibiose. Além disso, o *Trichoderma sp.* estabelece interações benéficas com plantas, atuando como agente de biocontrole e bioestimulante. As vesículas extracelulares (VEs) desempenham papel fundamental no processo de comunicação entre as células. Estas já foram descritas como carreadoras de proteínas, DNA, RNA durante a interação entre espécies diferentes. Neste sentido, no presente trabalho foi realizado um estudo de análise de vesículas extracelulares produzidas por *T. harzianum* TR 274 durante o crescimento com o micélio do fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum* e na presença de *Phaseolus vulgaris*, visando analisar sua participação e papel na comunicação entre *T. harzianum* e fungo fitopatogênico no qual estabelece uma relação negativa e com uma planta hospedeira da qual é simbiote. Foram encontradas VEs secretadas por *T. harzianum* durante o crescimento com glicose, sacarose e com o micélio do fungo fitopatogênico, *S. sclerotiorum* bem como, foram encontradas VEs secretadas por *P. vulgaris* e em co-cultivo. Ao total, foram identificadas 42 proteínas nas VEs purificadas no sobrenadante das culturas resultantes do crescimento de *T. harzianum* com micélio do fungo fitopatogênico e em glicose. A morfologia e o tamanho das VEs analisadas são semelhantes aos encontrados para VEs purificadas de outros fungos filamentosos. As atividades de hidrolase (47%), seguida pela atividade transferase (14%) foram as categorias das enzimas com maior abundância encontrada na análise do Gene Ontology (GO). sugerimos que as VEs purificadas desempenham o papel de transporte de proteínas no mecanismo de interação do *T. harzianum* TR 274 com seus hospedeiros.

Palavras-chave: Vesículas extracelulares; *Trichoderma harzianum*; micoparasitismo.

Abstract

Biocontrol agents belonging to the *Trichoderma* genus play a fundamental role in reducing the use of chemical agents for pest control, especially phytopathogenic fungi. The interaction between *Trichoderma* sp. and phytopathogenic fungi involves complex molecular communication, in which the biocontrol agent secretes molecules that act in the recognition and colonization of pathogens, resulting in metabolic and structural changes in the host. The three main mechanisms are observed in this interaction: mycoparasitism, competition and antibiosis. In addition, *Trichoderma* sp. establishes beneficial interactions with plants, acting as a biocontrol agent and biostimulant. Extracellular vesicles (EVs) play a fundamental role in the process of communication between cells. They have already been described as carriers of proteins, DNA, RNA during the interaction between different species. In this sense, this study carried out an analysis of extracellular vesicles produced by *T. harzianum* TR 274 during growth with the mycelium of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* and in the presence of *Phaseolus vulgaris*, aiming to analyze their participation and role in the communication between *T. harzianum* and the phytopathogenic fungus with which it establishes a negative relationship and with a host plant of which it is a symbiont. EVs secreted by *T. harzianum* were found during growth with glucose, sucrose and with the mycelium of the phytopathogenic fungus, *S. sclerotiorum*, as well as EVs secreted by *P. vulgaris* and in co-cultivation. In total, 42 proteins were identified in the EVs purified in the supernatant of the cultures resulting from the growth of *T. harzianum* with mycelium of the phytopathogenic fungus and in glucose. The morphology and size of the analyzed EVs are similar to those found for purified EVs from other filamentous fungi. Hydrolase activities (47%), followed by transferase activity (14%) were the enzyme categories with the highest abundance found in the Gene Ontology (GO) analysis. We suggest that the purified EVs play the role of protein carrier in the interaction mechanism of *T. harzianum* TR 274 with its hosts.

Keywords: Extracellular vesicles; *Trichoderma harzianum*; mycoparasitism.

Lista de figuras

Figura 1. Esquema do mecanismo de micoparasitismo, envolvendo secreção de enzimas hidrolíticas de parede celular, peptídeos e pequenas proteínas, proteases, metabólitos secundários, espécies reativas de oxigênio (ROS), realizado pelo *Trichoderma* spp. (imagem autoral) **Página 14.**

Figura 2. Esquema de ativação de duas vias de secreção de moléculas do gênero *Trichoderma* em resposta a diferentes sinais moleculares representados pelos seus hospedeiros (imagem autoral). **Página 17.**

Figura 3. Esquema da interação *Trichoderma* spp. com a raiz de planta. O *Trichoderma* spp. quando presente na raiz, induz a resistência sistêmica (IRS) através da secreção de enzimas como a xilanase, assim como os Peptaibols e Sm1. Durante o desenvolvimento na planta, *Trichoderma* sp. produz nitrilase e ACCD. A primeira é uma enzima responsável pela indução da promoção de crescimento, assim como ACCD, que regula a produção de etileno. Durante o desenvolvimento no ambiente na raiz, o *Trichoderma* spp. consome o mucigel rico em sacarose secretado pela planta, atenuando o processo de micoparasitismo contra agentes fitopatogênicos. **Página 21.**

Figura 4. Análise das vesículas purificadas por NTA e microscopia eletrônica de transmissão. As vesículas foram purificadas do sobrenadante da cultura do *T. harzianum* cultivado na presença de glicose como fonte de carbono por 24 h (a, b, c), 48 h (d, e, f) e 72 h (g, h, eu). (a, d, g). Os resultados gráficos do Nanosight e imagens obtidas com o software (b, e, h). Imagens das microscopias eletrônicas de transmissão (c, f, i) das vesículas purificadas. **Página 39.**

Figura 5. Análise das vesículas purificadas do *T. harzianum* TR274 secretadas durante o crescimento de micélios do *S. sclerotiorum* por 24 h (a, b, c), 48 h (d, e, f) e 72 h (g, h, i). (a, d, g). Os resultados dos gráficos do Nanosight e imagens obtidas pelo software (b, e, h). Imagens das microscopias eletrônicas de transmissão (c, f, i) das vesículas purificadas. **Página 40.**

Figura 6. Análise das vesículas secretadas purificadas pelo *T. harzianum* TR274 durante o crescimento com sacarose nos tempos de 24 hrs (A), 48 hrs (B) e 72 hrs (C); Análise das vesículas secretadas purificadas pelo *P. vulgaris* durante o crescimento em meio MS nos tempos de 24 hrs (D), 48 hrs (E) e 72 hrs (F) ; Análise das vesículas secretadas pelas raízes purificadas pelo *P. vulgaris* durante o crescimento na presença de *T. harzianum* TR 274 nos tempos de 24 hrs (G), 48 hrs (H) e 72 hrs (I) no NTA. **Página 42.**

Figura 7. Imagens das microscopias eletrônicas de transmissão da membrana plasmática (seta na imagem b) das vesículas purificadas secretadas pelo *T. harzianum* TR274 após 48 hrs de crescimento com micélio do fungo *S. sclerotiorum* (a e b). Visualização de um corpúsculo multivesicular (seta nas imagens c e d) da amostra com S48 das vesículas extracelulares purificadas secretadas pelo *T. harzianum* TR274 após o crescimento em sacarose. **Página 43.**

Figura 8. Análise de proteínas de VEs purificadas a partir do sobrenadantes do cultivo de *T. harzianum* TR274 por SDS-PAGE 12%. *T. harzianum* TR274 do sobrenadante antes do processo de ultraacentrifugação com micélio do fungo *S. sclerotiorum* ou com glicose (A); *T. harzianum* TR274 com o crescimento em micélio do fungo *S. sclerotiorum* ou com glicose das amostras após o processo de ultracentrifugação (B); e com as vesículas extracelulares purificadas do *T. harzianum* TR274 com o crescimento em sacarose (C). Análise das proteínas com 10 ug de proteínas das amostras com as vesículas extracelulares purificadas do *T. harzianum* TR274 com o crescimento em micélio do fungo *S. sclerotiorum* ou com glicose (D). **Página 43.**

Figura 9. Diagrama de Venn das proteínas das vesículas purificadas com o crescimento com micélio (MM) e com glicose. **Página 44.**

Figura 10. A categorização das proteínas utilizando o software Omicsbox, correspondendo as funções moleculares (verde), componentes celulares (cinza) e processos biológicos (preto). **Página 46.**

Lista de tabelas

Figura 1. Tamanho médio das nanopartículas obtidas através do *Nano Traffic Analysis* (NTA). **Página 48.**

Tabela 2. Proteínas das vesículas extracelulares identificadas secretadas pelo *T. harzianum* TR274 em crescimento com micélio autoclavado do *S. sclerotiorum* (M) ou em glicose (G). **Página 50.**

Lista de siglas

NRP-Peptídeos não ribossômicos.

VEs-Vesículas extracelulares.

PAMPs- Padrões moleculares associados a patógeno.

SAR-Resistência sistêmica adquirida.

PR- Genes relacionados a patogêneses.

MAMPs-Padrões moleculares específicos e que estão associados a microrganismos.

G-Glicose.

MS-Micélio de *S. Sclerotiorum*.

MS-Murashige and Skoog.

TFA-Ácido trifluoroacético.

ROS-Espécies reativas de oxigênio.

ESCRT-Complexo de triagem endossomal necessário para o transporte.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 <i>T. harzianum</i>	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Interação <i>T. harzianum</i> e fungos fitopatogênicos	15
2.2 Resposta de defesa em plantas hospedeiras e interação com <i>T. harzianum</i>	21
2.3 Vesículas extracelulares: transporte de moléculas envolvidas em interações	25
3. OBJETIVOS	29
3.1 Obejetivo Geral	29
3.2 Objetivos específicos	30
4. METODOLOGA	30
4.1.1 Cultivo e manutenção dos organismos modelos	30
4.1.2 Produção de micélio do <i>S. sclerotiorum</i>	31
4.1.3 Crescimento e manutenção de <i>T. harzianum</i> TR274.	31
4.2.1 Assepcia e germinação das sementes	32
4.2.2 Co-cultivo do <i>T. harzianum</i> TR274 com <i>P. vulgaris</i>	32
4.2.3 Crescimento de <i>T. harzianum</i> TR 274 na presença de sacarose	33
4.3.1 Purificação de vesículas extracelulares	35
4.3.2 Detecção e quantificação das vesículas extracelulares por NTA	35
4.3.3 Visualização de vesículas por microscopia eletrônica de transmissão	35
4.3.4 Análise de proteínas vesiculares por espectrometria de massas	36
4.3.5 Análise dos dados	38
5. Resultados e Discussão	39
6. Conclusões e Perspectivas	45
6. Anexo 1. Artigo referente a tese.	46
7. Referências Bibliográficas	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 *T. harzianum*

A espécie *T. harzianum* se caracteriza por ser de solo, saprófita, micoparasita ou simbioses de plantas (RUBIO et al., 2017; CONTRERAS-CORNEJO et al., 2014). Esta espécie pertence à classe Sordariomycetes do filo Ascomycota, caracterizado pela formação de corpos de frutificação do tipo peritécio, formados em estromas de coloração verde, amarelada, creme ou marrom (JAKLITSCH, 2009). Quando colonizando plantas hospedeiras esta espécie é encontrada na rizosfera, colonizando o tecido radicular ou até mesmo o tecido vascular (GUZMÁN-GUZMÁN et al., 2017; RUBIO et al., 2017; BŁASZCZYK et al., 2014).

A associação entre este fungo e plantas hospedeiras proporciona efeitos positivos como a promoção de crescimento, aumento da captação de nutrientes e indução de resistência a estresses bióticos e abióticos (GUZMÁN-GUZMÁN et al., 2017; RUBIO et al., 2017).

Esta espécie também é parasita de fungos fitopatogênicos, sendo a mais empregada no controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* (SHORESH; HARMAN; MASTOURI, 2010; WOO et al., 2006). De fato, a possibilidade de sua utilização como agente de biocontrole impulsionou pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de produtos comerciais à base desta espécie, assim como para o entendimento da biologia e mecanismo de interação com seus hospedeiros (fungos e plantas hospedeiras). Produtos comerciais à base de *T. harzianum* representam uma alternativa sustentável para os tratamentos químicos poluentes, largamente utilizados no controle de doenças fúngicas em culturas no Brasil e no mundo (BŁASZCZYK et al., 2014).

Vesículas extracelulares (VEs) são secretadas através da membrana celular e já foi descrito seu papel na comunicação entre células e organismos, transportando proteínas, lipídios, RNAs. Em plantas, as VEs já foram descritas como importantes para o crescimento e desenvolvimento das plantas, na resposta de defesa, e simbiose com fungos (RUTTER; INNES, 2017, 2018). Assim, VEs têm papel na interação entre organismos diferentes, sendo fundamental na comunicação e sinalização intraespécies.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Interação das espécies de *Trichoderma* e fungos fitopatogênicos

A interação entre algumas espécies de *Trichoderma*, como o *T. harzianum* e fungos fitopatogênicos é caracterizada pela capacidade de comunicação entre as duas partes, que envolve a produção e secreção de moléculas que atuam no processo de reconhecimento, colonização e que desencadeiam mudanças no metabolismo, crescimento, entre outras alterações nos hospedeiros (NAWROCKA; SZCZECH; MAŁOLEPSZA, 2018). Esta espécie se caracteriza pelo rápido crescimento e capacidade de colonizar e metabolizar diferentes substratos presentes no solo substratos, competindo no microbioma que faz parte por espaço físico, luz, oxigênio e nutrientes (MORALES et al., 2024)

A atividade micoparasita de *T. harzianum* sobre fungos fitopatogênicos é um processo complexo que pode envolver três dos mecanismos principais: micoparasitismo, competição e antibiose.

O micoparasitismo se inicia pelo contato direto com o patógeno ocorrendo através do reconhecimento, seguido pela penetração das hifas hospedeiras e a morte do hospedeiro (POVEDA; ABRIL-URIAS; ESCOBAR, 2020).

A figura 1 representa a interação entre o fungo micoparasita *T. harzianum* e o fungo hospedeiro, evidenciando o processo de parasita e defesa. No contexto da interação, é possível notar a liberação de diferentes moléculas e compostos que desempenham papéis cruciais no processo. As espécies de *Trichoderma* secreta proteases, representadas por pequenos círculos amarelos próximos ao micélio, que têm a função de degradar proteínas do hospedeiro. Além disso, são destacadas a liberação de peptídeos, espécies reativas de oxigênio (ROS) e compostos voláteis, que contribuem para a inibição e degradação das estruturas do fungo hospedeiro (ZHAO et al., 2024; WU et al., 2022; SINGH et al., 2022; WANG et al., 2024).

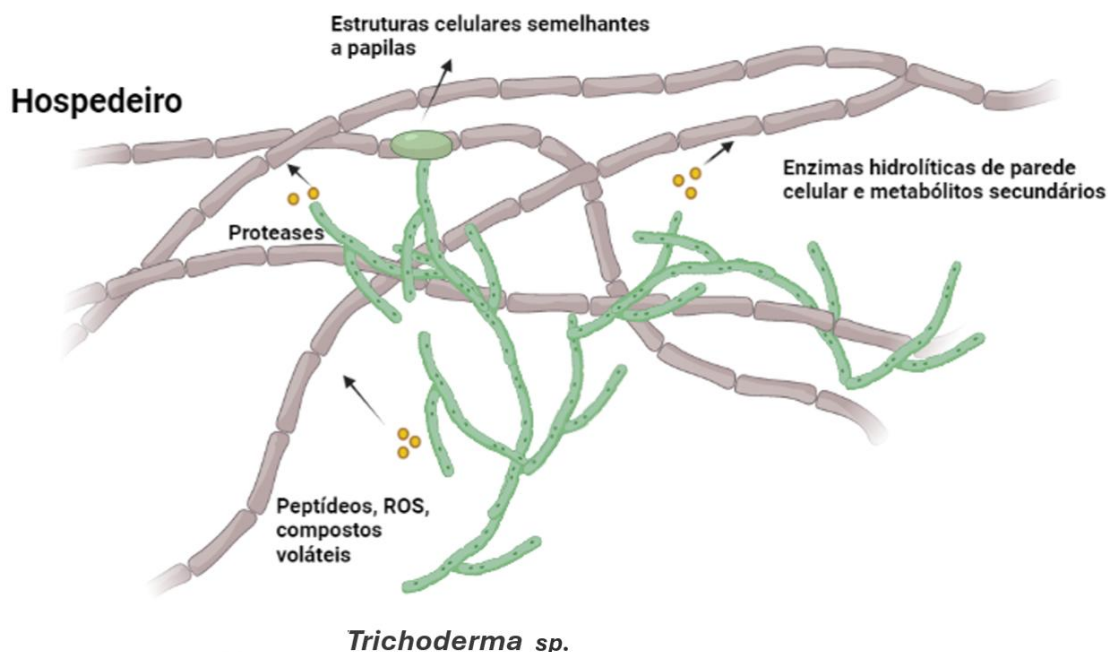


Figura 1. Esquema do mecanismo de micoparasitismo, envolvendo secreção de enzimas hidrolíticas de parede celular, peptídeos e pequenas proteínas, proteases, metabólitos secundários, espécies reativas de oxigênio (ROS), realizado pelo *Trichoderma harzianum* (Imagem desenvolvida com o Biorender).

O mecanismo de micoparasitismo está relacionado com a temperatura e com o pH do ambiente (KISHAN et al., 2017). O contato das hifas de *T. harzianum* com as hifas dos hospedeiros desencadeia mudanças conformacionais nas suas células mediadas pela lectina. A lectina é uma proteína encontrada na parede celular dos patógenos e é capaz de induzir o processo de micoparasitismo regulando uma série de vias de sinalização *T. harzianum* pela mudança conformacional dos receptores transmembrânicos. A mudança conformacional dos receptores transmembrânicos acoplados a proteínas G (Gpr-1) e receptores dependentes de nitrogênio (SNR), é modulada e estes desencadeiam cascatas de sinalizações dentro das células do *T. harzianum* (OMANN, et al. 2012). Nesse processo de sinalizações, a ativação dos receptores acima mencionados, estão relacionadas com as vias de sinalização mediadas por MAPKs, especificamente as proteínas Tmk1 e TmkA, e através da via de sinalização com o cAMP (Figura 2) (OMANN, et al. 2012; ATANASOVA et al., 2023).

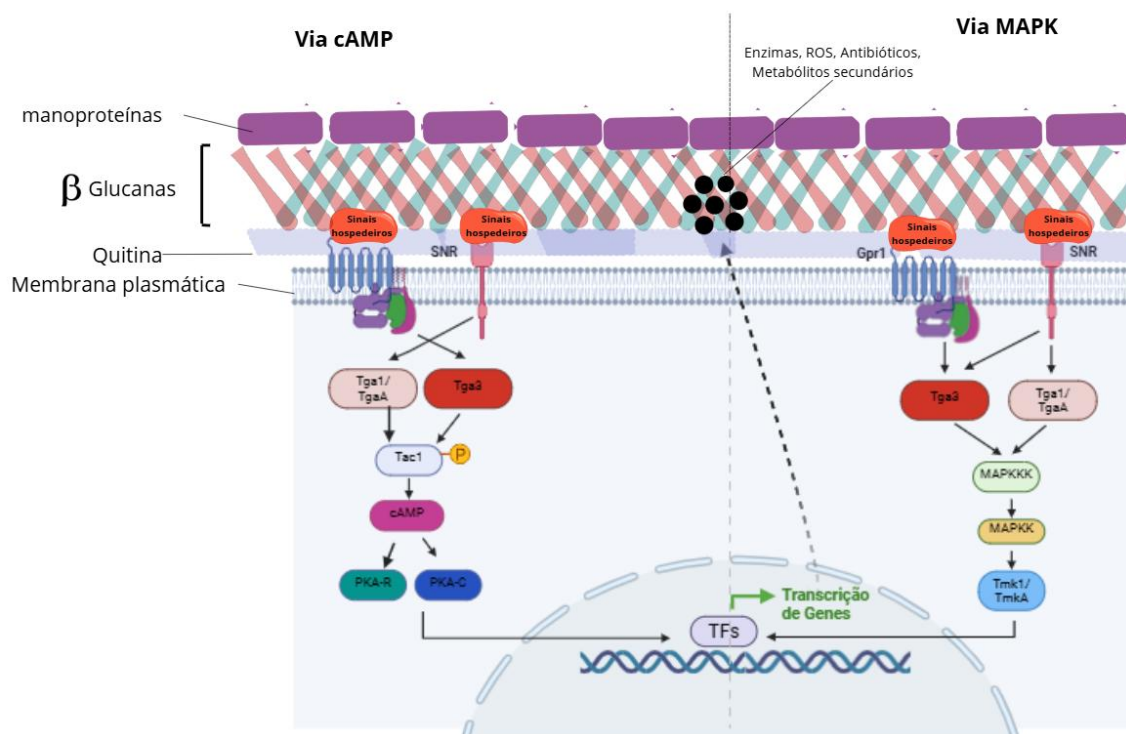


Figura 2. Esquema de ativação de duas vias de secreção de moléculas do gênero *Trichoderma* em resposta a diferentes sinais moleculares representados pelos seus hospedeiros (Imagem desenvolvida com o Biorender).

As vias de sinalização mediadas por MAPKs se inicia através das moléculas liberadas pelo fungo hospedeiro, como polissacarídeos da parede celular, são reconhecidas por receptores de membrana no *T. harzianum*. Isso inicia a cascata MAPK por fosforilação da MAP3K, que ativa a MAP2K e, subsequentemente, a MAPK por meio de reações de transferência de fosfato dependentes de ATP. (SCHIRMER et al., 2006; HARMAN et al., 2004). A MAPK ativada transloca-se para o núcleo, onde fosforila fatores de transcrição específicos que ativam a expressão de genes de enzimas hidrolíticas, como quitinases e glucanases. Essas enzimas desempenham um papel crítico na degradação da parede celular do fungo hospedeiro, permitindo a penetração e invasão nas células dos hospedeiros pelo *T. harzianum* (OMANN et al., 2012; ATANASOVA et al., 2018).

Além desses fatores, a via MAPK regula a remodelação do citoesqueleto, necessária para a formação de estruturas de adesão especializadas, como os apressórios, que facilitam a adesão ao hospedeiro. A fosforilação de proteínas envolvidas na remodelação do citoesqueleto, como actina, leva à polarização da célula do *T. harzianum* e ao crescimento direcionado às células do hospedeiro

(MORENO-RUIZ et al., 2017).

Além desses fatores, a ativação da via MAPK induz a expressão de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD) e catalase, que neutralizam espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas enzimas atuam transformando o peróxido de hidrogênio e radicais livres em moléculas menos reativas, protegendo o fungo contra danos oxidativos (SCHIRMER et al., 2006; HARMAN et al., 2004). A via MAPK também estimula a síntese de metabólitos secundários antifúngicos, como antibióticos e compostos voláteis. Essa biossíntese envolve enzimas que promovem reações bioquímicas, como ciclização e oxidação, resultando em compostos capazes de inibir o crescimento do fungo hospedeiro (HARMAN et al., 2004; OMANN et al., 2012).

As vias que modulam a expressão de proteínas no fungo micoparasita levando à produção de moléculas que atuam no processo, assim como a via relacionada ao AMPc, que é ativada e sinalizadas pela enzima adenilato ciclase (Tac1), subunidade reguladora (PKA-R) e subunidade catalítica da proteína quinase dependente de AMPc (PKA-C) que atuam como efetores que uma vez fosforilados e atuam na transcrição de genes de enzimas hidrolíticas de parede celular, na secreção de metabólitos secundários, compostos voláteis e espécies reativas de oxigênio, alongamento das hifas e alteração da conformação das hifas de forma helicoidal (Figura 2) (LI, N. et al., 2018; GRUBER; OMANN; ZEILINGER, 2013; ATANASOVA et al., 2018).

Estudos mostraram que mutantes de *T. virens* com deleção dos genes do receptor transmembrana Gpr1, acoplado a proteína G, perdem a atividade micoparasítica, mostrando a importância desse receptor na atividade micoparasita. Já em outros estudos realizados com mutantes para o gene *sfp2*, que regulam a expressão da família da proteína Sur7, e que são regulados pelo receptor Gpr-1, observou-se a ação atenuante no *T. atroviride* relacionado à sua atividade micoparasita, crescimento, formação micelial, a modulação estrutura da parede celular e a capacidade de realizar endocitose. Além dessas proteínas, Tga1, Tga3, Tmk1 que são proteínas citoplasmáticas do fungo *T. atroviride*, e as TgaA, TmkA, Tac1, observou-se a atuação dessas proteínas com atividades de regulação dos processos de conidiação, atividade da quitinase que são essenciais relacionados ao micoparasitismo (Figura 2) (OMANN et al., 2012; ATANASOVA et al., 2018; DING et al., 2020).

Quando se trata do mecanismo de interação fungo-fungo, o *Trichoderma* possui características de alternância metabólica. Durante a interação com o fungo patogênico *Guignardia citricarpa* causador da doença em plantas caracterizada pelas manchas pretas em folhas, o fungo *T. harzianum* T1A reduz a quantidade total de proteínas secretadas relacionadas principalmente ao metabolismo primário, e aumenta a secreção de proteínas relacionadas à interação com o fitopatógeno, com isso aumentando a atividade envolvida no processo de micoparasitismo (BLAUTH DE LIMA et al., 2017).

As enzimas de degradação de parede celular de distintas cepas de *Trichoderma* spp. apresentam sua eficácia inibindo a germinação de esporos, o crescimento de hifas e o desenvolvimento de estruturas de resistência como escleródios em organismos que causam doenças em plantas (HARMAN et al., 2004; MUKHERJEE et al., 2012; POVEDA et al., 2019). Essas enzimas são expressas e secretadas pela influência das moléculas presentes na parede do fitopatógeno. Essas enzimas são as quitinases, β -1,4-N-acetilglucosaminidase, α -1, 2-manosidase, fosfatase ácida, proteases, β -1,3-, β 1,6- , α -1,3-glucanases que foram encontradas em estudos na interação de fungos do gênero *Trichoderma* com agentes fitopatogênicos *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Sclerotinia* e *Sclerotium* (STEINDORFF et al., 2014)(QUALHATO et al., 2013;HARMAN et al., 2004c; MUKHERJEE et al., 2012; POVEDA et al., 2019).

No micoparasitismo em *Trichoderma harzianum*, enzimas como α -1,2-manosidase, fosfatase ácida, proteases e glucanases (β -1,3-, β -1,6- e α -1,3-glucanases) desempenham papéis fundamentais na degradação da parede celular do fungo hospedeiro, permitindo a invasão e digestão dos componentes celulares. Essas enzimas participam de diferentes etapas da degradação, processamento e remodelação de polissacarídeos e proteínas da parede celular do fungo alvo. A enzima α -1,2-manosidase desempenha o papel de degradação das manoproteínas, que são polissacarídeos com resíduos de manose encontradas na parede celular do fungo hospedeiro. Os produtos da ação enzimática como os oligossacarídeos, facilitam o rompimento inicial da estrutura da parede. A enzima atua hidrolisando as ligações α -1,2 entre resíduos de manose, expondo outras camadas da parede celular para o a ação das enzimas subsequentes (BENÍTEZ et al., 2004).

Durante o micoparasitismo, o *T. harzianum* secreta fosfatases ácidas para desfosforilar componentes de fosfolipídios e proteínas presentes no fungo hospedeiro. Essa ação é importante para desestabilizar as membranas celulares e

facilitar a entrada de outras enzimas hidrolíticas. As fosfatases ácidas também participam da mobilização de fosfato orgânico, um recurso nutricional para o *T. harzianum* aumentando a eficiência do processo parasita (GUPTA et al., 2004).

As proteases hidrolisam as proteínas estruturais e de defesa na parede celular do fungo hospedeiro, como glicoproteínas, abrindo espaço para a ação de outras enzimas hidrolíticas. Isso não apenas facilita a invasão, mas também diminui as defesas do patógeno, tornando-o mais vulnerável ao ataque (DRUZHININA et al., 2011).

As β -1,3-glucanases quebram as ligações β -1,3 dos glucanos, uma das principais camadas da parede celular, enquanto as β -1,6-glucanases e α -1,3-glucanases hidrolisam glucanas com outras especificidades de ligação. Essas enzimas são essenciais na degradação de glucanas, que são componentes estruturais da parede celular dos fungos. A ação combinada dessas enzimas compromete a integridade estrutural da parede celular dos fungos, facilitando a penetração e degradação das estruturas das células pelo *T. harzianum* (HARMAN et al., 2004).

A antibiose é caracterizada pela produção de antibióticos, metabólitos secundários e enzimas antimicrobianas que atuam inibindo o crescimento e em alguns casos eliminando o crescimento dos hospedeiros.

A antibiose acontece de forma sinérgica com o micoparasitismo, onde as enzimas hidrolíticas de parede celular atuam em conjunto com os antibióticos, proteases e metabólitos secundários ao estímulo das células hospedeiras (BATASZYCYK, 2014; LOPES et al., 2012; STEINDORFF et al., 2014; CONTRERAS-CORNEJO et al., 2016). Os metabólitos secundários são necessários na colonização de habitats, conferindo preeminência ecológica na conquista por ambiente, mesmo que não exercem um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento do fungo. Estas moléculas podem ser voláteis e não voláteis que afetam adversamente o crescimento de diferentes fungos. Alguns exemplos de metabólitos secundários secretados pelo fungo *Trichoderma* são os *peptaibols*, pequenos peptídeos não ribossômicos (NRP), poliquetídios (PK), terpenos e pironas como a 6-pentil- α -pirona (6-PP), gliotoxina, gliovirina, sideroforos. Essas moléculas são variáveis e estão relacionadas com a capacidade do *Trichoderma* em parasitar outros organismos (MUKHERJEE; HORWITZ; KENERLEY, 2012).

2.2 Resposta de defesa em plantas hospedeiras e interação com *T. harzianum*

Em estudos com esse mecanismo de interação da planta com agentes simbioses, observaram a redução da infecção de *F. oxysporum* de 96,7% para 30,0% após inoculação com *T. harzianum*, mostrando a eficiência do controle da doença colaborada pelo agente de biocontrole (CHEN et al., 2019). Em estudos com a enzima elicitadora xilanase Eix secretada pelo *Trichoderma* spp. Observaram a indução dessa enzima em respostas de defesa da planta, possibilitando a atuação da molécula como um MAMP, uma vez que a presença dessa molécula induziu expressão de genes relacionados a produção de ácido jasmônico (AJ) em plantas (GUO et al., 2021).

O *T. harzianum* em associação com plantas hospedeiras desencadeia a sua resposta de defesa, no entanto, esta resposta é menos intensa comparada com a resposta através da presença de patógenos. Desta forma, o fungo *T. harzianum* consegue colonizar o tecido vegetal e permanecer no ambiente em consequência da interação inicial (NAWROCKA; GROMEK; MAŁOLEPSZA, 2019).

A enzima 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD) participa de uma rota importante no mecanismo da promoção de crescimento e proporciona a planta tolerância a estresses bióticos e abióticos. O silenciamento gênico da enzima ACCD do fungo *T. asperellum* T203 reduziu a capacidade de promover o crescimento das raízes das mudas das plantas estudadas, indicando que a ACCD é uma molécula sinalizadora importante na interação *Trichoderma*-planta (VITERBO et al., 2010). Em estudos com o *T. koningiopsis* DEMTkZ3A0, a ACCD atuou como um regulador de ativação relacionado com a produção de etileno secretado pela planta durante o processo de interação (JAROSZUK-ŚCISEŁ et al., 2019). Outra enzima secretada pelo *Trichoderma* sp. relacionada com a indução do crescimento em plantas é a Nitrilase. Essa enzima é secretada durante a interação com as plantas e foi responsável por modular a secreção do hormônio 3-indol-acetonitrila (IAA), que é o último passo para a biosíntese de auxinas pelas plantas e consequentemente, promovendo o crescimento da planta (LIU et al., 2021).

A comunicação entre o *Trichoderma* e as plantas envolve proteínas secretadas como fatores chave. Análises recentes mostraram que os genomas de *Trichoderma* codificam centenas de proteínas efetoras potenciais (GUZMÁN-GUZMÁN et al.,

2017).

O papel dos efetores no estabelecimento da associação *Trichoderma*-raiz foi demonstrado experimentalmente na interação *T. virens* e raiz de milho. Observaram que perfis de proteínas presentes no tecido radicular de milho durante a influência mútua com *T. virens* mostram que, além dos efetores, o *T. virens* secreta produtos relacionados ao metabolismo secundário, que auxiliam o fungo na eliminação de espécies reativas de oxigênio e hidrólise da parede celular vegetal, sendo esses mecanismos essenciais na interação planta-fungo (NOGUEIRA-LOPEZ et al., 2018; SCHWEIGER et al., 2021).

Outros efetores incluem as proteínas Sm1 de *T. virens* e a ortóloga Epl1 de *T. atroviride*. Essas são proteínas cerato-platanina que induzem o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS). Além disso, provocam respostas de expressão gênica ligadas a patógenos em milho e algodão (DJONOVIC et al., 2006; SEIDL et al., 2006). Já em estudos com a deleção dos genes da proteína elicitora Epl1, observaram a alteração das expressões dos genes de micoparasitismo analisados em ensaios de confronto direto com o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* e o próprio *T. harzianum*, assim como o processo de enovelamento de hifas no hospedeiro e a modulação da expressão de genes de defesa de plantas. Estudos mostraram o envolvimento da Epl-1 de *T. harzianum* na interação com o hospedeiro e o reconhecimento de *T. harzianum* como fungo simbiótico pelo feijoeiro (Figura 3) (GOMES et al., 2015). Essa proteína induz a resistência sistêmica nas plantas, desencadeando a síntese de hidroperóxido liase, peroxidase e fenilalanina amônia liase, sendo essas moléculas indutoras do processo de lignificação. Além das proteínas citadas, os metabólitos secundários de *Trichoderma* são importantes. Harzianolide, 6-pentil- α -pirona e pequenos peptídeos antibióticos, conhecidos como *peptaibols* (Figura 3), podem induzir a defesa da planta (HERMOSA et al., 2012; EL-HASAN et al., 2022).

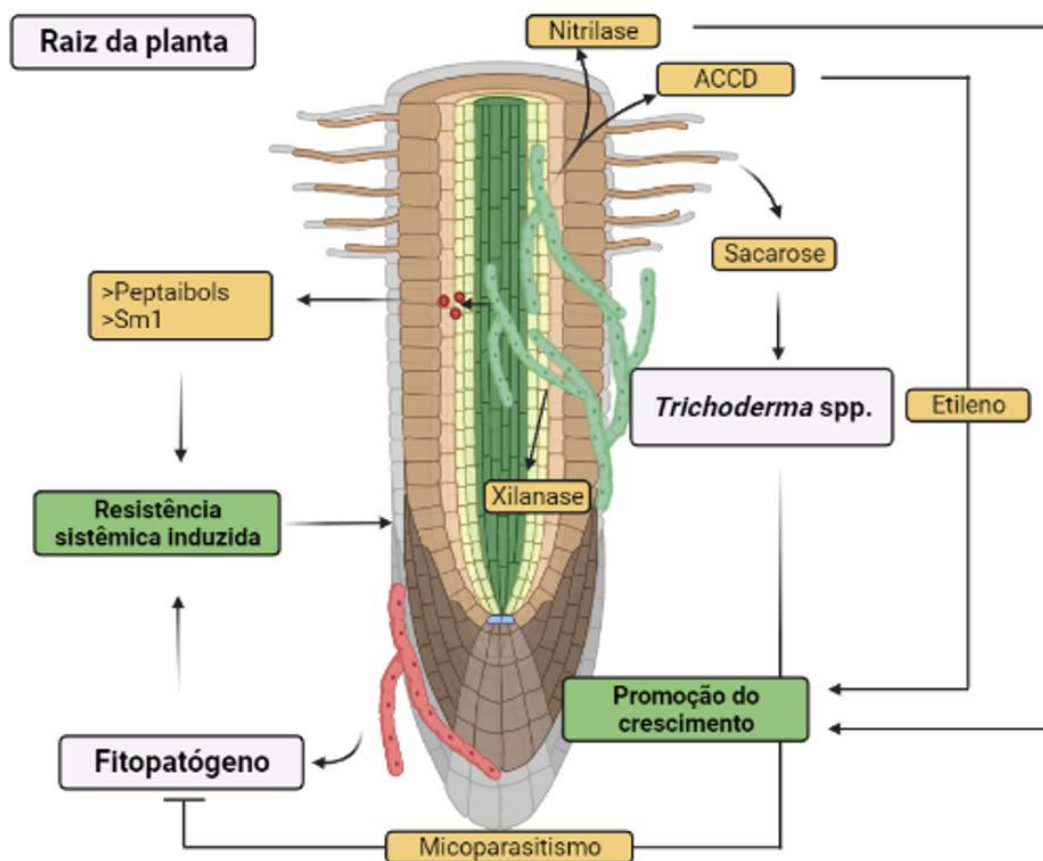


Figura 3. Esquema da interação *Trichoderma* spp. com a raiz de planta. O *Trichoderma* spp. quando presente na raiz, induz a resistência sistêmica (IRS) através da secreção de enzimas como a xilanase, assim como os *Peptaibols* e *Sm1*. Durante o desenvolvimento na planta, *Trichoderma* sp. produz nitrilase e ACCD. A primeira é uma enzima responsável pela indução da promoção de crescimento, assim como ACCD, que regula a produção de etileno. Durante o desenvolvimento no ambiente na raiz, o *Trichoderma* spp. consome o mucigel rico em sacarose secretado pela planta, atenuando o processo de micoparasitismo contra agentes fitopatogênicos (Imagem desenvolvida com o Biorender).

As plantas se defendem contra patógenos através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que provocam estresse oxidativo nos patógenos, dificultando o acesso aos tecidos da planta hospedeira. Outra característica apresentada pelo *Trichoderma* é a elevada tolerância ao estresse oxidativo. Algumas cepas de *Trichoderma* apresentam a particularidade de suportar níveis de ROS que outros fungos não conseguem tolerar (MORÁN-DIEZ et al., 2010; ESPARZA-REYNOSO et al., 2023). A anulação de doenças sistêmicas causadas por patógenos está relacionada a alterações oxidativas, de sinalização e bioquímicas, que são desencadeadas em resposta ao patógeno. Em estudos com indução da defesa sistêmica em pepino inoculados com *T. atroviride*, observaram a influência do *Trichoderma* no acúmulo de moléculas de sinalização óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nas folhas das plantas, sendo responsável pelas alterações oxidativas, de sinalização e bioquímicas, importantes durante a indução de respostas

de defesa da planta influenciando na defesa contra o *R. solani* (NAWROCKA; GROMEK; MAŁOLEPSZA, 2019). As análises funcionais de um gene que codifica uma NADPH oxidase de *T. harzianum* demonstraram que *Trichoderma* auto induz a produção da enzima em benefício de si próprio durante a interação com o patógeno *Pythium ultimum* (MORÁN-DIEZ et al., 2010).

Uma das estratégias de defesa das plantas é aumentar sua imunidade natural através da resistência induzida. Durante a infecção, o sistema imunológico da planta é ativado após o reconhecimento de organismos vivos através dos elicitores. Essas moléculas apresentam padrões moleculares específicos e que podem estar associados a microrganismos (MAMPs), podendo essas serem secretadas ou presentes no microrganismo. São exemplos das MAMPs: as flagelinas, peptidoglicanos, lipopolissacarídeos e quitina. No entanto, se essas moléculas com regiões específicas forem de agentes causadores de doenças, como os patógenos, elas são classificadas como moléculas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (BURKETOVA et al., 2015).

Os processos de reconhecimento dos PAMPs pelas células da planta são desencadeados por receptores presentes na membrana celular das plantas, sendo esses PAMPs indutores de uma primeira linha de defesa, chamada imunidade desencadeada por PAMP (PTI), que mantém a maioria dos invasores em potencial sob controle pelas plantas, independente se é um agente simbiote ou não. Essas moléculas podem ser proteínas, peptídeos, enzimas, pequenas moléculas como oligossacarídeos provenientes da degradação de paredes celulares e metabólitos secundários (HERMOSA et al., 2012a). Este mecanismo de defesa imunológico desencadeia uma resposta de curta ou longa duração, assim como local ou sistêmico. Esse processo de resposta ocorre de duas maneiras: resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (ISR) (HERMOSA et al., 2012; PIETERSE et al., 2014).

A mudança conformacional do corregulador transcricional NPR1 está relacionada a expressão de genes não relacionados a patogêneses, bem como genes relacionados a patogêneses (PR). Estes receptores desempenham um papel fundamental na resposta de uma planta contra patógenos. O NPR1 desempenha um papel significativo no estabelecimento de resistência sistêmica adquirida, bem como resistência sistêmica induzida (PARKHI et al., 2010; WU, Y. et al., 2012). Várias cascatas de sinalização são ativadas por PAMPs como os hormônios vegetais etileno

(Et), ácido jasmônico (JA) e ácido salicílico (AS). Esses hormônios modulam a transcrição de genes durante a interação. Os AS e NPR1 são responsáveis por desencadear uma cascata sistêmica à resposta da interação planta-patógeno (KUMAR et al., [s.d.]; WU, Y. et al., 2012; PARKHI et al., 2010; WITHERS; DONG, 2016).

A xinalase é uma enzima indutora de imunidade vegetal que pertence a família 11 endo-1,4- β -xilanase presente em fungos de *Trichoderma* sp., também denominada xilanase indutora de etileno (EIX). As enzimas dessa família são produzidas principalmente por microrganismos e que participam da quebra das paredes celulares das plantas durante o processo de colonização da planta. A proteína EIX pode atuar como um MAMP e provocar respostas de defesa em plantas, como observado nos cultivos de *Botrytis cinerea* (GUPTA et al., 2020; DUTTA et al., 2023; TCHAMENI et al., 2020; DE ZOTTI et al., 2020)

A associação simbiótica entre planta-hospedeiro desempenha um papel importante na fixação de nitrogênio, promoção de crescimento, aumento da taxa fotossintética, proteção contra patógenos, mobilização de nutrientes e subsequente absorção de elementos minerais essenciais (HARMAN et al., 2004, 2021; SHORESH; HARMAN; MASTOURI, 2010).

Com o avanço das técnicas de análise de genomas, transcriptomas e proteomas se avançou muito na descrição geral de prováveis atores nos complexos mecanismos de interação entre *T. harzianum* e seus hospedeiros. Assim, existe uma série de genes e proteínas candidatos que precisam ser validados para o entendimento do seu papel nestes mecanismos de interação.

Outros dois aspectos já estudados nos modelos de interações microrganismo-microrganismo e microrganismos simbiontes-plantas hospedeiras, mais ainda não avaliados na interação entre *T. harzianum* e seus hospedeiros são: as moléculas envolvidas na interação através de vesículas extracelulares e o papel das vesículas nestes processos.

2.3 Vesículas extracelulares: transporte de moléculas envolvidas em interações

As células possuem diferentes mecanismos de comunicação, interação e

reconhecimento do ambiente extracelular. Um desses mecanismos é mediado por vesículas secretadas, as vesículas extracelulares (VE). Estas vesículas são estruturas de 20 nm a 1000 nm revestidas por uma dupla camada lipídica (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014). De acordo com o seu tamanho, formação e função são subdivididas em exossomos, microvesículas ou corpos apoptóticos (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014).

As vesículas possuem duas vias de liberação para o meio extracelular. A primeira via envolve a formação de corpos multivesiculares (CMV) a partir de endossomos, através da fusão de exossomos gerados no interior das células. Esse processo depende da maquinaria que utiliza o complexo de triagem endossomal necessário para o transporte (ESCRT) (GAO et al., 2017). A fusão dos CMVs com o a membrana plasmática resulta na liberação das vesículas contidas dentro dos CMV para o espaço extracelular, e quando as vesículas contidas dentro CMV são liberadas essas são classificadas como exossomos (HARDING; HEUSER; STAHL, 1983). A segunda via está relacionada com a liberação de microvesículas diretamente no ambiente extracelular. Ambas as vias são liberadas pelos mecanismos de exocitose celular (MCCOTTER; HORIANOPOULOS; KRONSTAD, 2016; VAN NIEL et al., 2022).

Os estudos de vesículas, no entanto, têm sido impulsionados pela demonstração de suas participações no carregamento de transporte de fatores de virulência e microRNAs de patógenos em interação com seus hospedeiros (ERNAULT, *et al.*, 2023; GONÇALVES et al., 2021). Além disso, também foram encontrados fatores de comunicação por transferência de sinalizadores, drogas, carregamento de lipídios estruturantes, RNAs de interferência, DNAs, peptídeos (AOR et al, 2024; BITENCOURT, et al., 2022; ULLAH et al., 2023).

As VEs foram descritas para bactérias, eucariontes e Archaea constituindo um processo universal para transporte de moléculas do meio intracelular para o meio extracelular (DE VALLÉE et al. 2023; HUANG et al., 2023; LIU et al. 2023). Além da interação com patógenos, estudos revelam a importância desse mecanismo na resposta e regulação em células cancerígenas humanas relacionadas ao processo imune e autoimune na comunicação entre diferentes tipos células. Através do transporte de moléculas sinalizadoras regulatórias desencadeados por VEs, mostram uma ferramenta chave para elucidação de fatores clínicos e diagnósticos de câncer

colateral (ULLAH et al., 2023; ROBBINS; MORELLI, 2014).

Em estudos com plantas, as VEs já foram descritas como responsáveis pelo transporte de enzimas, toxinas e proteínas efetoras de fungos fitopatogênicos, que atuam inibindo a resposta de defesa da planta hospedeira favorecendo o seu estabelecimento e progressão da doença (CAI et al., 2018). Além disso, as VEs foram relacionadas como transportadoras de microRNAs que atuam no silenciamento dos genes envolvidos na resistência da planta hospedeira à colonização e à infecção causada pelo patógeno, sugerindo que as VEs possuem funções chave na mediação na interação planta-microrganismo (CHALONER; VAN KAN; GRANT-DOWNTON, 2016). O mecanismo de silenciamento gênico como alvo dos genes envolvidos no processo de morte celular desencadeada na planta hospedeira quando infectada por um patógeno, o que neste caso contribui para a sua permanência do agente patogênico na planta sem desencadear a morte da hospedeira. Desta forma, o patógeno passa a interagir com a planta como um simbiote (CAI et al., 2018; CHALONER; VAN KAN; GRANT-DOWNTON, 2016).

Em fungos, os sistemas de secreções são essenciais para a síntese e remodelação das paredes celulares, aquisição de nutrientes e interações hospedeiro e ou simbiote (MCCOTTER; HORIANOPOULOS; KRONSTAD, 2016). Em estudos com VEs de *Penicillium digitatum*, notou-se que substâncias alcalinas são exportadas pelas EVs na infecção da planta *Citrus sinensis*. Além disso, outras moléculas exportadas carregadas por EVs foram responsáveis por danificar tecidos de sementes das plantas (COSTA et al., 2021).

As vesículas já foram relacionadas com o mecanismo de aquisição de nutrientes. Em estudos com vesículas purificadas de VEs do fungo *Trichoderma reesei*, observaram a presença de RNA e de conjuntos de proteínas e enzimas envolvidas no processo de degradação da celulose, mostrando esse mecanismo desencadeado por essas vesículas um papel chave na aquisição de nutrientes (DE PAULA et al., 2019).

As VEs foram identificadas, descritas e caracterizadas em estudos com patógenos humanos, como *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Sporothrix schenckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Malassezia sympodialis* e *Staphylococcus aureus* (GEHRMANN et al., 2011; LUZ et al., 2021; RODRIGUES et al., 2007;

VALLEJO et al., 2011). Nesses estudos, as vesículas estão relacionadas com a característica de patogenicidade dos organismos acima descritos e que demonstraram moléculas responsáveis por ativação das células dos organismos hospedeiros, desencadeando o favorecimento do patógeno no ambiente dos organismos hospedeiros.

O estudo reportado por Ikeda e colaboradores 2018, observaram em estudos *in vivo* das VEs purificadas da levedura causadora de micose *Sporothrix brasiliensis* aumentou a patogenicidade e o estímulo a produção de antígenos de reconhecimento em células dendríticas do sistema imunológico (IKEDA et al., 2018). As VEs de *C. albicans* foram capazes de estimular a produção de moléculas sinalizadoras IL-12, IL-10, TGF- β e TNF- α pelas células dendríticas, afetando o sistema de resposta contra candidíase (VARGAS et al., 2015). As vesículas de fungos podem representar uma estratégia de tratamento na área médica, uma vez que a rota de produção dessas vesículas no ambiente intracelular, assim como as moléculas secretadas precisam ser compreendidas e elucidadas (JOFFE et al., 2016).

Já em estudos com fungos fitopatogênicos, as VEs purificadas de *F. oxysporum* demonstraram que essas partículas são responsáveis por carrear pigmentos e proteínas fitotóxicas. Essas moléculas presentes nas VEs quando em contato com as folhas das plantas hospedeiras, foram responsáveis por promover descoloração após suas infiltrações, quando comparado com o controle. Este mecanismo é uma resposta ativa da planta às partículas secretadas pelo fungo, sendo este essencial para a interação e reconhecimento do agente fitopatogênico (BLEACKLEY et al., 2020; FERNANDES et al., 2023).

Outro estudo com fungos fitopatogênicos demonstram que o fungo filamentoso patogênico *Fusarium graminearum* produz vesículas extracelulares durante a infecção do milho e que secretam proteínas associadas à virulência bem como modulam a expressão de genes na planta quando estão associadas (GARCIA-CERON et al., 2021). Já em outro estudo do Garcia-Ceron e colaboradores mostraram que o antimicrobiano 2,4-di-hidroxibenzofenona (BP-1) esteve associado aos processos de interações hospedeiro-patógeno, sendo responsável pela diminuição da produção das EVs do fungo *F. graminearum*. O BP-1 reduziu o crescimento do fungo *F. graminearum* em um ensaio *in vitro*, sugerindo que *F. graminearum* pode usar EVs para limitar a autotoxicidade de produção de metabólitos do fungo durante

a interação com seus hospedeiros (GARCIA-CERON et al., 2023).

São poucos os estudos com VEs secretadas por agentes de controle biológico durante a interação com seus hospedeiros. Encontrar moléculas nas vesículas, como receptores de membrana ou até mesmo moléculas encontradas no secretoma de estudos posteriores, poderá elucidar o mecanismo de interação do *T. harzianum* com seus hospedeiros.

Em estudos com mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* relacionados com as vias de secreção das VEs, observaram que o papel da via do ESCRT é essencial para a morfologia, abundância e tamanho das vesículas. Além disso, a concentração das VEs foi aumentada após a ação de agentes antifúngicos, como a caspofungina, relacionando as VEs com a remodelação das paredes celulares das leveduras (ZHAO et al., 2019).

Este é o primeiro estudo de vesículas extracelulares secretadas durante o processo de interação entre o *T. harzianum* e *S. sclerotiorum* ou com a planta *Phaseolus vulgaris* em condições que mimetizam a sua interação. Os resultados desses estudos serão uma ferramenta para entender os processos de reconhecimento e comunicação de moléculas envolvidas no mecanismo de interação entre organismos diferentes. Compreender esses mecanismos básicos na interação entre *T. harzianum* e seus hospedeiros será de grande importância para o desenvolvimento de estratégias de biocontrole. Além de entender o mecanismo envolvendo vesículas extracelulares, este trabalho busca proporcionar subsídios para futuros trabalhos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho visou testar a hipótese que as vesículas extracelulares do fungo *T. harzianum* são influenciadas pelo ambiente e têm funções específicas associadas ao seu conteúdo molecular, como proteínas, que podem ser analisadas por espectrometria de massa.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a produção de vesículas extracelulares pelo fungo *T. harzianum* após crescimento em meio contendo glicose ou micélio autoclavado do fungo *S. sclerotiorum*;
- Verificar a produção de vesículas extracelulares pelo fungo *T. harzianum* após crescimento em meio contendo sacarose ou durante a interação com raízes da planta *P. vulgaris*.
- Quantificar e caracterizar as vesículas extracelulares secretadas pelo fungo;
- Identificar as proteínas carregadas nas vesículas extracelulares das diferentes condições de cultivo, utilizando espectrometria de massa.

4. METODOLOGIA

Para uma melhor compreensão do delineamento experimental e execução dos experimentos, a metodologia foi dividida em três partes principais: A primeira parte está relacionada a manutenção e produção das vesículas extracelulares secretadas pelo *T. harzianum* TR274 durante o crescimento com a parede celular autoclavada do fungo *S. sclerotiorum*. A segunda parte está relacionada a manutenção e produção das vesículas extracelulares secretadas pelo *T. harzianum* TR274 durante o crescimento com sacarose e com a planta *P. vulgaris*. A terceira parte está relacionada com a caracterização das vesículas purificadas com técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, rastreamento de nanopartículas e análise da proteômica com Orbi-Trap.

4.1.1 Cultivo e manutenção dos organismos modelos

Para estudar a interação fungo planta, os organismos utilizados para esta metodologia foram o fungo e *S. sclerotiorum*, *T. harzianum* TR274 e a planta *P. vulgaris* L. obtidos da coleção do Laboratório de Enzimologia, localizado na Universidade de Brasília, no Instituto de Biologia (UnB/IB). Os fungos foram mantidos em discos de cultura contendo conídios no meio MYG [0,5% (m/v) de extrato de malte, 0,25% (m/v) de extrato de levedura, 2% (m/v) de glicose e 2% (m/v) de ágar] estocados

a -20°C em solução com glicerol em frascos de 2 mL. As sementes do *P. vulgaris* L. tipo pérola obtidas pela EMBRAPA- Arroz-Feijão foram estocadas e armazenadas a 4°C.

4.1.2 Produção de micélio do *S. sclerotiorum*

Os discos de cultura (10–20 mm) de *S. sclerotiorum* cultivados em meio MYG sólido [0,5% (p/v) de extrato de malte, 0,25% (p/v) de extrato de levedura, 2% (p/v) de glicose, 2% (p/v) /v) ágar] foram colocados em frascos de 1 L contendo 500 mL de meio de cultura MYG líquido e incubados sob agitação a 180 rpm e 28 °C. Após 14 dias de crescimento, os micélios foram filtrados a vácuo e lavados três vezes com solução salina esterilizada (0,9% (p/v) NaCl). Os micélios lavados foram congelados rapidamente com nitrogênio líquido e depois macerados manualmente com pistilo e pilão até se obter um pó fino. O pó resultante foi transferido para um frasco plástico de 50 mL e armazenado a -20°C para posteriores experimentos.

4.1.3 Crescimento e manutenção de *T. harzianum* TR274.

Cinco discos das culturas contendo esporos do isolado *T. harzianum* TR274 crescidos em meio BDA foram removidos e cultivados em 50 g de arroz parboilizado umedecido com 25 mL de água destilada, anteriormente, autoclavado a 120 °C por 20 minutos, em Erlenmeyer de 250 mL. Os frascos foram mantidos em câmara de germinação com fotoperíodo de 12 horas durante cinco dias a 28°C para a obtenção de esporos. Após 14 dias, material dos frascos foi ressuscitado em 100 mL de água destilada autoclavada. A concentração da solução de esporos foi contada em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico.

Os conídios de *T. harzianum* TR274 obtidos em solução salina (0,9% (p/v) NaCl), 1×10^7 conídios/mL, foram inoculados em frascos cônicos contendo 50 mL de meio mineral mínimo esterilizado conforme descrito em Cove (1966) ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,5 m/L; KH_2PO_4 1.0 m/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 m/L; $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0.1 m/L; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 0.05 m/L), suplementado com 1% (m/v) de glicose. Os frascos inoculados foram incubados a 120 rpm e 28°C, após 24 horas, os micélios fúngicos foram filtrados e transferidos para frascos cônicos contendo meio mínimo suplementado com 2% de glicose ou 0,3% m/v) de micélio de *S. sclerotiorum*, obtido como acima descrito. Os frascos inoculados foram incubados a 120 rpm e 28°C, e a cada 24 horas até 72 horas

foram retiradas alíquotas da cultura e estas amostras foram denominadas G24, G48 e G72 e M24, M48 e M72 de acordo com o tempo de crescimento e fonte de carbono micélio (M) ou glicose (G). As amostras G24, G48 e G72, bem como as amostras M24, M48 e M72 foram centrifugadas a 10.000 x g durante 30 min a 4°C. Os sobrenadantes resultantes foram coletados e filtrados em membranas de 0,22 µm e armazenados em tubos de 50 mL e estocados a -20 °C para análises das vesículas extracelulares.

4.2.1 Assepsia e germinação das sementes

Par este sistema, a assepsia das sementes de feijoeiro do cultivar do tipo Pérola foram realizadas pela imersão delas em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 1 % m/v de cloro ativo por um período de 10 minutos. Em seguida de três lavagens, de um minuto, com água destilada autoclavada foram realizadas em fluxo laminar. Após a assepsia, as sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri de vidro contendo meio Ágar-água a 0,75% (m/v), ambos autoclavados anteriormente. As sementes foram mantidas em câmara de germinação a 28 °C com fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de escuro, durante 5 dias até as radículas estarem com aproximadamente 5 cm.

4.2.2 Co-cultivo do *T. harzianum* TR274 com *P. vulgaris*

Para analisar a resposta de interação do feijoeiro, quando crescido na presença e na ausência do fungo *T. harzianum* TR274, foram realizados os seguintes cultivos em hidroponia: conídios do isolado do *T. harzianum* cultivados na presença da planta hospedeira (Condição Fungo/Planta) e planta hospedeira cultivada na ausência dos isolados de *Trichoderma* (Condição Planta).

Para isso, as sementes germinadas foram transferidas para um sistema com frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio Murashige and Skoog (MS) (Concentração dos componentes: Glycine 2 mg/l; Thiamine HCl 0.1 mg/l; Pyridoxine HCl 0.5 mg/l; Nicotinic acid 0.5 mg/l; Myo-inositol 100 mg/l; CaCl₂.2H₂O 440 mg/l; CoCl₂.6H₂O 0.025 mg/l; CuSO₄.5H₂O 0.025 mg/l; FeSO₄.7H₂O 27.8 mg/l; H₃BO₃ 6.2 mg/l; KH₂PO₄ 170 mg/l; KI 0.83 mg/l; KNO₃ 1 900 mg/l; MnSO₄.4H₂O 22.3 mg/l; Na₂EDTA 37.3 mg/l; Na₂MoO₄.2H₂O 0.25 mg/l; NH₄NO₃ 1650 mg/l; MgSO₄.7H₂O 370 mg/l; ZnSO₄.7H₂O 8.6 mg/l) acrescidos de vitaminas de Gamborg, preparado de acordo com as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich), filtrado com membranas de

0,22 µm. As sementes germinadas foram adicionadas a 30 frascos com falcons de 50 mL adaptados e seladas com papel filme. As plântulas foram mantidas em câmara de germinação a 28 °C com fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de escuro por 7 dias. Após este período, foram preparados dois meios MS acrescidos de vitaminas filtrados, sendo em um deles preparado com a adição de sacarose 0,05% para o crescimento do fungo e ambos os meios foram preparados em fluxo laminar. Sendo assim, 15 frascos contendo apenas os meios MS com vitaminas foram adicionados as plantas, representando a condição de crescimento controle. Nos 15 frascos restantes, foram adicionados o meio MS com vitaminas, sacarose 0,05% e solução de conídios do *T. harzianum* na concentração de 10^7 conídios/mL, representando assim a condição de co-cultivo. Foram realizados cultivos independentes para cada condição.

Após 24, 48 e 72 horas, foram coletados meios e as plântas foram descartadas. As amostras foram nomeadas de P24, P48 e P72 para a condição de crescimento das plantas apenas em meio MS e vitaminas nos respectivos tempos de coletas, e T24, T48 e T72 para as plantas que cresceram com os conídios do fungo nos respectivos tempos de coletas. Este experimento foi realizado com réplicas biológicas e quintuplicatas para cada amostra. As amostras P24, P48 e P72, bem como as T24, T48 e T72 foram centrifugadas a 10.000 x g durante 30 min a 4°C. Os sobrenadantes resultantes foram coletados e filtrados em membranas de 0,22 µm e armazenados em tubos de 50 mL e estocados a -20°C para análises das vesículas extracelulares.

4.2.3 Crescimento de *T. harzianum* TR 274 na presença de sacarose

Os conídios de *T. harzianum* TR274 obtidos em solução salina (0,9% (p/v) NaCl), 1×10^7 conídios/mL foram adicionados a frascos de 125 mL com 75 mL de meio autoclavado (Na₂HPO₄ .2H₂O 3,5 m/L; KH₂PO₄ 1.0 m/L; (NH₄)₂SO₄ 0.5 m/L; MgCl₂ .6 H₂O 0.1 m/L; Ca(NO₃)₂.4 H₂O 0.05 m/L) (COVE, 1966) complementados com 1,5% de sacarose (m/v) (VITERBO et al., 2007), mimetizando a condição de crescimento do fungo com a planta *P. vulgaris*. Os frascos foram agitados a 120 rpm em temperatura de 28°C por períodos de 24, 48 e 72 h de crescimento, sendo coletados os sobrenadantes das amostras nomeadas como S24, S48 e S72, representando os respectivos tempos de coleta. As amostras S24, S48 e S72 foram centrifugadas a 10.000 x g durante 30 min a 4°C. Os sobrenadantes resultantes foram coletados e filtrados em

membranas de 0,22 μm e armazenados em tubos de 50 mL e estocados a -20°C para análises das vesículas extracelulares.

4.3.1 Purificação de vesículas extracelulares

A purificação de vesículas extracelulares foi realizada com base na metodologia descrita em Fang et al. 2021, com algumas modificações. Os sobrenadantes coletados e previamente centrifugados e filtrados das amostras G24, G48, G72, M24, M48, M72, S24, S48, S72, P24, P48, P72, T24, T48 e T72 foram ultracentrifugados a $100.000 \times g$ a 4°C . Após 1 h de centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados ressuspensos em 300 μL de tampão fosfato de sódio 1,8 mM pH 7.4 contendo NaCl 137 mM, e 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (p/v) do inibidor de protease fluoreto de fenilmetilsulfonil. As preparações desse experimento foram posteriormente analisadas para detecção e quantificação das vesículas extracelulares, bem como, como utilizados como fonte de proteínas para as análises do proteoma.

4.3.2 Detecção e quantificação das vesículas extracelulares por NTA

A detecção, quantificação e determinação do diâmetro de vesículas extracelulares purificadas das amostras G24, G48, G72, M24, M48, M72, S24, S48, S72, P24, P48, P72, T24, T48 e T72 foram realizadas utilizando o equipamento NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), utilizando a metodologia de De Paula e colaboradores 2019. Os parâmetros de qualidade foram determinados utilizando uma concentração mínima de 10^3 partículas/mL para cada amostra. As amostras foram analisadas cinco vezes. A concentração, o diâmetro e as imagens geradas pelo equipamento foram analisados no software NTA 2.3.3, versão 3.4.003 (De Paula et al. 2019).

4.3.3 Visualização de vesículas por microscopia eletrônica de transmissão

As vesículas purificadas também foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão. Para isso, 1 μL de cada amostra, 2 μL de água ultrapura e 1 μL de acetato de uranila contrastante 0,5% v/v foram adicionados às grades de cobre, e o excesso de líquido foi removido e moído por 24 h em temperatura ambiente no escuro. As grades de cobre contendo as amostras foram examinadas usando um microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM1011 operando a 80 kV (Serejo et al. 2019). Todas as imagens foram salvas em escala de 200 nm para padronização das comparações.

4.3.4 Análise de proteínas vesiculares por espectrometria de massas

Para obter vesículas para análise proteômica, os sobrenadantes de cada condição de crescimento e ponto de tempo foram coletados em triplicata e depois reunidas para formar conjunto único das amostras. Essas amostras foram usadas para a purificação de vesículas extracelulares, como descrito acima.

As amostras, G24, G48, G72, M24, M48, M72, contendo as EVs purificadas foram desidratadas usando vácuo e lisadas usando um sonificador (Sonics Vibra-Cell VCX 750) com dodecilsulfato de sódio a 4% (p/v). As amostras de proteínas foram então precipitadas usando metanol e clorofórmio. O teor de proteína foi determinado pelo método Qubit™ (Invitrogen) e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão. As proteínas foram detectadas com as amostras das EVs previamente rompidas por sonicação. A metodologia utilizada para identificar as proteínas foi baseada em uma abordagem proteômica bottom-up, na qual as proteínas são clivadas em peptídeos curtos pela tripsina para análise sequencial (Zhang et al. 2013).

Primeiro, um gel de SDS-PAGE 12% foi preparado para realizar o fracionamento das proteínas. As amostras (10 µg) G24, G48, G72, M24, M48 e M72 foram analisadas em cada poço. A constituição dos géis de poliacrilamida foram: para o gel de separação a 12% (H₂O 1,5 mL, acrilamida a 30% 6,0 mL, Tris-HCl a 10% (pH 8,8) 3,8 mL, dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS) 0,15 mL, 10% persulfato de amônio (APS) 0,15 mL, N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) (SIGMA) 0,004 mL), e gel concentrado a 4% (H₂O 4,1 mL, 30% acrilamida 1,0 mL, 10% Tris-HCl (pH 6,8) 0,75 mL, 10% SDS 0,06 mL, 10% APS 0,06 mL, TEMED 0,006 mL). As proteínas carregadas foram submetidas a eletroforese em voltagem constante (100 V), coradas com Coomassie Brilliant Blue R250 por 120 minutos após a eletroforese e depois lavado com solução descolorante até que as bandas proteicas separadas estivessem claramente visíveis. A análise eletroforética foi realizada conforme descrito por (LAEMMLI 1970).

Após o processamento do gel, as bandas foram transferidas para um tubo plástico para digestão do gel conforme descrito por Shevchenko et al. 2006. As amostras de gel foram lavadas com água sob fluxo laminar para evitar contaminação. As

amostras do gel foram transferidas para um novo tubo plástico e centrifugadas rapidamente ($10.000 \times g$ por 30 s), a água foi descartada, 100 μL de tampão bicarbonato de amônio (TEAB) 0,02 M/acetonitrila 100% acetonitrila (1:1 v/v) foram adicionados, e as amostras foram deixadas em solução por 10 minutos a 56 °C. Além disso, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente, depois disso, foram adicionados 500 μL de acetonitrila a 100% e a mistura foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Após isso as amostras foram rapidamente centrifugadas, o sobrenadante foi removido e o volume de solução de iodoacetoamina (IAA) (0,055 M em TEAB 0,02 M) foi adicionado para submergir as fatias de gel. As amostras foram então deixadas em repouso por 10 minutos no escuro. Foram adicionados 500 μL de acetrolitrila e a mistura foi deixada em repouso por 10 minutos. As amostras foram rapidamente centrifugadas, o sobrenadante removido e o gel desidratado usando SpeedVac por 5 minutos. Após esses processos, foi adicionado tampão TEAB (50 μL) contendo tripsina a 1:25 protease/proteína e as amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 30 minutos. As bandas dos géis foram maceradas e outros 20 μL de solução TEAB com tripsina foram adicionados até os géis macerados ficarem submersos. As amostras foram deixadas na solução por 18 horas a 37°C. As amostras foram centrifugadas a $16.000 \times g$ e as soluções foram transferidas para um tubo contendo 200 μL de tampão de extração (acetonitrila 50%). As amostras foram processadas no sonicador por 5 minutos e agitadas por 25 minutos. As amostras foram centrifugadas a $16.000 \times g$ e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Posteriormente, foi adicionado ácido trifluoroacético (TFA) a 20% na concentração final de 0,5%. As amostras foram desidratadas usando Speedvac para dessalinização.

Após a digestão, as amostras foram dessalinizadas usando o método ZipTips C18. Neste método, as amostras digeridas foram ressuspensas em 0,1% de TFA. Posteriormente, uma solução de acetonitrila a 50% foi utilizada para hidratar a coluna ZipTips com duas lavagens consecutivas. As colunas foram submetidas ao equilíbrio hidrelétrico utilizando 0,1% de TFA. As amostras foram passadas pela coluna Zip Tips de sete a dez vezes sem serem descartadas. A coluna foi lavada com 0,1% de TFA e a amostra foi eluída com 5 μL de uma solução contendo 50% de acetonitrila em 0,1% de TFA. Esta etapa foi realizada três vezes e a amostra foi transferida para outro tubo Eppendorf identificado para análise no sistema.

4.3.5 Análise dos dados

As identificações das proteínas a partir dos peptídeos trípticos e foram realizadas no software MaxQuant utilizando dados espectrais e o proteoma de referência de *T. harzianum* depositado no Uniprot. Os parâmetros utilizados foram: Digestão = Tripsina/P, Máximo de clivagens perdidas = 2, Tolerância de massa = 20 ppm, carga máxima = 7. Além disso, a carbamidometilação da cisteína foi definida como uma modificação fixa, e a oxidação da metionina, acetilação do N- terminal, e a desaminação dos ácidos glutâmico e aspártico foram definidas como modificações variáveis. Para identificação de proteínas, foram considerados pelo menos dois peptídeos únicos; a taxa de falsa descoberta (FDR) foi definida em 1% para peptídeos e proteínas e probabilidade de erro posterior (PEP) $\leq 1\%$. Uma proteína foi considerada exclusiva (única) se detectada em uma condição de crescimento e não detectada em nenhuma outra condição. As 10 principais proteínas abundantes foram pontuadas usando a contagem de peptídeos detectados para cada proteína identificada.

5. Resultados e Discussão

O fungo *T. harzianum* TR274, durante o crescimento em meio líquido contendo glicose (G) ou com micélio autoclavado de *S. sclerotiorum* (M), secretou partículas. Os tamanhos médios de partículas foram $153,5 \pm 4,3$ nm, $181,6 \pm 3,4$ nm e $168,9 \pm 4,4$, para partículas das amostras G24, G48 e G72, respectivamente (Figura 4). Nas amostras M24, M48 e M72, as partículas apresentaram tamanho médio de $216,3 \pm 2,1$ nm, $188,2 \pm 5,1$ nm e $138,3 \pm 3,9$ nm, respectivamente (Figura 5). As partículas também foram detectadas em amostras provenientes do crescimento *T. harizaum* TR274 (T) em meio contendo ou não sacarose (S) como fonte de carbono e em co-cultivo *P. vulgaris* (P). Nas amostras S24, S48 e S72, as partículas apresentaram tamanho médio de $250,5 \pm 9,2$ nm, $194,3 \pm 13,7$ nm e $238,6 \pm 2,9$ nm, respectivamente (Figura 6). Já nas amostras P24, P48 e P72, as partículas apresentaram tamanho médio de $429,6 \pm 8,5$ nm, $445,0 \pm 3,5$ nm e $256,0 \pm 7,4$ nm, respectivamente (Figura 5). Nas amostras T24, T48 e T72, as partículas apresentaram tamanho médio de $193,9 \pm 6,6$ nm, $313,3 \pm 6,7$ nm e $172,2 \pm 6,7$ nm, respectivamente (Figura 5). Todos esses dados podem ser visualizados na tabela 1.

Tabela 1. Tamanho médio das nanopartículas obtidas através do *Nano Traffic Analysis* (NTA) com o software Nanosight.

Amostra	média +/- erro padrão (nm)
G24	$153,5 \pm 4,3$
G48	$181,6 \pm 3,4$
G72	$168,9 \pm 4,4$
M24	$216,3 \pm 2,1$
M48	$188,2 \pm 5,1$
M72	$138,3 \pm 3,9$
S24	$250,5 \pm 9,2$
S48	$194,3 \pm 13,7$
S72	$238,6 \pm 2,9$
P24	$429,6 \pm 8,5$
P48	$445,0 \pm 3,5$
P72	$256,0 \pm 7,4$
T24	$193,9 \pm 6,6$
T48	$313,3 \pm 6,7$
T72	$172,2 \pm 6,7$

Essas partículas apresentam tamanhos médios semelhantes aos encontrados para outros fungos como *T. reesei*, *Aspergillus flavus*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* e *Fusarium graminearum* (BLEACKLEY et al. 2020; De PAULA et al. 2019; GARCIA-CERON et al., 2023; KARKOWSKA-KULETA et al., 2020; RODRIGUES et al. 2016). Com relação a estudos com plantas, as VEs secretadas pela planta *Arabidopsis thaliana*, quando infectada por *Botrytis cinerea*, produziu VEs de tamanho médio semelhante ao encontrado para *T. harzianum* TR274 em todas as condições de cultivo, bem como as culturas de células vegetais de plantas do gênero *A. thaliana* (WANG et al., 2024; YUGAY et al., 2023).

A concentração das partículas e sua distribuição variam ao longo do tempo (Figura 4 e 6). A concentração máxima das EVs foi atingida às 48 h na presença de glicose e 72 h na presença de micélio de *S. sclerotiorum*, (Figuras 4 e 5). Estes resultados estão de acordo com De Paula et al. 2019, que mostrou mudanças na concentração das partículas ao longo do tempo de crescimento para o fungo *T. reesei*. De Paula et al. 2019 levantou a hipótese de que essas mudanças poderiam estar relacionadas com a dinâmica do crescimento das células fúngicas e da disponibilidade de carbono no meio de cultura. Observa-se que, além do estudo sobre a disponibilidade de carbono, é necessário considerar a presença do micélio de *S. sclerotiorum*, que simula a interação micoparasita (MEDINA-CASTELLANOS et al., 2023).

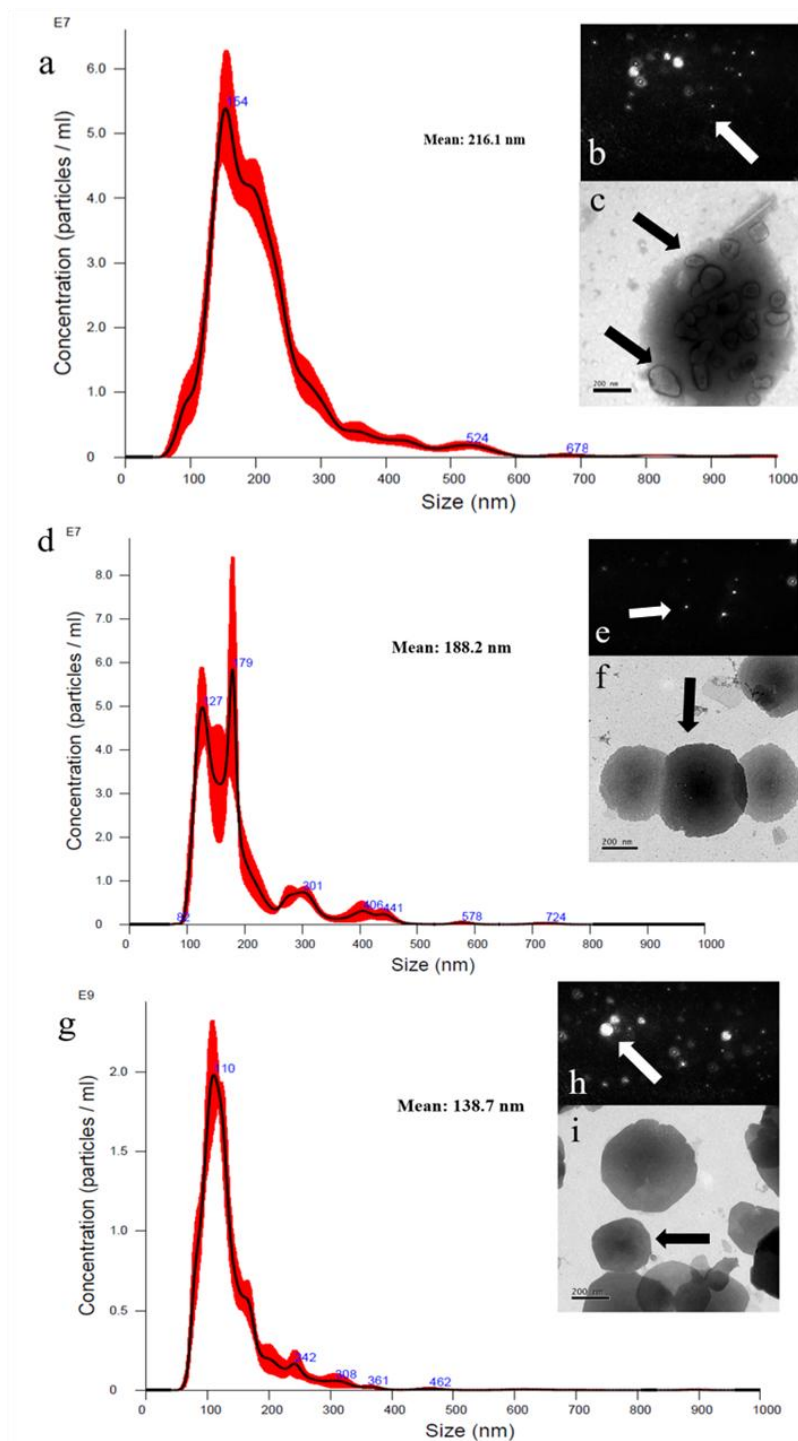


Figura 4. Análise das vesículas purificadas por NTA e microscopia eletrônica de transmissão. As vesículas foram purificadas do sobrenadante da cultura do *T. harzianum* cultivado na presença de glicose como fonte de carbono por 24 h (a, b, c), 48 h (d, e, f) e 72 h (g, h, eu). (a, d, g). Os resultados gráficos do Nanosight e imagens obtidas com o software (b, e, h). Imagens das microscopias eletrônicas de transmissão (c, f, i) das vesículas purificadas.

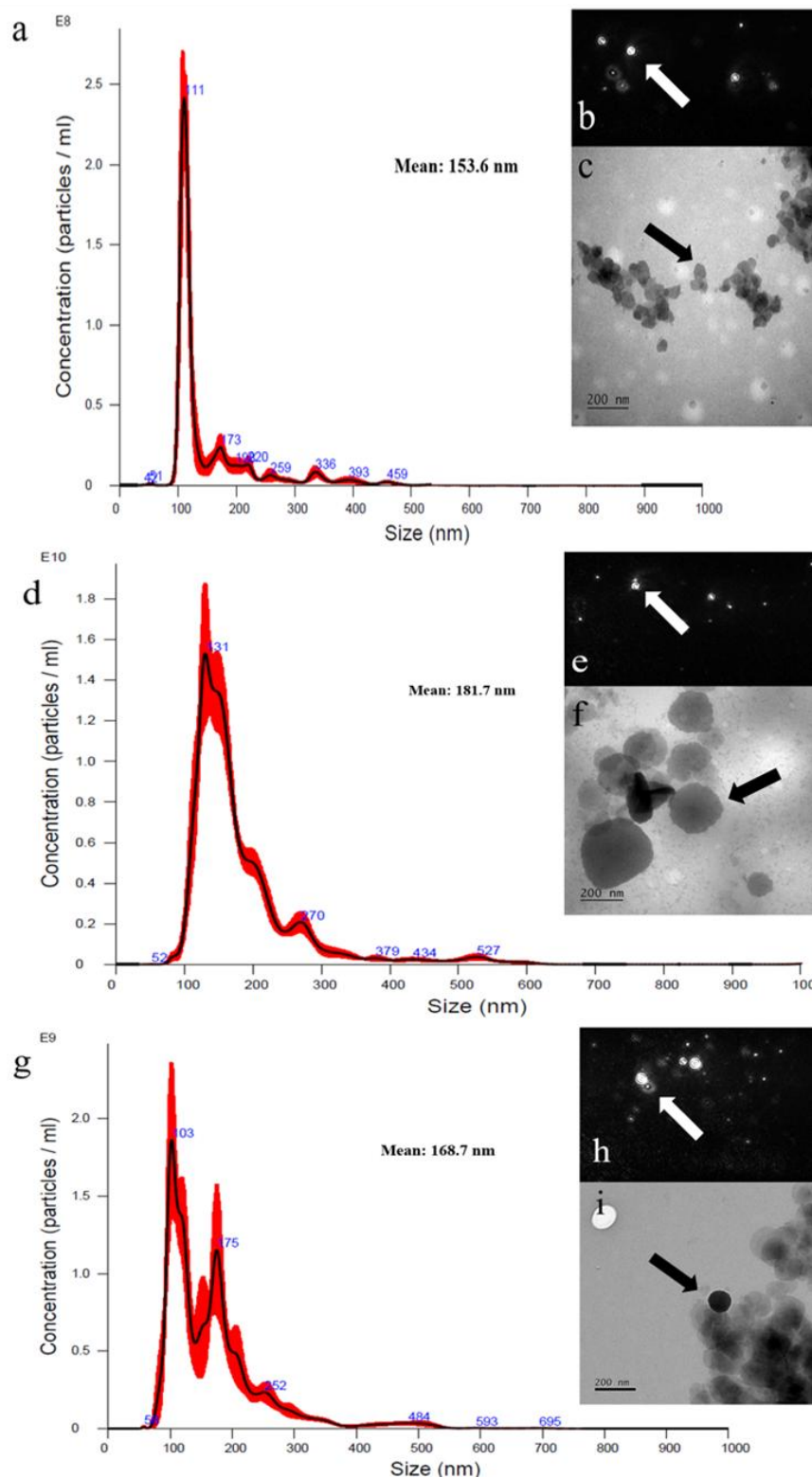


Figura 5. Análise das vesículas purificadas do *T. harzianum* TR274 secretadas durante o crescimento em micélio autoclavado do *S. sclerotiorum* por 24 h (a, b, c), 48 h (d, e, f) e 72 h (g, h, i). (a, d, g). Os resultados dos gráficos do Nanosight e imagens obtidas pelo software (b, e, h). Imagens das microscopias eletrônicas de transmissão (c, f, i) das vesículas purificadas.

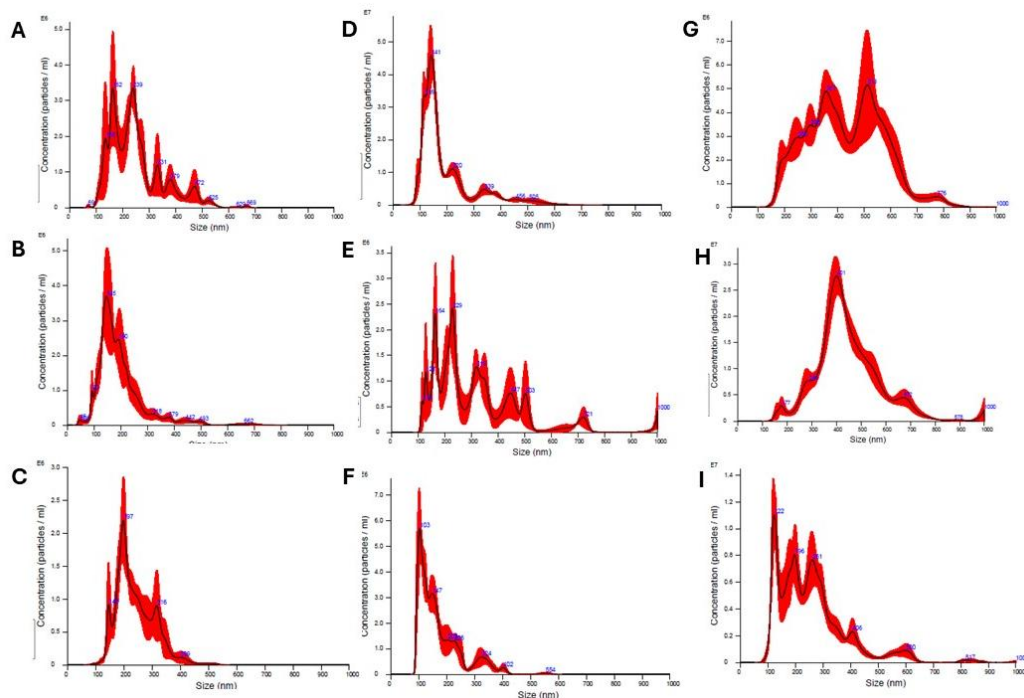


Figura 6. Análise das vesículas secretadas purificadas pelo *T. harzianum* TR274 durante o crescimento com sacarose nos tempos de 24 hrs (A), 48 hrs (B) e 72 hrs (C); Análise das vesículas secretadas purificadas pelo *P. vulgaris* durante o crescimento em meio MS nos tempos de 24 hrs (D), 48 hrs (E) e 72 hrs (F) ; Análise das vesículas secretadas pelas raízes purificadas pelo *P. vulgaris* durante o crescimento na presença de *T. harzianum* TR 274 nos tempos de 24 hrs (G), 48 hrs (H) e 72 hrs (I) no NTA.

As características morfológicas das partículas de *T. harzianum*, como observado na Figura 7A, também foram semelhantes às das EVs de *Synechococcus elongatus* PCC7942, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *A. fumigatus* (BLEACKLEY et al. 2020; LIMA et al. 2020; FREITAS et al., 2023). Além disso, foi observada a delimitação das partículas pela membrana plasmática nas vesículas da amostra M48, conforme apresentado na Figura 7b. Os corpúsculos multi vesiculares (MVC), que desempenham um papel crucial nos mecanismos de defesa das plantas e dos fungos, estão envolvidos no tráfego e secreção de vesículas que contribuem para a fortificação da parede celular da planta e a secreção de compostos essenciais para manutenção e sobrevivência das células. Os MVC já foram observados em plantas como a *Drosera capensis* e com mutantes da *Arabidopsis*, observado na figura 7c e seta 7d, sendo a produção desses MVC esteve associada a liberação de proteínas relacionada a remodelação e a manutenção das células (DE BELLIS, et al., 2022; LICHTSCHEIDL et al., 2021), contudo, os MVC, até o presente momento, não há estudos sobre essas partículas secretadas pelo fungo *T. harzianum* TR274. Todos estes resultados apontam para a

conclusão de que as partículas de *T. harzianum*, bem como as partículas secretadas pelo *P. vulgaris* podem ser classificadas como EVs.

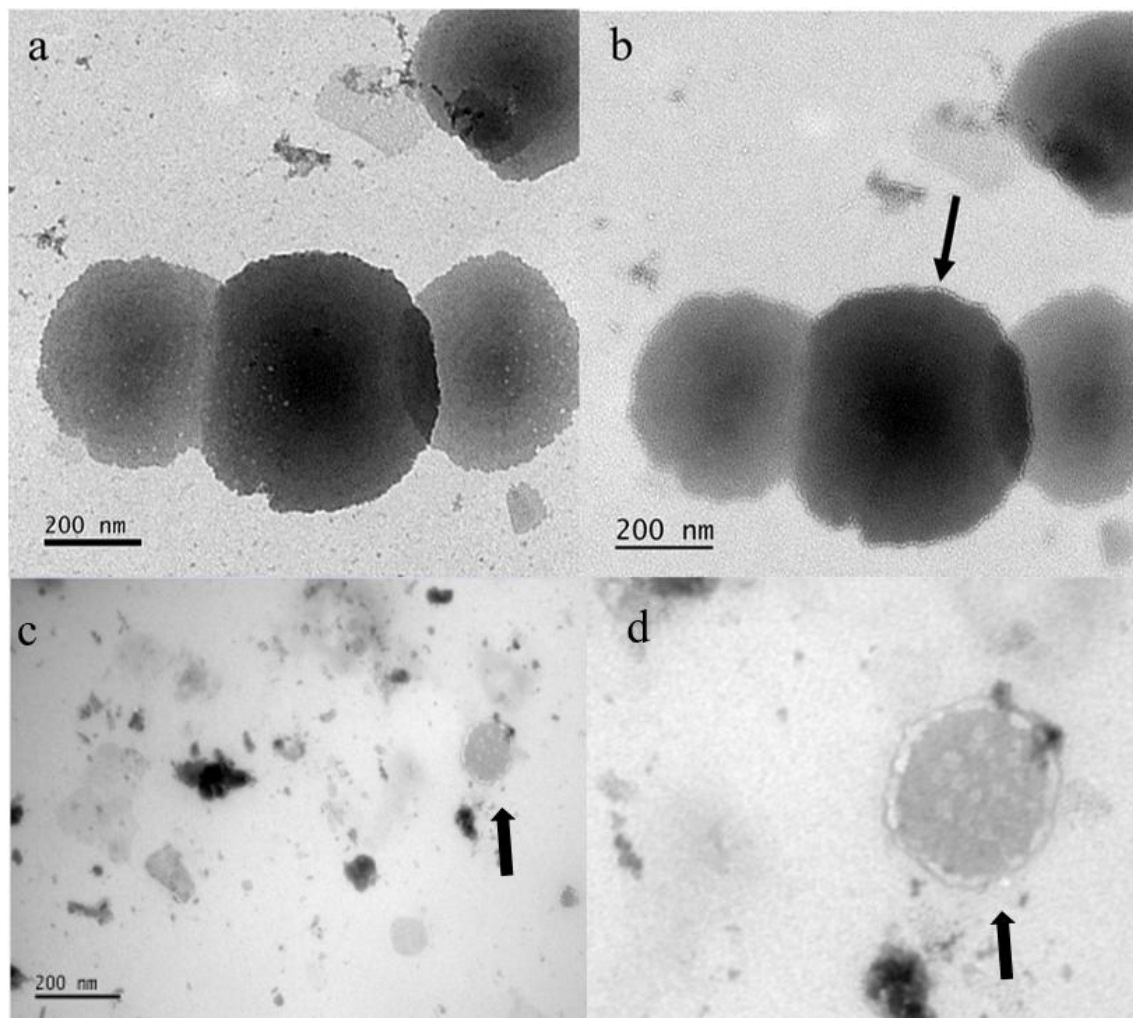


Figura 7. Imagens das microscopias eletrônicas de transmissão da membrana plasmática (seta na imagem b) das vesículas purificadas secretadas pelo *T. harzianum* TR274 após 48 hrs de crescimento com glicose do fungo *S. sclerotiorum* (a e b). Visualização de um corpúsculo multivesicular (seta nas imagens c e d) da amostra com S48 das vesículas extracelulares purificadas secretadas pelo *T. harzianum* TR274 após o crescimento em sacarose.

O conteúdo de proteínas das VEs purificadas foi analisado por SDS-PAGE. O perfil das proteínas das amostras dos sobrenadantes (Figura 8A) foi diferente do observado nas amostras após o processo de ultracentrifugação (Figura 8 B e C). A análise das proteínas purificadas pode ser observada na digua 8 D.

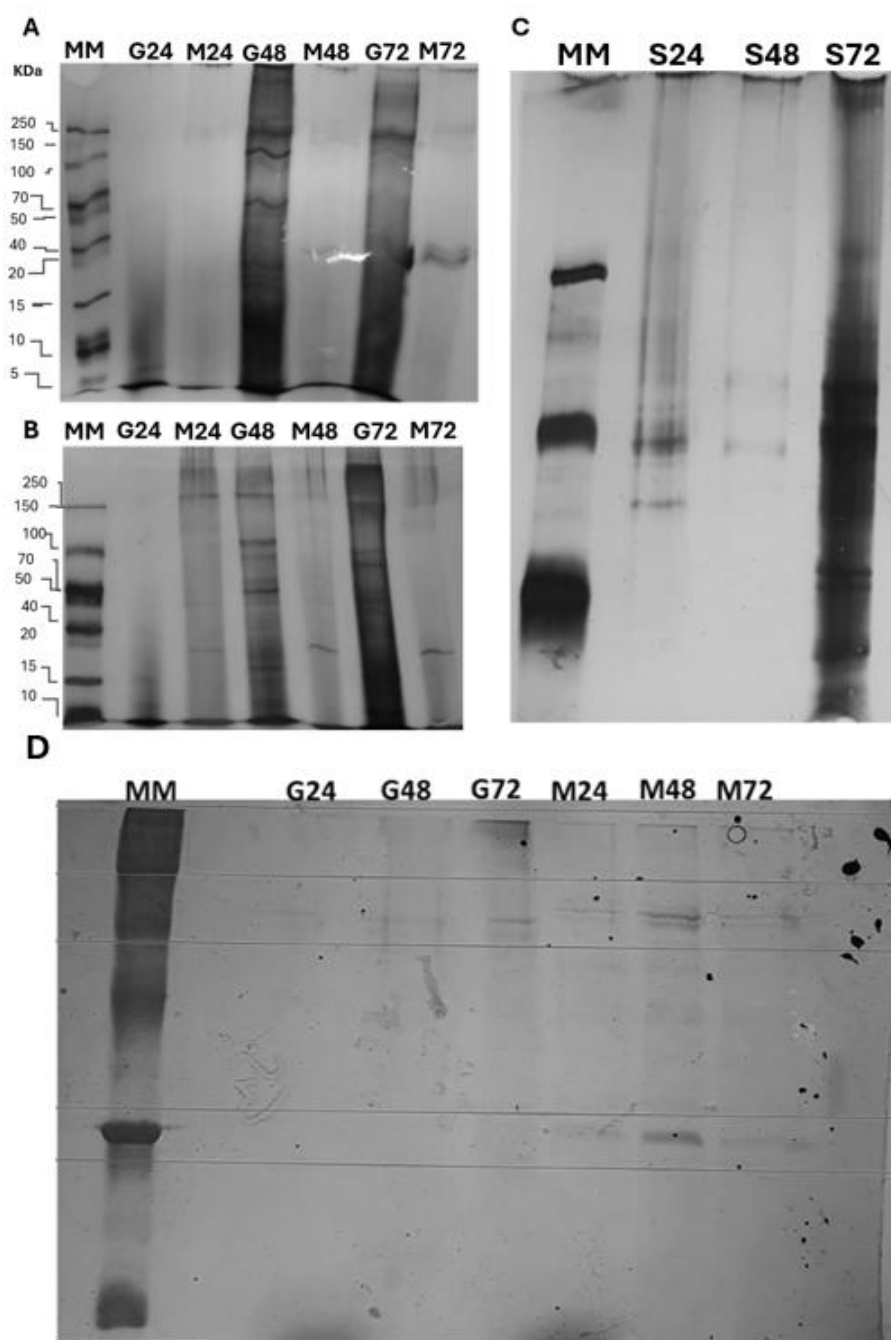


Figura 8. Análise de proteínas de VEs purificadas a partir do sobrenadante do cultivo de *T. harzianum* TR274 por SDS-PAGE 12%. *T. harzianum* TR274 do sobrenadante antes do processo de ultraacentrifugação com micélio do fungo *S. sclerotiorum* ou com glicose (A); *T. harzianum* TR274 com o crescimento em micélio do fungo *S. sclerotiorum* ou com glicose das amostras após o processo de ultraacentrifugação (B); e com as vesículas extracelulares purificadas do *T. harzianum* TR274 com o crescimento em sacarose (C). Análise das proteínas com 10 ug de proteínas das amostras com as vesículas extracelulares purificadas do *T. harzianum* TR274 com o crescimento em micélio do fungo *S. sclerotiorum* ou com glicose (D).

A partir dos dados de espectrometria de massa, foram identificadas no total, 42 proteínas diferentes de EVs de *T. harzianum* TR274 cultivado com glicose ou com micélio de *S. sclerotiorum*. O número de proteínas identificadas pode estar relacionado à otimização das metodologias específicas para as amostras de vesículas extracelulares secretadas pelo *T. harzianum* TR 274, considerando que este é o primeiro estudo realizado com esse modelo. Das 42 proteínas identificadas, 9 foram obtidas encontradas exclusivamente para vesículas produzidas na presença do micélio de *S. sclerotiorum*, 15 para vesículas produzidas na presença de glicose e 18 para vesículas obtidas em ambas as condições de crescimento (Figura 9).

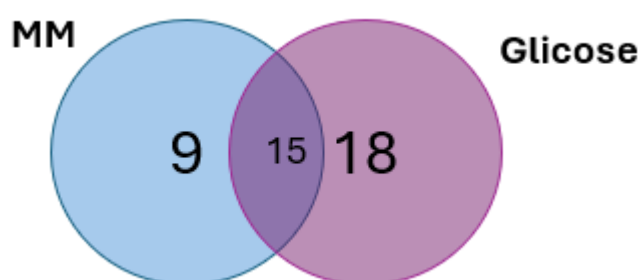


Figura 9. Diagrama de Venn das proteínas das vesículas purificadas com o crescimento com micélio (MM) e com glicose.

As proteínas identificadas foram categorizadas utilizando o sistema GO, sendo que os principais termos foram: atividade de hidrolase (47%), seguida pela atividade de transferase (14%) (Figura 10). Hidrolases, glicosídeo hidrolases e peptidases (serina e alcalina), foram descritas anteriormente como categorias identificadas principalmente em secretomas preditos e transcritomas de espécies micoparasitas de *Trichoderma* (DRUZHININA et al. 2011; DA SILVA et al. 2022; MENDOZA-MENDOZA et al. 2018; STEINDORFF et al. 2014). Corroborando com nossos resultados, De Paula et al. (2019) que também detectaram proteínas com atividades enzimáticas nas vesículas extracelulares no secretoma de *T. reesei*, como a celobiohidrolase Cel7a, sendo esta enzima presente no complexo celulolítico de *T. reesei*.

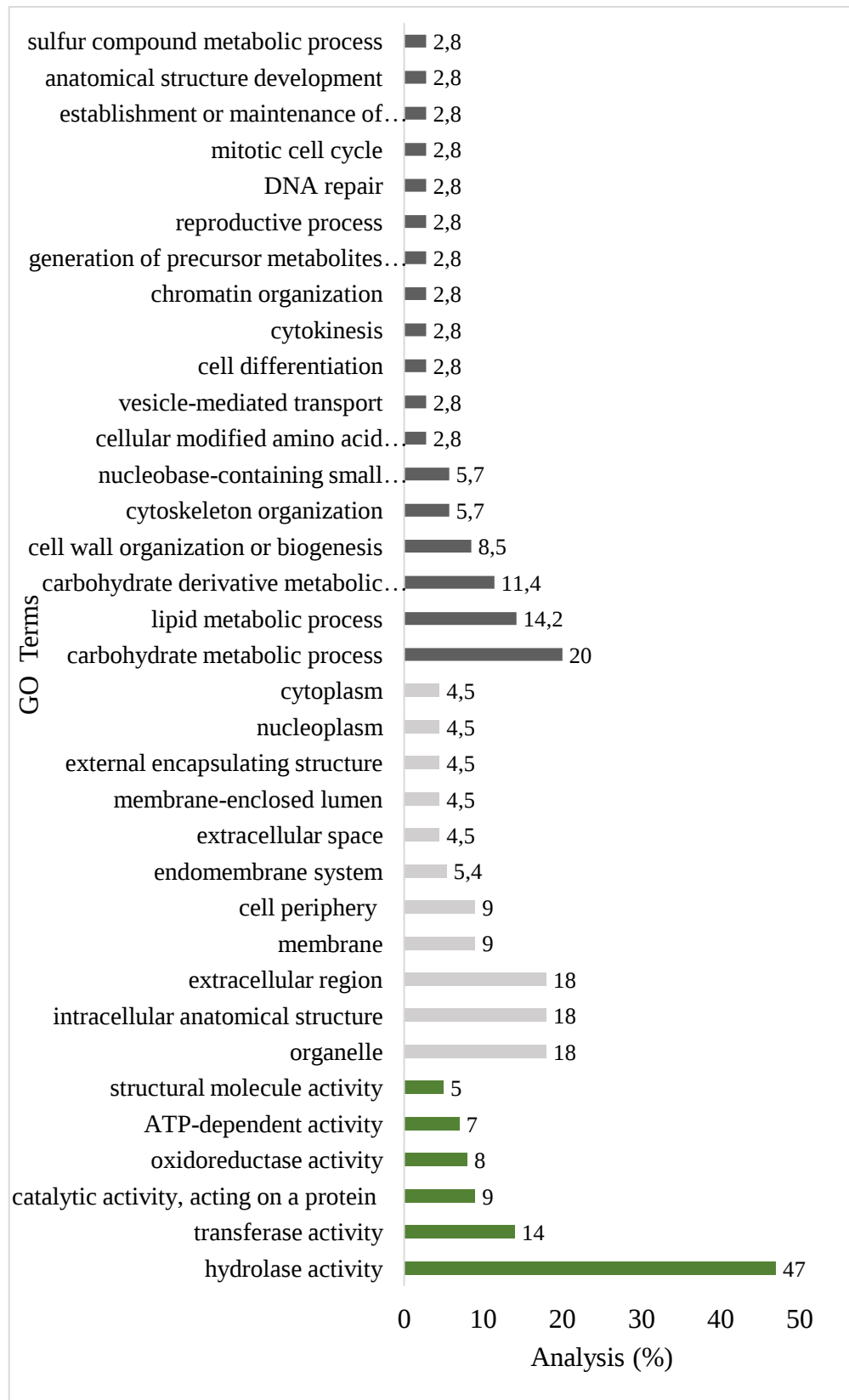


Figura 10. A categorização das proteínas utilizando o software Omicsbox, correspondendo as funções moleculares (verde), componentes celulares (cinza) e processos biológicos (preto).

Dados proteômicos das EVs da *Candida albicans* revelaram que as EVs incluíram principalmente: proteínas secretoras convencionais, proteínas secretoras não convencionais (classicamente citoplasmáticas) e proteínas transmembrana com ou sem peptídeo sinal. As mais abundantes são as proteínas secretoras clássicas (relacionadas à parede celular, incluindo enzimas secretadas hidrolíticas e ancoradas em GPI) também detectadas na amostra de sobrenadante livre das EVs (GIL-BONA et al. 2015). As proteínas contendo um peptídeo sinal foram previamente observadas em vesículas extracelulares de fungos. Porém, a porcentagem dessas proteínas varia de acordo com os fungos específicos estudados, variando de 10 a 60% (LIEBANA-JORDAN et al. 2021). No fungo *C. albicans*, os peptídeos de sinal previstos são detectados em 60% das proteínas EV (GIL-BONA et al. 2015).

Um conjunto de peptidases e hidrolases glicosídicas (hidrolases de parede celular de plantas ou fungos) foram descritas como apresentando papel na interação de espécies de *Trichoderma* com fungos fitopatogênicos e plantas, atuando na hidrólise da parede celular do hospedeiro permitindo a planta de raízes (SARROCCO et al. 2017; SUAREZ et al. 2004; SUÁREZ et al. 2007; VITERBO et al. 2004) a colonização, produção de DAMPs, colonização de hifas e uso como fonte de carbono (BARONCELLI et al. 2004; SUÁREZ et al. 2007; VITERBO et al. 2004). Além disso, Druzhinina et al. (2011) propuseram que as enzimas proteolíticas que são secretadas nos estágios iniciais da interação micoparasitária atuam degradando as proteínas do hospedeiro, liberando produtos nitrogenados derivados do hospedeiro, o que desencadeia a expressão de genes relevantes para o micoparasitismo.

No presente trabalho acrescentamos o provável papel das vesículas no tráfego destas proteínas levando a um processo mais específico e controlado de degradação das paredes celulares do hospedeiro. As vesículas também podem ser a resposta a uma questão notável de como *T. harzianum* TR274 secreta hidrolases de parede celular fúngica sem danificar a sua própria parede celular. A presença de proteínas semelhantes a efetoras contendo os domínios CFEM, WSC e SSCRIP reforçam as vesículas secretadas como transportadoras de proteínas relacionadas aos mecanismos de comunicação do *T. harzianum*.

Nos estudos do Steindorff e colaboradores, que analisaram a expressão dos genes relacionados ao micoparasitismo do fungo *T. harzianum* durante o crescimento com parede celular do fungo *Fusarium solani*, eles observaram o aumento da expressão dos genes das proteínas com domínio CFEM durante o crescimento com a parede (STEINDORFF et al., 2013). Já em estudos com análise de expressão de genes do fungo *T. virens* durante a interação com o fungo fitopatogênico *R. solani*, observaram a expressão de genes relacionados a família de proteínas CFEM e relacionaram este resultado como importante no processo de micoparasitismo GUZMÁN-GUZMÁN et al., 2017).

Em menor proporção foram identificadas proteínas vesiculares relacionadas à organização da parede celular fúngica, conidiação, fatores de alongamento e uma proteína semelhante à helicase (Tabela 2). Estas proteínas têm sido menos estudadas quanto ao seu papel em *T. harzianum* como resposta a fontes de carbono ou à presença de um hospedeiro, em comparação com glicosídeo hidrolases, proteases e SCRP. A sua presença nas VEs, portanto, aponta para um complexo processo de adaptação do *T. harzianum* às mudanças no ambiente externo às células.

Em estudos com as proteínas secretadas ricas em cisteína (SSCRPs) encontradas nas VEs do fungo *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, relacionaram essas proteínas a efetoras no processo de parasitismo do fungo (GARCIA-CERON et al., 2021), assim como também foi descrita em diferentes espécies do fungo *Trichoderma* como relevante no papel de parasita (XU et al., 2020). Encontrar essas proteínas efetoras nas amostras das EVs em crescimento com glicose e micélio demonstra uma resposta para mecanismos de infecção desconhecidos, onde os fungos secretam proteínas efetoras de maneira constitutiva, validando a potencialidade do fungo no mecanismo de parasitismo potencializado pelas VEs.

Nos estudos sobre comunicação intraespecífica mostrou que EVs dos fungos *P. brasiliensis* e *A. fumigatus* purificadas após passarem por testes de estresse oxidativo com luz Ultra-Violeta ou a exposição a temperaturas elevadas, quando inoculadas em células que não passaram por esses processos, ocasionou a formação de mudanças conformacionais na parede celular e na regulação de expressão de genes, sugerindo a possibilidade de que EVs funcionem no mecanismo de comunicação intraespecífica (BITENCOURT et al., 2022). Hipoteticamente as vesículas também podem mediar o

tráfego de proteínas para a comunicação intraespecífica do *T. harzianum*, controlando seu próprio crescimento e expressão gênica.

Tabela 2. Proteínas das vesículas extracelulares identificadas secretadas pelo *T. harzianum* TR274 em crescimento com micélio autoclavado do *S. sclerotiorum* (M) ou em glicose (G).

Hydrolase activity					
Protein ID	Description	Growth condition	GO Terms	Signal peptide presence (Predicted)	Proteins previously mapped into <i>T. harzianum</i> secretomes
A0A2N1KUT2	Carboxylic ester hydrolase	G	Hydrolase activity	+	+
A0A2N1LGF3	Chitinase	G	Extracellular region; polysaccharide catabolic process	+	+
A0A2N1KZY0	Peptidase A1 domain-containing protein	G	Aspartic-type endopeptidase activity; proteolysis	+	
A0A2N1LZN3	Peptidase S53 domain-containing protein	G	Extracellular space; metal ion binding; serine-type endopeptidase activity; transferase activity; proteolysis	+	
A0A2N1LWR2	Neutral ceramidase	M	Ceramidase activity; ceramide catabolic process	+	
A0A2N1M0E6	Sphingomyelin phosphodiesterase	M	Hydrolase activity, acting on glycosyl bonds; sphingomyelin catabolic process	+	
A0A2N1L0L3	Glycosidase	G/M	Membrane; cell wall organization	+	+
A0A2N1LRW5	Glucoamylase	G/M	Glucan 1,4-alpha-glucosidase activity; polysaccharide catabolic process	+	
A0A2N1L386	Glutaminase GtaA	G/M	Carbohydrate metabolic process	+	
A0A2N1L6X0	Mannan endo-1,6-alpha-mannosidase	G/M	Carbohydrate catabolic process	+	
A0A2N1L020	Peptidase S1 domain-containing protein	G/M	Serine-type endopeptidase activity; proteolysis	+	
A0A2N1KU56	Tubulin alpha chain	G/M	Microtubule; microtubule-based process		
A0A2N1L411	Alkaline proteinase	G/M	Cellular anatomical entity; serine-type endopeptidase activity; proteolysis	+	
A0A2N1M005	M6 family metalloprotease domain-containing protein	M	Peptidase activity; proteolysis	+	
A0A2N1LJK7	Secretory lipase	M	Triglyceride lipase activity; lipid catabolic process	+	
A0A2N1LBC2	RZ-type domain-containing protein	G	Cytoplasm; nucleus; helicase activity; zinc ion binding		
Others Enzymes and Proteins					
A0A2N1L4W2	1,3-beta-glucanosyltransferase	G	Plasma membrane; glucanosyltransferase activity; transferase	+	+
A0A2N1KYN8	AA1-like domain-containing protein	G	Extracellular region	+	
A0A2N1LVT3	Carrier domain-containing protein	G	Oxidoreductase activity; secondary metabolite biosynthetic process		

A0A2N1L1K8	Yeast cell wall synthesis Kre9/Knh1-like N-terminal domain-containing protein	G	N/d*	+	
A0A2N1LB19	Protein disulfide-isomerase	G	Endoplasmic reticulum lumen; isomerase	+	
A0A2N1LFM5	Elongation factor 1-alpha	G/M	GTP binding; translation elongation factor activity		
A0A2N1L9N2	FAD-binding PCMH-type domain-containing protein	G/M	Fad binding; metabolic process	+	
A0A2N1LNB4	Pectate lyase superfamily protein domain-containing protein	G/M	Polygalacturonase activity	+	
A0A2N1LWI1	Pectate lyase superfamily protein domain-containing protein	G/M	polygalacturonase activity	+	
A0A0F9XP97	Actin	G/M	Catalytic activity		
A0A2N1LFL3	WSC domain-containing protein	G/M	N*/D*	+	+
A0A2N1LUC4	Extracellular membrane protein CFEM domain-containing protein	M	Membrane	+	+
A0A2N1LP50	FYVE-type domain-containing protein	G/M	N*/D*		+
A0A2N1LV80	SSCRP protein	G/M	N*/D*	+	+
A0A2N1LTQ0	Cell wall protein	G	N*/D*	+	
A0A2N1LTU1	Uncharacterized protein	G	N*/D*	+	
A0A2N1KUU9	Uncharacterized protein	G	N*/D*	+	
A0A2N1KY04	DUF4419 domain-containing protein	G	N*/D*	+	
A0A2N1L241	Uncharacterized protein	G	N*/D*	+	
A0A0F9X5Q8	Hsp70-like protein	M	ATP binding; ATP-dependent protein folding chaperone		
A0A2N1LAN8	Conidiation-specific protein 13	M	N*/D*	+	
A0A2N1LSG7	Carrier domain-containing protein	G/M	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase activity; methylation		
A0A2N1KVL1	CHAT domain-containing protein	G/M	N*/D*		
A0A2N1KU23	DNA2/NAM7 helicase-like C-terminal domain-containing protein	G/M	N*/D*		
TOP 10 abundant proteins					
A0A2N1KUT2	Carboxylic ester hydrolase	G	Hydrolase activity	+	+
A0A2N1L386	Glutaminase GtaA	G/M	Carbohydrate metabolic process	+	
A0A2N1LNB4	Pectate lyase superfamily protein domain-containing protein	G/M	Polygalacturonase activity	+	+
A0A2N1L020	Peptidase S1 domain-containing protein	G/M	Serine-type endopeptidase activity; proteolysis	+	+

A0A2N1LFL3	WSC domain-containing protein	G/M	N*/D*	+	
A0A2N1LRW5	Glucoamylase	G/M	Glucan 1,4-alpha-glucosidase activity; polysaccharide catabolic process	+	
A0A2N1LTQ0	Cell wall protein	G	N*/D*	+	
A0A0F9XP97	Actin	G/M	Catalytic activity		
A0A2N1L411	Alkaline proteinase	G/M	Cellular anatomical entity; serine-type endopeptidase activity; proteolysis	+	+
A0A2N1L9N2	FAD-binding PCMH-type domain-containing protein	G/M	Fad binding; metabolic process	+	

6. Conclusões e Perspectivas

As vesículas extracelulares provenientes do fungo *T. harzianum* TR274 desempenham papel fundamental de carreamento de moléculas essenciais no mecanismo de biocontrole, potencializando a ação de micoparasita do fungo e o tráfico de informação durante a interação com seus hospedeiros. Embora os estudos sobre os progressos significativos na compreensão dos reguladores e a comunicação intercelular através das VEs em diversos organismos vivos, incluindo as propriedades moleculares das VEs, o ambiente celular e a célula receptora, ainda há muito a aprender sobre os regulamentos que controlam o direcionamento das VEs e a captação celular, especialmente nos fungos filamentosos. Os resultados encontrados no presente trabalho demonstram a relevância do uso das EVs para promover uma melhor compreensão do seu papel tanto na fisiologia como na interação entre o *Trichoderma harzianum* e seus hospedeiros.

Os nossos resultados sobre as VEs secretadas pelo fungo *Trichoderma harzianum* durante a interação dos seus hospedeiros, bem como as VEs secretadas pela planta *P. vulgaris*, partiu a hipótese de que as VEs são secretadas e que são importantes nos mecanismos de interação. Por isso, espera-se a partir dos nossos resultados, novos resultados sobre pesquisas em relação ao papel dessas VEs impulsione os outros estudos sobre os mecanismos de interação entre plantas e fungos.

Anexo 1. Artigo referente a tese.

Antonie van Leeuwenhoek (2024) 117:64
<https://doi.org/10.1007/s10482-024-01958-w>

ORIGINAL PAPER



Extracellular vesicles from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*

Gabriele Rosa Silva · Felipe de Pina Cavalcanti · Reynaldo Magalhães Melo · Emilio Cintra · Eliana Martins Lima · Pedro Ricardo Vieira Hamann · Luis H. F. do Vale · Cirano José Ulhoa · Fausto Almeida · Eliane Ferreira Noronha

Received: 30 December 2023 / Accepted: 6 March 2024
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2024

Abstract *Trichoderma harzianum* is a filamentous fungus that can act as a mycoparasite, saprophyte, or a plant symbiotic. It is widely used as a biological control agent against phytopathogenic fungi and can also be used for plant growth promotion and biofortification. Interaction between *T. harzianum* and phytopathogenic fungi involves mycoparasitism, competition, and antibiosis. Extracellular vesicles (EVs) have been described as presenting a central role in mechanisms of communication and interaction among fungus and their hosts. In this study, we characterized extracellular vesicles of *T. harzianum* produced during growth in the presence of glucose or *S. sclerotiorum* mycelia. A set of vesicular proteins was identified using proteomic approach, mainly presenting predicted signal peptides.

Keywords Extracellular vesicles · Interaction · *Trichoderma harzianum*

Introduction

Trichoderma harzianum is a filamentous fungus found in soil that acts as a saprophyte, mycoparasite, and/or plant symbiotic (Harman et al. 2004). Mycoparasitic and plant symbiotic lifestyles are characterized by the ability of *T. harzianum* to communicate and interact with its hosts. These processes involve throughout production and secretion of molecules with roles in host recognition, colonization, and in changing host metabolism, growth, and defense responses (Rahman et al. 2023). In contrast, fungi or host plants can produce molecules that favor them to escape to *T. harzianum* colonization. However, in the case of symbiotic interactions with host plants, *Trichoderma*

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10482-024-01958-w>.

G. R. Silva · F. de Pina Cavalcanti · R. M. Melo · L. H. F. do Vale · E. F. Noronha (✉)
Laboratory of Enzymology, Department of Cell Biology,
University of Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil
e-mail: enoronha@unb.br

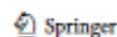
E. Cintra · E. M. Lima
Faculty of Pharmacy, Laboratory of Pharmaceutical
Technology, Lab. FarmaTec., Federal University of Goiás,
74690310 Goiânia, GO, Brazil

P. R. V. Hamann
São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo,
Avenida Trabalhador São-Carlense, 400, Parque Arnold
Schmidt, São Carlos, SP 13566-590, Brazil

C. J. Ulhoa
Biological Sciences Institute, University of Goiás,
Goiânia 74690-900, GO, Brazil

F. Almeida
Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão
Preto Medical School, University of São Paulo,
Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brazil

Published online: 02 April 2024



Content courtesy of Springer Nature, terms of use apply. Rights reserved.

7. Referências Bibliográficas

- AOR, Ana Carolina et al. Extracellular Vesicles from *Scedosporium apiospermum* Mycelial Cells: Implication for Fungal-Host Interplays. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 4, p. 277, 2024.
- ATANASOVA, L. et al. The Gpr1-regulated Sur7 family protein Sfp2 is required for hyphal growth and cell wall stability in the mycoparasite *Trichoderma atroviride*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 1 dez. 2018.
- ATANASOVA, L.; KRAJNC, A.; SCHABERGER, H.; XU, T.; GRUBE, M.; LUEBECK, M.; CERVENKA, C.; SELIGER, B.; GRONINGER, P.; ZEILINGER, S. Molecular basis of the biocontrol mechanisms of *Trichoderma* sp. **Biocontrol Science and Technology**, v. 28, p. 524-536, 2018.
- ATANASOVA, Lea et al. Mycoparasitism related targets of Tmk1 indicate stimulating regulatory functions of this MAP kinase in *Trichoderma atroviride*. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 19976, 2023.
- BARONCELLI, Riccardo et al. Two endopolygalacturonase genes in *Trichoderma virens*: In silico characterization and expression during interaction with plants. **Journal of Phytopathology**, v. 164, n. 1, p. 18-28, 2016.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, p. 249-260, 2004.
- BITENCOURT, Tamires A. et al. Fungal extracellular vesicles are involved in intraspecies intracellular communication. **MBio**, v. 13, n. 1, p. e03272-21, 2022.
- BITENCOURT, Tamires A. et al. Fungal extracellular vesicles are involved in intraspecies intracellular communication. **MBio**, v. 13, n. 1, p. e03272-21, 2022.
- BŁASZCZYK, L. et al. *Trichoderma* spp. - Application and prospects for use in organic farming and industry. **Journal of Plant Protection Research**, De Gruyter Open Ltd, 30 dez. 2014.
- BLAUTH DE LIMA, F. et al. *Trichoderma harzianum* T1A constitutively secretes proteins involved in the biological control of *Guignardia citricarpa*. **Biological Control**, v. 106, p. 99–109, 1 mar. 2017.
- BLEACKLEY, M. R. et al. Extracellular Vesicles From the Cotton Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* Induce a Phytotoxic Response in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1610, 10 jan. 2020.

- BURKETOVA, L. et al. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. **Biotechnology Advances**, Elsevier Inc., 2015.
- CAI, Q. et al. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. **Science**, v. 360, n. 6393, p. 1126–1129, 8 jun. 2018.
- CHACÓN, M. R. et al. Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. **International Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 19–27, 2007.
- CHALONER, T.; VAN KAN, J. A. L.; GRANT-DOWNTON, R. T. RNA ‘Information Warfare’ in Pathogenic and Mutualistic Interactions. **Trends in Plant Science**, Elsevier Ltd, 1 set. 2016.
- CHEN, S.-C. et al. *Trichoderma harzianum* Improves Defense Against *Fusarium oxysporum* by Regulating ROS and RNS Metabolism, Redox Balance, and Energy Flow in Cucumber Roots. **Phytopathology®**, v. 109, n. 6, p. 972–982, 6 jun. 2019.
- COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Annual Reviews, 6 out. 2014.
- CONTRERAS-CORNEJO, H. A. et al. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford Academic, 1 abr. 2016.
- CONTRERAS-CORNEJO, H. A. et al. Enhanced Plant Immunity Using *Trichoderma*. Em: *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. [s.l.] Elsevier B.V., 2014, p. 495–504.
- COSTA, J.H et al. Phytotoxic Tryptoquialanines Produced in vivo by *Penicillium digitatum* Are Exported in Extracellular Vesicles. **mBio** 2021, 12, e03393-20
- COVE, D. J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 113, p. 51-56, 1966.
- DE BELLIS, Damien et al. Extracellular vesiculo-tubular structures associated with suberin deposition in plant cell walls. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 1489, 2022.
- DE PAULA, R. G. et al. Extracellular vesicles carry cellulases in the industrial fungus *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 15 jun. 2019.
- DE VALLÉE, Amelie et al. Extracellular vesicles of the plant pathogen *Botrytis cinerea*. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 4, p. 495, 2023.
- DE ZOTTI, Marta et al. Targeted amino acid substitutions in a *Trichoderma*

- peptaibol confer activity against fungal plant pathogens and protect host tissues from Botrytis cinerea infection. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 20, p. 7521, 2020.
- DING, Jie et al. Gα3 subunit Thga3 positively regulates conidiation, mycoparasitism, chitinase activity, and hydrophobicity of Trichoderma harzianum. **AMB Express**, v. 10, p. 1-9, 2020.
- DJONOVIĆ, S. et al. Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 8, p. 838–853, 14 ago. 2006.
- DRUZHININA, I. S.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; ATANASOVA, L.; JACOBSEN, I. D.; GRONINGER, P.; ZEILINGER, S. The systematic study of the *Trichoderma* genus: biocontrol and applications. **Microbiology**, v. 157, p. 49-67, 2011.
- DUTTA, Pranab et al. Molecular interaction between plants and Trichoderma species against soil-borne plant pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1145715, 2023.
- EL-HASAN, Abbas et al. New approaches to manage Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) using Trichoderma spp. or their antifungal secondary metabolites. **Metabolites**, v. 12, n. 6, p. 507, 2022.
- ERNAULT, A. C. et al. MicroRNAs in extracellular vesicles released from epicardial adipose tissue promote arrhythmogenic conduction slowing. **Heart Rhythm O2**, v. 4, n. 12, p. 805-814, 2023.
- ESPARZA-REYNOSO, Saraí et al. Reactive oxygen species and NADPH oxidase-encoding genes underly the plant growth and developmental responses to Trichoderma. **Protoplasma**, v. 260, n. 5, p. 1257-1269, 2023.
- FERNANDES, Lizelle B. et al. Isolation and characterization of extracellular vesicles from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, a banana wilt pathogen. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1867, n. 7, p. 130382, 2023.
- FREITAS, Mateus Silveira et al. Aspergillus fumigatus extracellular vesicles display increased galleria mellonella survival but partial pro-inflammatory response by macrophages. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 5, p. 541, 2023.
- GAO, C. et al. Plant ESCRT Complexes: Moving Beyond Endosomal Sorting. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 11, p. 986–998, 1 nov. 2017.

GARCIA-CERON, Donovan et al. Extracellular vesicles from *Fusarium graminearum* contain protein effectors expressed during infection of corn. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, p. 977, 2021.

GARCIA-CERON, Donovan et al. Metabolomic analysis of extracellular vesicles from the cereal fungal pathogen *Fusarium graminearum*. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 5, p. 507, 2023.

GARCIA-CERON, Donovan et al. Size-exclusion chromatography allows the isolation of EVs from the filamentous fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov). **Proteomics**, v. 21, n. 13-14, p. 2000240, 2021.

GEHRMANN, U. et al. Nanovesicles from *Malassezia sympodialis* and Host Exosomes Induce Cytokine Responses – Novel Mechanisms for Host-Microbe Interactions in Atopic Eczema. **PLOS ONE**, v. 6, n. 7, p. e21480, 2011.

GIL-BONA, Ana et al. Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*. **Journal of proteome research**, v. 14, n. 1, p. 142-153, 2015.

GOMES, E. V. et al. The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self cell wall protection. **Scientific Reports**, v. 5, 9 dez. 2015.

GONÇALVES, Teresa; OLIVEIRA, Joana; FERNANDES, Chantal. Filamentous fungi extracellular vesicles. **Fungal Extracellular Vesicles: Biological Roles**, p. 45-55, 2021

GRUBER, S.; OMANN, M.; ZEILINGER, S. Comparative analysis of the repertoire of G protein-coupled receptors of three species of the fungal genus *Trichoderma*. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, 2013.

GUO, R. et al. *Trichoderma asperellum* xylanases promote growth and induce resistance in poplar. **Microbiological Research**, v. 248, p. 126767, 1 jul. 2021.

GUPTA, Rupali; BAR, Maya. Plant immunity, priming, and systemic resistance as mechanisms for *Trichoderma* spp. biocontrol. **Trichoderma: Host Pathogen Interactions and Applications**, p. 81-110, 2020.

GUPTA, V. K.; MISHRA, A.; GAUR, R. Enzymatic degradation of cell walls of pathogenic fungi by *Trichoderma* spp. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 9, p. 299-308, 2004.

GUZMÁN-GUZMÁN, Paulina et al. Identification of effector-like proteins in *Trichoderma* spp. and role of a hydrophobin in the plant-fungus interaction and mycoparasitism. **BMC Genetics**, v. 18, p. 1-20, 2017.

HARDING, C.; HEUSER, J.; STAHL, P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. **Journal of Cell Biology**, v. 97, n. 2, p. 329–339, 1 ago. 1983.

HARMAN, G. E. et al. Endophytic strains of *Trichoderma* increase plants' photosynthetic capability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 2, p. 529–546, 22 fev. 2021.

HARMAN, G. E. et al. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v. 94, n. 2, p. 147–153, 2004.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 43–56, 2004.

HERMOSA, R. et al. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology (Reading)**, jan. 2012.

HUANG, Jumin et al. Extracellular vesicles as a novel mediator of interkingdom communication. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 2023.

IKEDA, M. A. K. et al. Extracellular vesicles from *Sporothrix brasiliensis* are an important virulence factor that induce an increase in fungal burden in experimental sporotrichosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. OCT, p. 2286, 2 out. 2018.

JAKLITSCH, W. M. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. **Studies in Mycology**, v. 63, p. 1–91, 1 jan. 2009.

JAROSZUK-ŚCISEŁ, J. et al. Phytohormones (Auxin, Gibberellin) and ACC Deaminase In Vitro Synthesized by the Mycoparasitic *Trichoderma* DEMTkZ3A0 Strain and Changes in the Level of Auxin and Plant Resistance Markers in Wheat Seedlings Inoculated with this Strain Conidia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, p. 4923, 4 out. 2019.

JOFFE, L. S. et al. Potential Roles of Fungal Extracellular Vesicles during Infection. **mSphere**, v. 1, n. 4, 31 ago. 2016.

KARKOWSKA-KULETA, J. et al. Characteristics of Extracellular Vesicles Released by the Pathogenic Yeast-Like Fungi *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*. **Cells**, v. 9, n. 7, p. 1722, 2020.

KISHAN, G. et al. Article in **Indian Phytopathology**, 2017.

KUMAR, V. et al. Enhanced resistance against *Thielaviopsis basicola* in transgenic cotton plants expressing Arabidopsis NPR1 gene. [s.d.].

- LAEMMLI UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. Aug 15; **227**(5259):680-5.
- LI, N. et al. Volatile Compound-Mediated Recognition and Inhibition Between *Trichoderma* Biocontrol Agents and *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1–15, 31 out. 2018.
- LICHTSCHEIDL, Irene et al. Gland cell responses to feeding in *Drosera capensis*, a carnivorous plant. *Protoplasma*, v. 258, n. 6, p. 1291-1306, 2021.
- LIEBANA-JORDAN, Marc et al. Extracellular vesicles in the fungi kingdom. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 13, p. 7221, 2021.
- LIMA, Steeve et al. Extracellular vesicles: an overlooked secretion system in cyanobacteria. *Life*, v. 10, n. 8, p. 129, 2020.
- LIU, Q. et al. Proteomic Analysis Demonstrates a Molecular Dialog between *Trichoderma guizhouense* NJAU 4742 and *Cucumber* (*Cucumis sativus* L) Roots: Role in Promoting Plant Growth. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 34, n. 6, 1 jun. 2021.
- LIU, Ya-Juan; WANG, Cheng. A review of the regulatory mechanisms of extracellular vesicles-mediated intercellular communication. *Cell Communication and Signaling*, v. 21, n. 1, p. 77, 2023.
- LOPES, F. A. C. et al. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology*, v. 116, n. 7, p. 815–824, jul. 2012.
- LUZ, B. S. R. DA et al. Environmental Plasticity of the RNA Content of *Staphylococcus aureus* Extracellular Vesicles. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 634226, 11 mar. 2021.
- MCCOTTER, S. W.; HORIANOPOULOS, L. C.; KRONSTAD, J. W. Regulation of the fungal secretome. *Current Genetics*, v. 62, n. 3, p. 533–545, 15 fev. 2016.
- MEDINA-CASTELLANOS, Elizabeth et al. Nanosized extracellular vesicles released by *Neurospora crassa* hyphae. *Fungal Genetics and Biology*, v. 165, p. 103778, 2023.
- MORALES, D.; CAMARGO, J.; HENAO, M. Effects of *Trichoderma harzianum* on plant health in agricultural soils. *Frontiers in Microbiology*, 2021.
- MORÁN-DIEZ, M. E. et al. TvDim1 of *Trichoderma virens* is involved in redox-processes and confers resistance to oxidative stresses. *Current Genetics*, v. 56, n. 1, p. 63–73, fev. 2010.

- MORENO-RUIZ, D.; BARRERA, M. A.; CALO, S.; TEOH, L.; ARKWRIGHT, T. Role of the MAPK Pathway in Morphogenesis and Virulence in *Trichoderma harzianum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 92, p. 62-69, 2017.
- MUKHERJEE, M. et al. *Trichoderma*-Plant-Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control. **Indian Journal of Microbiology**, 2012.
- MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M. Secondary metabolism in *Trichoderma* - A genomic perspective. **Microbiology (Reading)**, jan. 2012.
- NAWROCKA, J.; GROMEK, A.; MAŁOLEPSZA, U. Nitric oxide as a beneficial signaling molecule in *Trichoderma atroviride* TRS25-induced systemic defense responses of cucumber plants against *Rhizoctonia solani*. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 421, 16 abr. 2019.
- NAWROCKA, J.; SZCZECHE, M.; MAŁOLEPSZA, U. *Trichoderma atroviride* enhances phenolic synthesis and cucumber protection against *Rhizoctonia solani*. **Plant Protection Science**, v. 54, n. 1, p. 17–23, 24 nov. 2018.
- NOGUEIRA-LOPEZ, G. et al. The apoplastic secretome of *Trichoderma virens* during interaction with maize roots shows an inhibition of plant defence and scavenging oxidative stress secreted proteins. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 409, 5 abr. 2018.
- OMANN, M. R. et al. The seven-transmembrane receptor Gpr1 governs processes relevant for the antagonistic interaction of *Trichoderma atroviride* with its host. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 107–118, jan. 2012.
- OMANN, M.; ATANASOVA, L.; NEUMAIER, J.; FRICKE, J.; ZEILINGER, S. Regulation of hydrophobin gene expression in the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 4, p. 388-396, 2012.
- PARKHI, V. et al. Resistance against various fungal pathogens and reniform nematode in transgenic cotton plants expressing Arabidopsis NPR1. **Transgenic Research**, v. 19, n. 6, p. 959–975, 12 dez. 2010.
- PIETERSE, C. M. J. et al. Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, p. 347–375, 4 ago. 2014.
- POVEDA, J. et al. The *Trichoderma harzianum* Kelch Protein ThKEL1 Plays a Key Role in Root Colonization and the Induction of Systemic Defense in Brassicaceae Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1478, 15 nov. 2019.

POVEDA, J.; ABRIL-URIAS, P.; ESCOBAR, C. Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes by Filamentous Fungi Inducers of Resistance: *Trichoderma*, Mycorrhizal and Endophytic Fungi. **Frontiers in Microbiology**, 25 maio 2020.

ROBBINS, P. D.; MORELLI, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 195–208, 25 fev. 2014.

RODRIGUES, M. L. et al. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 1, p. 48–59, jan. 2007.

RUBIO, M. B. et al. The Combination of *Trichoderma harzianum* and Chemical Fertilization Leads to the Deregulation of Phytohormone Networking, Preventing the Adaptive Responses of Tomato Plants to Salt Stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 294, 2 mar. 2017.

RUTTER, B. D.; INNES, R. W. Extracellular vesicles as key mediators of plant–microbe interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 44, p. 16–22, 1 ago. 2018.

RUTTER, B. D.; INNES, R. W. Extracellular Vesicles Isolated from the Leaf Apoplast Carry Stress-Response Proteins. **Plant Physiology**, v. 173, n. 1, p. 728–741, 3 jan. 2017.

SARROCCO, Sabrina et al. The constitutive endopolygalacturonase TvPG2 regulates the induction of plant systemic resistance by *Trichoderma virens*. **Phytopathology**, v. 107, n. 5, p. 537-544, 2017.

SCHIRMER, C. E.; NEUFELD, T. P.; NOVAK, K.; HARPER, J. W. The role of MAPK signaling in fungal biocontrol mechanisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 143-155, 2006.

SCHWEIGER, R. et al. Insights into Metabolic Changes Caused by the *Trichoderma virens* – Maize Root Interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, p. MPMI-04-20-0081, 15 fev. 2021.

SEIDL, V. et al. Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. **FEBS Journal**, v. 273, n. 18, p. 4346–4359, 1 set. 2006.

SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURI, F. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, n. 1, p. 21–43, jul. 2010.

SINGH, Garima et al. Deciphering the role of *Trichoderma* sp. bioactives in combating the wilt causing cell wall degrading enzyme polygalacturonase produced by *Fusarium oxysporum*: An in-silico approach. **Microbial Pathogenesis**, v. 168, p. 105610, 2022.

STEINDORFF, A. S. et al. Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 204, 18 mar. 2014.

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

SUAREZ, Belen et al. Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 46-55, 2004.

SUÁREZ, M. Belén et al. Characterization of genes encoding novel peptidases in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413 using the TrichoEST functional genomics approach. **Current Genetics**, v. 51, p. 331-342, 2007.

TCHAMENI, Severin Nguemezi et al. Involvement of lytic enzymes and secondary metabolites produced by *Trichoderma* spp. in the biological control of *Pythium myriotylum*. **International Microbiology**, v. 23, p. 179-188, 2020.

ULLAH, Amir et al. Characteristics and potential clinical applications of the extracellular vesicles of human pathogenic Fungi. **BMC microbiology**, v. 23, n. 1, p. 227, 2023.

VALLEJO, M. C. et al. The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly Immunogenic α -galactosyl epitopes. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 3, p. 343–351, mar. 2011.

VAN NIEL, G. et al. Challenges and directions in studying cell–cell communication by extracellular vesicles. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, p. 1–14, 8 mar. 2022.

VARGAS, G. et al. Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 389–407, 1 mar. 2015.

VITERBO, A. et al. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. **FEMS Microbiology Letters**, v. 305, n. 1, p. 42–48, 1 abr. 2010.

VITERBO, Ada; HAREL, Michal; CHET, Ilan. Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots. **FEMS Microbiology letters**, v. 238, n. 1, p. 151-158, 2004.

WANG, Shumei et al. Plant mRNAs move into a fungal pathogen via extracellular vesicles to reduce infection. **Cell Host & Microbe**, v. 32, n. 1, p. 93-105. e6, 2024.

WANG, Weizhen et al. Dual RNA sequencing during *Trichoderma harzianum*–*Phytophthora capsici* interaction reveals multiple biological processes involved in the inhibition and highlights the cell wall as a potential target. **Pest Management Science**, v. 80, n. 9, p. 4533-4542, 2024.

WITHERS, J.; DONG, X. Posttranslational Modifications of NPR1: A Single Protein Playing Multiple Roles in Plant Immunity and Physiology. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 8, p. e1005707, 11 ago. 2016.

WOO, S. L. et al. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. **Phytopathology**. Anais... The American Phytopathological Society, 16 fev. 2006.

WU, Xiaoqing et al. Degradation of oxalic acid by *Trichoderma afroharzianum* and its correlation with cell wall degrading enzymes in antagonizing *Botrytis cinerea*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 5, p. 2680-2693, 2022.

WU, Y. et al. The *Arabidopsis* NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. **Cell Reports**, v. 1, n. 6, p. 639–647, 28 jun. 2012.

XU, Yu et al. Extracellular proteins of *Trichoderma guizhouense* elicit an immune response in maize (*Zea mays*) plants. **Plant and Soil**, v. 449, p. 133-149, 2020.

YUGAY, Yulia et al. Isolation and Characterization of Extracellular Vesicles from *Arabidopsis thaliana* Cell Culture and Investigation of the Specificities of Their Biogenesis. **Plants**, v. 12, n. 20, p. 3604, 2023.

ZHAO, K. et al. Extracellular vesicles secreted by *Saccharomyces cerevisiae* are involved in cell wall remodelling. **Communications Biology**, v. 2, n. 1, p. 1–13, 9 ago. 2019.

ZHAO, Shuai et al. Every road leads to Rome: diverse biosynthetic regulation of plant cell wall-degrading enzymes in filamentous fungi *Penicillium oxalicum* and *Trichoderma reesei*. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 44, n. 7, p. 1241-1261, 2024.