



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR**

**TRANSFORMAÇÃO DE *Trichoderma harzianum* BRM27158 POR  
*Agrobacterium tumefaciens* E CARACTERIZAÇÃO DE UMA BIBLIOTECA  
DE TRANSFORMANTES**

**Mariana Santos Tamietti**

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Ferreira  
Noronha  
Coorientadora: Léia Cecília de Lima Fávaro

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Brasília  
2018

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Dissertação de mestrado

MARIANA SANTOS TAMIETTI

Título:

**TRANSFORMAÇÃO DE *Trichoderma harzianum* BRM27158 POR  
*Agrobacterium tumefaciens* E CARACTERIZAÇÃO DE UMA  
BIBLIOTECA DE TRANSFORMANTES**

Comissão Examinadora:

Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, CEL/UnB Prof.

Dr. Itamar Soares de Melo, Embrapa Meio Ambiente/SP

Dra. Eliane Ferreira Noronha, CEL/UnB Prof.

Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista, CFS/UnB (suplente)

Dedico esta dissertação de mestrado aos meus colegas de trabalho que, não importando o quanto estivessem ocupados, estavam sempre dispostos a prestar apoio, das mais variadas formas. Além de terem se tornados amigos valiosos. Espero um dia conseguir retribuir toda a paciência e gentileza que tive o prazer de usufruir.

## AGRADECIMENTOS

*“A felicidade só é real quando compartilhada”*  
- Christopher McCandless

Agradeço às minhas orientadoras, Eliane e Léia, por acreditarem que uma recém-formada pouco experiente e ainda muito imatura fosse capaz de conduzir este trabalho. A vocês que foram firmes, sem deixar de serem compreensivas, guardo um profundo sentimento de admiração, pela competência, pela coerência e, principalmente, pelo apoio irrestrito, mesmo e especialmente quando falhei.

À Dra. Paula Marcela Duque Jaramillo, que contribuiu com este trabalho bem nos primórdios e a quem tive o privilégio de testemunhar o comprometimento e o profissionalismo.

À Dra. Gláucia Emy Okida Midorikawa, por todo apoio técnico e teórico, sem o qual este trabalho não seria possível.

À Dra. Kelly Magalhães, por todo o seu auxílio e expertise com transformação genética de microrganismos.

Ao Dr. Andrei Stecca Steindorf, que, mesmo tendo encontrado poucas vezes, teve vital importância nas análises moleculares feitas em todo o estudo e se mostrou muito solícito sempre que procurado.

Aos doutores Edivaldo Ximenes, Itamar Soares e Pérola Magalhães, por aceitarem fazer parte desta banca examinadora com tamanha boa vontade.

Aos meus queridos colegas de laboratório, tanto na UnB quanto na Embrapa, que jamais me negaram uma mão ou um ombro amigo. Agradeço em especial a Artur F. B. Arantes, Elisa Z. Ramos Gisele S. Menino, Jéssica S. G. Peixoto, Jessyca S. Alencar, Jhéssica C. Araújo, Larissa C. R. Magalhães e Taís A. Ishizawa, por fazerem muito mais do que o bom coleguismo manda. Obrigada por cada caixa de ponteira emprestada (admito, às vezes roubada), meio de cultura feito a mais, dicas valiosas e por todo o carinho que sempre demonstraram. Independente de que caminhos sigamos, levarei vocês para sempre no coração. Ao Victor H. S. Bezerra, por todo o auxílio na reta final deste projeto. Débora Costa, Francilene Lopes, Gabrielle Rosa e Joana Rattes, apesar da convivência muito curta, vocês me ajudaram a dar forma a este trabalho. Além de terem se mostrado pessoas maravilhosas.

À minha família, que mesmo com todas as limitações, me deu força quando precisei. Agradeço em especial às minhas irmãs, que nunca me deixaram faltar amor e compreensão.

E finalmente, aos meus amigos que, mesmo pertencendo a outras áreas, fizeram o possível para contribuir, da correção ortográfica à formatação. Além de me lembrarem que a vida não tem graça sem um pouco de diversão.

## **APOIO FINANCEIRO**

A dissertação de mestrado intitulada “TRANSFORMAÇÃO DE *Trichoderma harzianum* BRM27158 POR *Agrobacterium tumefaciens* E CARACTERIZAÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE TRANSFORMANTES” desenvolvida por Mariana Santos Tamietti sob a orientação da Profa. Dra. Eliane Ferreira Noronha e coorientação da Dra. Léia Cecília de Lima Fávaro teve o apoio financeiro do CNPq (processo no. 130973/2016-5, modalidade Mestrado - GM; projeto no. 830473/1999-8).

*“A ciência nunca resolve um problema sem criar  
pelo menos outros dez”*

*George Bernard Shaw*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>12</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>13</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>14</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
3.1. Adaptação de transformação mediada por <i>A. tumefaciens</i> para o fungo <i>T. harzianum</i> BRM27158 e obtenção de uma biblioteca de transformantes.....	41
3.2. Caracterização da biblioteca de transformantes de <i>T. harzianum</i> BRM27158.....	44
3.3. Caracterização fisiológica e molecular de transformantes selecionados de <i>T. harzianum</i> BRM27158.....	46
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>60</b>
4.1. Transformação de <i>T. harzianum</i> BRM27158 por <i>A. tumefaciens</i> .....	60
4.2. Caracterização de uma biblioteca de transformantes de <i>T. harzianum</i> BRM27158 e seleção de linhagens com fenótipo alterado.....	62
4.3. Caracterização fisiológica e molecular de 10 transformantes selecionados de <i>T. harzianum</i> BRM27158.....	62
<b>5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>81</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>82</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

ABA – Ácido abscísico

AD – Arbitrário Degenerado

AIA – Ácido indolacético

ATMT – *Agrobacterium tumefaciens Mediated Transformation*

BDA – Batata Dextrose Ágar

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (Ferramenta básica de pesquisa por alinhamento local)

GFP – Green Fluorescent Protein (proteína verde fluorescente)

JA – Ácido Jasmônico

LB – *Left Border* (borda esquerda)

MEB – Malt Extract Broth (caldo extrato de malte )

NRPS – *Non ribosomal peptide synthase* (peptídeo sintase não-ribossômica)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PDB –Potato Dextrose Broth (caldo batata dextrose)

RB – *Right Border* (borda direita)

TAIL – PCR - *Thermal asymmetric interlaced PCR*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Conidióforos de *Trichoderma harzianum*. Microscópio óptico, aumento de 40x. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Systematic Botany and Mycology Laboratory. Domínio público.....19
- Figura 2.** Árvore filogenética do clado *Harzianum* evidenciando a posição do complexo de espécies *T. harzianum* (CHAVERRI et al., 2015).....26
- Figura 3.** *Heatmap* de enzimas degradadoras de parede celular de *Trichoderma* spp., cultivadas na presença de parede celular de *S. sclerotiorum*. Atividades específicas das enzimas: NAGase, fosfatase ácida,  $\beta$ -glicosidase e lipase (A),  $\beta$ -1,3-glicanase (B) e protease (C). Letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $\alpha = 0,05$ ). a = atividade mais alta; b = alta atividade. Adaptado de GERALDINE et al. (2013).....30
- Figura 4.** Genes diferencialmente expressos, num total de 3396, divididos em reprimidos (down-regulated) e induzidos (up-regulated) antes do contato (BC), durante o contato (C) e após o contato (AC) com o fitopatógeno *S. sclerotiorum* (STEINDORF, 2016).....32
- Figura 5.** Genes diferencialmente expressos classificados em proteases, CAZymes, transportadores, fatores de transcrição (TF), metabolismo secundário (SecMet) e pequenas proteínas secretadas e ricas em cisteína (SSCP). As barras positivas denotam genes induzidos e as barras negativas, reprimidos (STEINDORF, 2016).....32
- Figura 6.** Representação de um plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*.....34
- Figura 7.** Representação esquemática da TAIL-PCR. SP denota primer específico (segmentos pretos) e AD os inespecíficos (segmentos brancos). Adaptado de LIU & WHITTIER (1995).....37
- Figura 8.** Mapa do vetor pFAT-GFP (FITZGERALD et al., 2003).....42
- Figura 9.** Diversidade fenotípica da biblioteca de agrotransformantes de *T. harzianum* BRM27158. **A** - coleção completa, **B** - Diferenças quanto à pigmentação, **C** - diferenças quanto à esporulação.....61
- Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose 1% dos fragmentos resultantes da PCR do gene *hph* com os primers *hph1* e *hph2* dos 10 transformantes selecionados de *T. harzianum* BRM27158.....63
- Figura 11.** Eletroforese em gel de agarose 1% dos fragmentos resultantes da PCR do gene *gfp* com os primers *glGFP5* e *glGFP3* dos 10 transformantes selecionados de *T. harzianum* BRM27158.....64
- Figura 12.** Linhagens de mutantes selecionados e do *T. harzianum* BRM27158 selvagem cultivados em meio BDA com e sem higromicina (concentração de 200  $\mu$ g/mL) durante 15 dias a 25°C.....65
- Figura 13.** Índices enzimáticos de 10 transformantes e da linhagem selvagem *T. harzianum* BRM27158 em meio mínimo acrescido de leite como substrato. As

letras diferentes representam diferença estatística pelo teste Scott- Knott com nível de significância a 0,05.....67

**Figura 14.** Transformantes selecionados e linhagem parental *T. harzianum* BRM27158 cultivados em meio mínimo de sais com caseína, gelatina ou leite desnatado como substrato após 8 dias de crescimento a 25°C.....68

**Figura 15.** Leitura das absorvâncias de *S. aureus* e *P. aeruginosa* incubadas durante 0, 6 e 24 horas na presença de extrato bruto a 40% (v/v) do cultivo de fungos em meios TLE, MEB e PDB. As letras **A**, **C** e **E** correspondem à absorvância de *S. aureus* Rosenbach ATCC 25923 nos meios TLE, MEB e PDB, respectivamente. As letras **B**, **D** e **F** correspondem à absorvância de *P. aeruginosa* Migula ATCC 27853 nos meios TLE, MEB e PDB, respectivamente. Os testes com o meio TLE foram feitos com triplicata biológica e duplicata técnica enquanto que os demais meios (PDB e MEB) foram avaliados em duplicatas biológica e técnica (o erro padrão foi calculado, porém não é mostrado na figura).....72

**Figura 16.** Seleção de fragmentos resultantes da TAIL-PCR para posteriores sequenciamento e análise. As setas vermelhas indicam os fragmentos escolhidos. Os números de 1 a 10 denotam, respectivamente, T11, T25, T26, T40, T49, T50, T112, T113, T135 e T136. Os números ordinais 2ª e 3ª representam a segunda e a terceira etapas da TAIL-PCR. No gel **A** estão os produtos da PCR com os Primers degenerados AD2\_Ses e AD3\_Ses, no **B** estão AD5\_Par e AD11\_Par, no **C** estão AD11\_Par e AD6\_Ama, no **D** estão AD7\_Ama e AD1\_Liu, no **E** estão AD1\_Liu, AD2\_Liu e AD3\_Liu e no **F** o primer AD2\_Tsu. Os controles negativos, ou brancos, são os produtos da reação de PCR sem DNA (B1- primer AD2\_Ses, B2- AD3\_Ses, B3- AD5\_Par, B4- AD11\_Par, B5- AD6\_Ama e B6- AD7\_Ama).....75

**Figura 17.** Sequências adjacentes à borda esquerda (*left border*) do T-DNA dos transformantes T11, T40, T50, T112, T113 e T135 de *T. harzianum* BRM27158. Em azul: sequência genômica do fungo *T. harzianum* BRM27158. Em vermelho sublinhado: sequência da borda esquerda do T-DNA (podendo estar completa com 24 nucleotídeos como mostrado para o transformante T11, ou truncada no momento da inserção, como nos demais transformantes). Em verde itálico: sequência da borda esquerda do T-DNA do vetor binário pFAT-GFP que contém o sítio de anelamento do primer específico LB3 (sublinhado), utilizado nas reações de TAIL-PCR.....77

**Figura 18.** Representação de uma NRPS. M1, M2 e M3 representam os módulos da enzima. **A** denota o domínio de adenilação, **T** o domínio de tiolação ou peptil carreador, **C** o domínio de condensação e **TE** o domínio de tioesterase ou de terminação. Adaptado de WINN (2016).....79

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Metabólitos secundários produzidos por <i>Trichoderma</i> spp. Adaptado de CONTRERAS-CORNEJO et al. (2016).....	<b>22</b>
<b>Tabela 2.</b> Antagonismo e inibição de crescimento de <i>S. sclerotiorum</i> , <i>F. solani</i> e <i>R. solani</i> por espécies de <i>Trichoderma</i> . Adaptado de QUALHATO et al. (2013).....	<b>30</b>
<b>Tabela 3.</b> Fold Change (FC) em log <sub>2</sub> dos 10 genes com maior expressão diferencial após 12 h e suas expressões após 24 h e 36 h. Adaptado de STEINDORF et al. (2014).....	<b>31</b>
<b>Tabela 4.</b> Meio mínimo de sais conforme PONTECORVO et al. (1953), sem glicose.....	<b>47</b>
<b>Tabela 5.</b> Meio de cultura TLE, conforme Rodrigues et al. (2014) com caseína.....	<b>48</b>
<b>Tabela 6.</b> Primers utilizados nas reações de TAIL-PCR.....	<b>53</b>
<b>Tabela 7.</b> Reagentes utilizados na reação <b>primária</b> da TAIL-PCR.....	<b>54</b>
<b>Tabela 8.</b> Concentração dos primers degenerados utilizados na reação <b>primária</b> da TAIL-PCR.....	<b>54</b>
<b>Tabela 9.</b> Ciclagem da reação TAIL-PCR <b>primária</b> (MULLINS et al, 2001).....	<b>55</b>
<b>Tabela 10.</b> Reagentes utilizados na reação <b>secundária</b> da TAIL-PCR.....	<b>55</b>
<b>Tabela 11.</b> Concentração dos primers degenerados utilizados na reação <b>secundária</b> da TAIL-PCR.....	<b>56</b>
<b>Tabela 12.</b> Ciclagem da reação TAIL-PCR <b>secundária</b> (MULLINS et al, 2001).....	<b>56</b>
<b>Tabela 13.</b> Reagentes utilizados na reação <b>terciária</b> da TAIL-PCR.....	<b>57</b>
<b>Tabela 14.</b> Concentração dos primers degenerados utilizados na reação <b>terciária</b> da TAIL-PCR.....	<b>57</b>
<b>Tabela 15.</b> Ciclagem da reação TAIL-PCR <b>terciária</b> (MULLINS et al, 2001).....	<b>58</b>
<b>Tabela 16.</b> Crescimento em milímetros dos fungos mutantes e do parental em meios com diferentes substratos proteicos.....	<b>66</b>
<b>Tabela 17.</b> Atividade enzimática (U/g/mL) e atividade específica (U/mg) de proteases, bem como sua massa seca (g) após cinco dias de cultivo em meio TLE.....	<b>67</b>
<b>Tabela 18.</b> Atividade enzimática (U/g/mL) e atividade específica (U/mg) de proteases, bem como sua massa seca (g) após cinco dias de cultivo em meio TLE com glicose.....	<b>68</b>
<b>Tabela 19.</b> Relação de fragmentos amplificados por TAIL-PCR selecionados e seu tamanho estimado em pares de bases.....	<b>76</b>

## RESUMO

Fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidos agentes de controle biológico. Os mecanismos envolvidos em tal atividade abrangem as interações entre a tríade patógeno-antagonista-planta, num processo complexo e integrado que, além de proteger a planta, promove seu crescimento. Neste trabalho, buscou-se identificar possíveis genes alvo para melhoramento genético de *Trichoderma harzianum*. Para tanto, foi construída uma biblioteca de transformantes de *T. harzianum* BRM27158, por transformação mediada por *A. tumefaciens*, tendo o plasmídeo pFAT-gfp como vetor binário e gerando inserções aleatórias do T-DNA contendo os genes *hph* (marcador seletivo) e *gfp* (gene repórter). A biblioteca foi purificada por cultivo monospórico e submetida a uma triagem preliminar, da qual 10 linhagens foram selecionadas para este estudo. Todos os agrotransformantes selecionados exibiram estabilidade genética, mantendo o fenótipo de resistência à higromicina B após 6 gerações. A confirmação molecular da inserção do T-DNA se deu por amplificação dos genes *hph* e *gfp* com primers específicos. Os 10 fungos e o selvagem foram caracterizados quanto à produção de proteases em cultivo submerso e em meio sólido. Das dez linhagens, quatro (T25, T40, T113 e T136) apresentaram diminuição de crescimento em substratos proteicos. Além disso, os transformantes T40, T50 e T113 apresentaram acentuada redução da capacidade de inibir a bactéria *Staphylococcus aureus*, em comparação com o fungo selvagem. As regiões flangeadoras do T-DNA de cada transformante selecionado foram recuperadas por TAIL-PCR, clonadas, sequenciadas e comparadas aos bancos de dados NCBI e JGI e ao genoma anotado de BRM27158. Foi identificada uma inserção num gene que codifica uma provável NRPS (peptídeo sintase não ribossômica), envolvida na produção de compostos secundários. A caracterização fenotípica, em concordância com a molecular, indicou alterações na produção de metabólitos secundários, mas não na produção de proteases. A biblioteca de agrotransformantes mostrou-se uma rica fonte para estudos de e caracterização funcional de genes envolvidos na interação da linhagem estudada com o fitopatógeno.

*Trichoderma harzianum* BRM27158 *Agrobacterium tumefaciens* MEDIATED  
TRANSFORMATION AND CHARACTERIZATION OF A TRANSFORMANTS  
LIBRARY

**ABSTRACT**

*Trichoderma* fungi are well known as biological control agents. The mechanisms involved in this process cover the triad pathogen-antagonist-plant interactions, in a complex integrated process that protects the plant and promotes its growth. In this project, we tried to identify potential gene targets applicable in genetic improvement of *Trichoderma harzianum*. A library of transformants from *T. harzianum* BRM27158, was built via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation, with pFAT-gfp plasmid as binary vector, creating random T-DNA insertions containing *hph* (selective marker) and *gfp* (reporter) genes. The library was purified by monosporic cultivation and subjected to a preliminary screening, from which 10 strains were selected for further analysis. All selected agrotransformants exhibited genetic stability, keeping a hygromycin B resistance phenotype after 6 generations. Molecular verification of T-DNA insertions was performed by *hph* and *gfp* amplification using specific primers. The 10 selected fungi and wild type were characterized regarding their protease production in submerged cultivation and in solid medium. Four out of ten strains (T25, T40, T113 and T136) showed decreased growth in protein substrates. Moreover, the transformants, T40, T50 and T113 presented a reduced inhibition activity against the bacteria *Staphylococcus aureus*, compared to the wild type. The T-DNA flanking regions from each selected mutant were recovered via TAIL-PCR, cloned, sequenced and compared to NCBI and JGI databases and to BRM27158 annotated genome. An insertion in a gene coding a putative NRPS (non-ribosomal peptide synthase), involved in secondary metabolite production, was identified. Molecular and phenotypical characterization indicated alterations in secondary metabolite production, but not in protease production. The transformant library was established as a rich source for functional characterization of genes involved in interactions between phytopathogen and the studied strain.

## 1. INTRODUÇÃO

### **Fungos como agentes de controle biológico**

A agricultura no século 21 enfrenta múltiplos desafios, em especial produzir alimentos e fibras que sustentem o crescimento populacional, gerar mais matéria-prima destinada à bioenergia, adotar métodos de produção mais sustentáveis e adaptar-se às mudanças climáticas (COCHRANE *et al.*, 2009.). Nesse contexto, os principais fatores bióticos que limitam a produtividade agrícola são a perda de colheitas causadas por ervas daninhas, por predação e por doenças microbianas (TOZLU *et al.*, 2018). Estimativas apontam que as doenças de plantas contribuíram com cerca de 16% das perdas anuais globais observadas para as principais culturas agrícolas no início do século XXI, e que desse montante, as doenças causadas por fungos responderam por 70 a 80% destas perdas (MOORE *et al.*, 2011).

Como forma de controlar as doenças causadas por fungos, pesticidas sintéticos (controle químico) têm sido utilizados nas plantações desde os anos 1940, gerando problemas como fitotoxicidade, resistência fúngica, poluição do solo e da água e, inclusive, danos à saúde humana (TOZLU *et al.*, 2018).

Neste contexto o controle biológico, compreendido como a utilização de microrganismos para controlar o crescimento de patógenos e, por consequência, as doenças por eles causadas (MONTE, 2001), vem sendo empregado como alternativa no controle de pragas e doenças em diferentes culturas. Contudo, o controle biológico usado de forma isolada por vezes se mostra menos eficiente que o controle químico (MONTE, 2001). A combinação do controle biológico e químico, o chamado controle integrado, suprime as doenças de forma similar ao controle exclusivamente químico. O controle integrado ameniza, portanto, os efeitos causados pelo controle químico sem que haja redução na eficiência do método (BENÍTEZ *et al.*, 2004).

O mercado de produtos microbianos agrícolas (incluindo produtos para controle biológico e bioestimulantes) foi avaliado em mais de 1 bilhão de dólares e estima-se que esse mercado possa ultrapassar os 7 bilhões de dólares em 2019 (PARNELL *et al.*, 2016). Dentre os principais impulsionadores deste mercado

estão: o crescente interesse dos consumidores em cultivos orgânicos, a redução de produtos sintéticos e o potencial econômico de países emergentes, como a China e Índia (PARNELL et al., 2016). No entanto, os pesticidas sintéticos ainda dominam o mercado. Apenas 3,5% do mercado global de pesticidas é representado por produtos para controle biológico (MOOSAVI & ASKARY, 2015).

Devido à sua diversidade, fácil reprodução e rápido crescimento em meios de baixo custo, os fungos (filamentosos e leveduriformes) têm sido bastante aplicados como antagonistas no controle biológico. No caso do biocontrole de doenças fúngicas, algumas espécies de fungos têm sido aplicadas comercialmente para o controle de doenças da parte aérea das plantas, das raízes, e também doenças pós-colheita (HYNES & BOYETCHKO, 2006). Consultas às bases de dados das agências reguladoras de bioprodutos para a agricultura dos EUA, a EPA (United States Environmental Protection Agency) e da Europa, a EU Pesticides database, bem como dados de revisões recentes (LENTEREN et al., 2018) revelam registros de fungicidas microbiológicos comerciais à base de: *Ampelomyces*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Clonosthachys*, *Coniothyrium*, *Cryptococcus*, *Endothia*, *Fusarium*, *Gliocadium*, *Metschnikowia*, *Muscodor*, *Talaromyces*, *Phlebiopsis*, *Pseudozyma*, *Saccharomyces*, *Verticillium*, e *Trichoderma*, sendo este o mais aplicado em biopesticidas disponíveis comercialmente ao redor do mundo (EPA, 2018; EUROPEAN COMMISSION, 2018).

No Brasil, os biofungicidas comerciais à base de fungos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento são: Afla-Guard, Cougar, Daytona, Ecotrich WT, Majestic, Predatox, Quality, Stimucontrol, Trichodermax EC e Trichodermil SC. Destes, à exceção do Afla-Guard, que é feito à base de *Aspergillus flavus*, todos possuem fungos do gênero *Trichoderma* como agente fungicida. Os produtos Quality e Trichodermax EC são à base de *Trichoderma asperellum*, enquanto que os demais são à base de *Trichoderma harzianum* (MAPA, 2018).

A aplicação de microrganismos agentes de biocontrole exige uma compreensão profunda dos aspectos ecológicos e fisiológicos da tríade microrganismo antagonista, praga ou patógeno alvo e a planta e, neste âmbito, fatores abióticos como o tipo de solo, umidade, incidência de luz ultravioleta e localização geográfica são importantes moduladores das comunidades



microbianas na rizosfera e na filosfera (PARNELL et al., 2016).

O controle biológico fúngico é resultado da ação sinérgica de várias estratégias empregadas por esses microrganismos, sendo estas: **competição** (é mais eficiente na assimilação de recursos tornando-os indisponíveis para o patógeno), **antibiose** (mata ou estabiliza o crescimento do patógeno por meio de um composto secretado), **resistência induzida** (incita a planta a produzir compostos antimicrobianos e outras respostas de defesa), **inativação de enzimas do patógeno** (proteases produzidas pelo antagonista degradam as enzimas produzidas pelo patógeno) e **parasitismo** (alimenta-se do patógeno) (MONTE, 2001; BENÍTEZ et al., 2004).

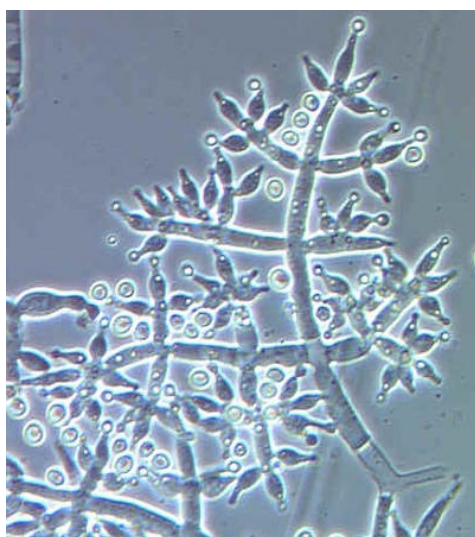
Além de bons antagonistas, agentes de biocontrole eficientes devem ser capazes de sobrepujar a fungistase causada pela ação de metabólitos liberados (no solo ou na parte aérea) por outros seres vivos, incluindo as plantas, e pela alta competitividade do ambiente (BENÍTEZ et al., 2004). Alguns fungos, como *Trichoderma* spp. conseguem colonizar rapidamente o solo devido à sua resistência a compostos tóxicos como pesticidas e compostos fenólicos (BENÍTEZ et al., 2004).

Como visto, produtos contendo fungos agentes de controle biológico já são comercializados e com efeitos benéficos no controle de doenças vegetais (BETTIOL et al., 2008), mostrando que o controle biológico não só é viável, como é rentável. Os avanços do conhecimento sobre a biologia, genética e ecologia dos fungos utilizados, bem como sobre o microbioma das plantas e dos solos, e como essas interações podem ser moduladas em benefício da planta hospedeira têm propiciado cada vez mais esse pujante campo de pesquisa, em prol de uma agricultura mais sustentável (AGLER et al., 2016; VAN DER HEIJDEN & HARTMANN, 2016).

### **O gênero *Trichoderma***

O gênero *Trichoderma* pertence ao filo Ascomycota (classe Sordariomycetes) e compreende mais de 260 espécies conhecidas (BISSETT et al., 2015; DRUZHININA et al., 2018). Em sua maioria, as espécies desse gênero são fungos anamorfos e assexuados de crescimento rápido, que exibem conidióforos

ramificados (figura 1) e conídios verdes característicos (GRAMS & MEYER 1998).



**Figura 1.** Conidióforos de *Trichoderma harzianum*. Microscópio óptico, aumento de 40x. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Systematic Botany and Mycology Laboratory. Domínio público.

Para algumas espécies a fase sexuada é conhecida, a qual até meados de 2013 era denominada *Hypocrea*. Com a reestruturação da taxonomia de fungos para a utilização de uma única denominação, independentemente de se conhecer ou não as fases sexuada e assexuada, o nome *Trichoderma* passou a ser a denominação válida para o gênero, conforme determinado pela *International Commission on the Taxonomy of Fungi* (BISSETT et al., 2015). A classificação atual de *Trichoderma* é baseada na distribuição das espécies em clados filogenéticos (exemplos: clados *Trichoderma*, *Longibrachiatum*, *Harzianum*, *Pachybasium*) baseados em análises de dados de sequências (KUBICEK et al., 2008; DRUZHININA et al., 2018).

*Trichoderma* spp. ocupam uma miríade de nichos ecológicos e desempenham um papel importante no equilíbrio dos ecossistemas (MUKHERJEE et al., 2013a). Muito embora algumas espécies sejam consideradas patógenos oportunistas de animais e humanos (MUKHERJEE et al., 2013b) e patógenos de culturas de cogumelos comestíveis (KUBICEK et al., 2008), em sua maioria são consideradas ubíquas colonizadoras de solos, de material vegetal em decomposição.

Algumas espécies são capazes de estabelecer uma interação endofítica com as plantas (HARMAN et al., 2004) podendo, inclusive, associar-se às suas raízes, compondo parte importante da microbiota associada à rizosfera

(CONTRERAS-CORNEJO et al., 2016). Diferentes espécies de *Trichoderma* são reconhecidas pelos efeitos benéficos conferidos às plantas, tal como promoção de crescimento vegetal e indução de respostas de defesa contra estresses bióticos e abiótico (KASHYAP et al., 2017). Estes fungos são ainda capazes de controlar nematoides, induzir resistência a diferentes tipos de patógenos, conferir tolerância a estresses abióticos, melhorar o crescimento e o vigor das plantas, solubilizar nutrientes e remover metais pesados e poluentes ambientais (MUKHERJEE et al., 2013a; CONTRERAS-CORNEJO et al., 2016).

Uma característica importante e considerada um caráter ancestral do gênero *Trichoderma* é o micoparasitismo. Muitas espécies de *Trichoderma* possuem a capacidade de antagonizar, de parasitar ou até de matar outros fungos (MUKHERJEE et al., 2013a). O micoparasitismo tem sido a principal força motriz por trás do sucesso comercial de *Trichoderma* spp. como biopesticida (mais de 60% de todos os biopesticidas registrados são à base de *Trichoderma*) (VERMA et al., 2007).

No processo de micoparasitismo, as hifas de *Trichoderma* crescem em direção às hifas do fungo hospedeiro, induzidas por oligômeros resultantes da ação de quitinases produzidas constitutivamente por *Trichoderma* na parede celular do próprio hospedeiro (BENÍTEZ et al., 2004). Carboidratos de parede celular da célula antagonista reconhecem então a lecitina do fungo hospedeiro, ligando-se ao mesmo. As hifas de *Trichoderma* se enrolam nas hifas do patógeno e formam estruturas denominadas apressórios, dando início à penetração na parede celular do hospedeiro via enzimas líticas, consideradas fundamentais no processo de micoparasitismo (BENÍTEZ et al., 2004; OZBAY & NEWMAN, 2004).

Dentre as enzimas degradadoras de parede celular fúngica produzidas por *Trichoderma* spp. micoparasitas estão as quitinases, as quais podem ser classificadas em 1,4- $\beta$ -acetilglicosaminidases (GlcNAcases - EC 3.2.1.30), endoquitinases (EC 3.2.1.14) e exoquitinases ou quitobiosidases; as glicanases, como a  $\beta$ -1,3-glicanase e a  $\alpha$ -1,3-glicanase; e diferentes proteases ácidas e alcalinas (BENÍTEZ et al., 2004.; KUBICEK et al., 2011; VITERBO et al., 2002).

*Trichoderma* spp. também apresentam alta resistência a fungicidas, herbicidas, pesticidas e compostos fenólicos (BENÍTEZ et al., 2004), a qual pode estar associada à presença de proteínas transportadoras de membrana do tipo

ABC (*ATP-binding cassette*). Estas permeases transportam substâncias diversas para fora da membrana celular, diminuindo o acúmulo de compostos tóxicos (HARMAN et al., 2004).

Além disso, conforme relatado por STOPPACHER et al. (2013), *Trichoderma* spp produzem 83% dos antibióticos peptídicos descritos na base de dados The Comprehensive Peptaibiotics Database. Estes compostos têm atraído considerável interesse devido às suas propriedades antimicrobianas e potencial para aplicações no biocontrole (DEGENKOLB et al., 2015). Os peptaibióticos são definidos como compostos peptídicos contendo 5 a 20 resíduos de aminoácidos, ricos em aminoácidos não proteinogênicos incluindo o ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico (Aib) e o ácido isovalérico (Iva), exibindo um álcool na porção C-terminal e contendo um grupo acetil na porção N-terminal (DU et al., 2017). Os peptaibióticos formam poros nas membranas externas das células, fazendo com que a maioria dos compostos desta classe exibam propriedades citotóxicas não específicas para células bacterianas, fúngicas e de mamíferos (DU et al., 2017).

Devido à versatilidade deste gênero, a disponibilidade de sequências genômicas de *Trichoderma* tem aumentado nos últimos anos. Atualmente, 9 espécies possuem sequência genômica anotada: *T. reesei*, *T. parareesei*, *T. longibrachiatum*, *T. citrinoviride*, *T. guizhouense*, *T. harzianum*, *T. virens*, *T. asperellum*, *T. atroviride* (DRUZHININA et al., 2018). Tais análises contribuem para o avanço do conhecimento da biologia, ecologia, evolução e aplicação biotecnológica do gênero *Trichoderma* (DRUZHININA et al., 2018).

A tabela 1 elenca alguns dos metabólitos e enzimas produzidas por fungos do gênero *Trichoderma*, bem como o efeito descrito para cada um deles.

**Tabela 1.** Metabólitos secundários produzidos por *Trichoderma* spp. Adaptado de CONTRERAS-CORNEJO et al. (2016).

<b>Categoria</b>	<b>Composto</b>	<b>Efeito</b>
<b><i>Antibióticos</i></b>		
Azafilona	T22azafilona	Inibe o crescimento de <i>R. solani</i> , <i>P. ultimum</i> e <i>G. graminis</i>
Composto derivado de ergosterol	Ergokonina A	Atividade antifúngica contra <i>Candida</i> sp.
Trichoteceno	Trichodermina	Metabólico fungitóxico contra <i>Candida</i> spp.
Pirona	6-(1-Pentenil)-2H-piran-2-ona	Atividade antifúngica contra <i>Penicillium</i> spp., <i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i> e <i>C. neoformans</i>

Pirona	Viridepironona	Atividade antagonista contra <i>S. rolfsii</i>
Dicetopiperazina	Gliovirina	Composto antimicrobiano contra oomicetos e <i>S. aureus</i>
Composto nitrogenado heterocíclico	Ácido harziânico	Metabólito antimicrobiano, sideróforo e regulador de crescimento vegetal
Metabólito de isociano	Dermadina (U-21, 963)	Atividade antimicrobiana contra <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>
Composto nitrogenado heterocíclico	Harzianopiridona	Atividade antifúngica contra <i>B. cinerea</i> e <i>R. solani</i> e inibidor da proteína fosfatase tipo 2A (PP2A)
Dicetopiperazina/NRP	Gliotoxina	Atividade antiviral, antibacteriana e fungistática e propriedades imunossupressoras
Butenolida	5-Hidroxivertinolida	Atividade antagonista contra o fungo <i>Mycena citricolor</i>

### **Interações planta-fungo**

Composto hidrocarbonado	Etileno (ET)	Regula diferenciação celular e respostas de defesa
Isoprenoide	Ácido Abscísico (ABA)	Regula abertura estomática em <i>A. thaliana</i>
Composto Indólico	Ácido indol-3-acético (IAA)	Controla vários processos de crescimento em plantas
Composto Indólico	Indol-3-acetaldeído	Controla crescimento da raiz em <i>A. thaliana</i>
Composto Indólico	Indol-3-carboxaldeído	Induz formação de raízes adventícias em <i>A. thaliana</i>
Carotenos	Trichocaranos A, B, C e D	Inibe o crescimento de coleótilos etiolados do trigo
Peptídeo	Trichokonin VI (Tk VI)	Inibe o crescimento de raízes primárias em <i>A. thaliana</i>
Pirona	6-Fentil-2H-piran-2-one	Atividades antifúngica, antinematóide e promotora de crescimento vegetal em tomate e em <i>A. thaliana</i>
Metabólito tipo setina	Trichosetina	Inibe o crescimento de arroz, tomate e <i>Medicago</i>
Sesquiterpeno	Ciclonerodiol	Inibe o crescimento de coleótilos etiolados do trigo
Peptaibol	Alameticina	Induz defesa vegetal em feijão e resistência a patógenos
Sideróforo	Fusarinina C	Ferro-quelante
Peptaibol/NRP	Trichovirina II	Induz resistência em pepino
Peptaibol	sm1	Ativa respostas de defesa no algodão, no arroz e no milho
Peptaibol	Epl1	Ativa respostas de defesa por meio de jasmonato (JA) e salicilato (AS) no milho
Monoterpeno	cis- e trans- $\beta$ -Ocimeno	Induz a expressão de genes de defesa JA em <i>A. thaliana</i>
Pirano	Koninginina A	Regulador de crescimento vegetal

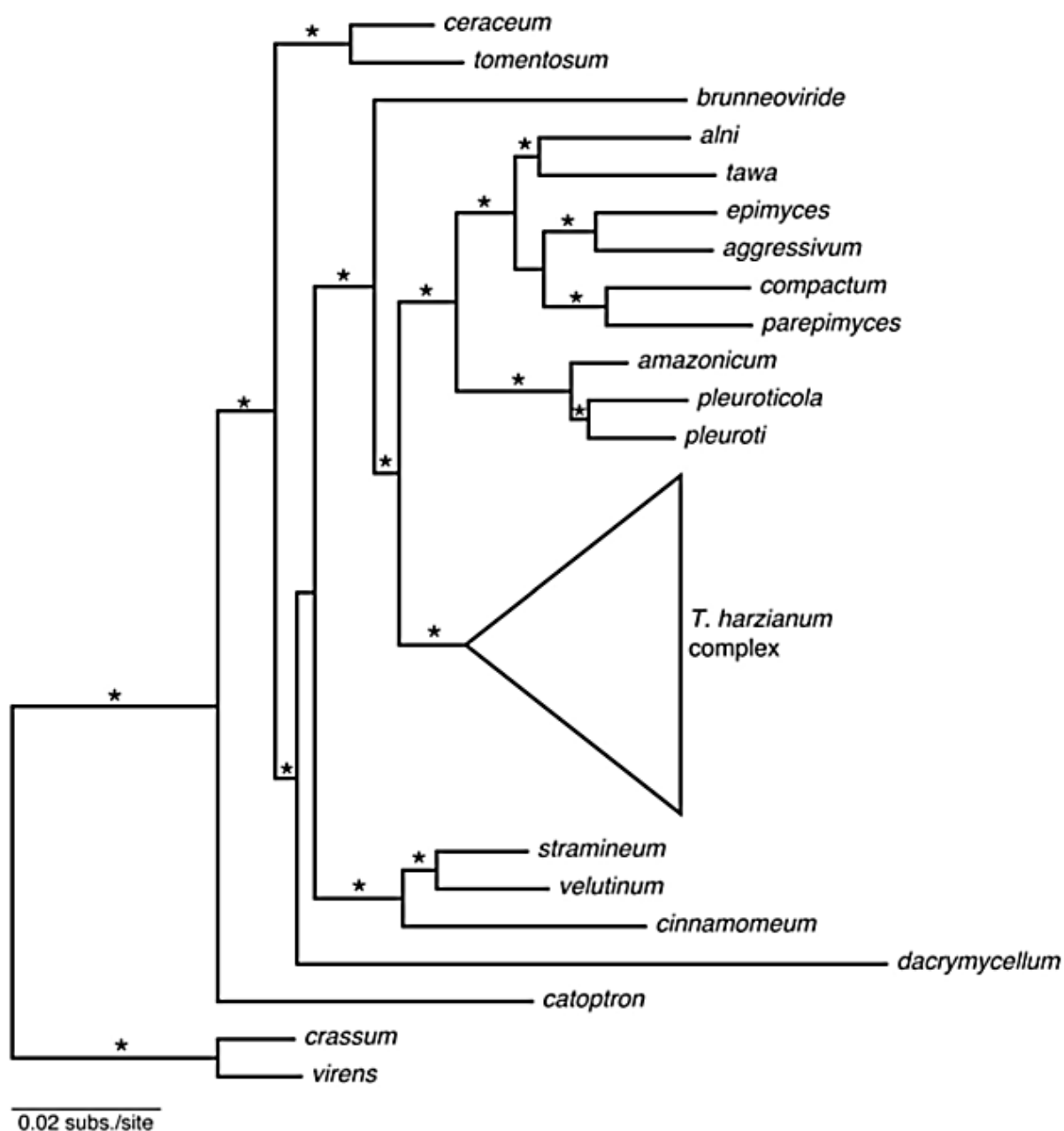
Monoterpeno	$\beta$ -Mirceno	Regula genes relacionados à estresses biótico e abiótico
Enzimas hidrolíticas	Celulases	Degrada celulose durante a colonização das raízes para penetração no tecido vegetal
Sideróforo	Coprogeno B	Solubiliza ferro indisponível para a planta
Trichoteceno	Trichodermina	Efeito fitotóxico
<b><i>Crescimento e desenvolvimento fúngico</i></b>		
Antraquinona	Crisofanol	Relacionado à pigmentação
Pirano	Koninginina D	Altera o crescimento dos patógenos <i>R. solani</i> , <i>P. cinnamomi</i> , <i>P. middletonii</i> , <i>F. oxysporum</i> e <i>B. sorokiniana</i>
Composto esteróide	Viridina	Altera germinação de esporos de <i>B. allii</i> , <i>C. lini</i> e <i>F. caeruleum</i>
Trichoteceno	Trichodermina	Inibe as etapas de alongação e terminação na síntese proteica
Álcool	1-Octen-3-ol	Induz conidiação e respostas de defesa mediadas por JA
Cetona	3-Octanona	Induz conidiação
Álcool	2-feniletanol	Reduz o crescimento de <i>A. flavus</i> e a produção de aflatoxina.
Álcool	Tirosol	Quorum sensing
<b><i>Metabólitos relacionados ao micoparasitismo</i></b>		
Antraquinona	Paquibasina	Atua contra <i>R. solani</i>
Sideróforo	Ferricrocina	Metabólito chave na competição por ferro na rizosfera
Bisorbicillinoide	Bisvertinolona	Atividade antifúngica via inibição de $\beta$ -(1,6)-glicana
Enzimas hidrolíticas	$\beta$ -1,6-Glicanases	Hidrolisa a parede celular dos fungos patogênicos <i>B. cinerea</i> , <i>R. solani</i> , e <i>P. citrophthora</i>
Enzimas hidrolíticas	Quitinases	Hidrolisa parede celular fúngica
<b><i>Compostos terapêuticos</i></b>		
Antraquinona	Emodina	Agente antimicrobiano e antineoplásico
Trichoteceno	Trichodermol	Agente antimalárico
Dipeptídeo	Trichodermamida A	Efeito citotóxico nas linhagens de células P388, A-549 e HL-60
Dipeptídeo	Trichodermamida B	Citotoxicidade contra células de carcinoma de cólon
Metabólito de isociano	MR566A, ciclopentil isonitrila com substituição de clorina	Inibe a biossíntese de melanina em células de melanoma B16
Composto esteróide	Wortmannolona	Inibe a fosfatidilinositol 3-quinase com potencial para combater neoplasmas humanos

Composto esteróide	Virona	Inibe fosfatidilinositol 3-quinase
Azafilona	Fleefilona	Atividade inibitória contra a ligação de proteínas reguladoras da expressão de vírions (VER)
Azafilona	Harzifilona	Citotoxicidade contra células de tumor murino M-109
Bisorbicillinoide	Trichodimerol	Inibição da produção de fator de necrose tumoral $\alpha$ , induzida por lipopolissacarídeos, em monócitos humanos
Estatina	Compactina (mevastatina)	Agente de redução de colesterol
Sesquiterpeno	Ácido heptelídico (ácido koníngico)	Potencial atividade contra o parasita <i>P. falciparum</i> , causador da malária
<b><i>Outras funções</i></b>		
Sesquiterpeno	$\beta$ -Farneseno	Atua como um alarme de feromônio em afídeos
Sesquiterpeno	$\beta$ -Cariofileno	Atrai nematóides que predam larvas de inseto
Composto esteróide	Viridiol	Herbicida
Composto nitrogenado heterocíclico	Melanoxadina	Inibibe a formação de melanina na hemolinfa larval do bicho-da-seda <i>Bombyx mori</i>
Bisorbicillinoide	Bisorbicillinol	Antioxidante

### **A espécie *Trichoderma harzianum***

RIFAI (1969) reconheceu *T. harzianum* como integrante de um agregado de espécies de características morfológicas quase indistinguíveis. Este agregado de espécies forma o clado *Harzianum*. Fungos descritos anteriormente como *T. harzianum* foram reclassificados com o advento de técnicas moleculares e filogenéticas, sendo a maioria pertencentes ao complexo de espécies *T. harzianum* (Figura 2), e não propriamente à *T. harzianum sensu strictu*. Este infortúnio ocorreu, inclusive, com linhagens componentes de produtos comerciais (CHAVERRI et al., 2015).

De fato, cepas originalmente caracterizadas como *T. harzianum* foram diferenciadas em pelo menos 14 diferentes espécies agrupadas em seções e grupos distintos. Dentre elas podem ser citadas as espécies *T. guizhouense*, *T. harzianum*, *T. inhamatum*, *T. lentiforme*, *T. lixii*, *T. afarasin*, *T. afroharzianum*, *T. atrobrunneum*, *T. camerunense*, *T. endophyticum*, *T. neotropicale*, *T. pyramidale*, *T. rifaii* e *T. simmonsii* (CHAVERRI et al., 2015).



**Figura 2.** Árvore filogenética do clado *Harzianum* evidenciando a posição do complexo de espécies *T. harzianum* (CHAVERRI et al., 2015).



Os mecanismos moleculares envolvidos no micoparasitismo e na capacidade de biocontrole de *T. harzianum* têm sido estudados sob diferentes aspectos, tais como: análise funcional de genes envolvidos na interação com o patógeno alvo (MONTERO-BARRIENTOS et al., 2011; LIU et al., 2012; CARDOZA et al., 2007; CARDOZA et al., 2014; RUBIO et al., 2017); análise funcional de genes envolvidos na interação com a planta hospedeira (SAMOLSKI et al., 2012; MALMIERCA et al., 2014; FAN et al., 2015; DOMINGUEZ et al., 2016); e análise de genes que conferem melhoria de desempenho de cepas comerciais, tal como tolerância à estresses abióticos (MONTERO-BARRIENTOS et al., 2007, 2008).

Genes codificadores de quitinase, glicanase, *heat shock protein*, aquaporina, aquagliceroporina de *T. harzianum* têm sido inseridos no genoma de diferentes plantas (via transgenia) visando o controle de patógenos e tolerância a estresses abióticos diversos (LORITO et al., 1998; NICOLÁS et al., 2014; VIEIRA et al., 2017). De fato, considera-se que ainda há uma lacuna no conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos no micoparasitismo e biocontrole de *T. harzianum*, apesar de ser a espécie mais utilizada no mundo como biopesticida. A disponibilidade da sequência genômica anotada dessa espécie, juntamente com dados de análises do transcrito, proteoma e metaboloma sob diferentes condições deve contribuir para o avanço do conhecimento da sua interação com fitopatógenos/pragas e com as plantas (DRUZININA et al., 2018).

Com relação à caracterização de genes relacionados ao micoparasitismo, merecem destaque os genes *exc1*, *exc2*, *tvnag1*, e *tvnag2*, que codificam para GlcNAcases; *chit33*, *chit36* e *chit42*, que codificam endoquitinases; *bgn13.1* e *lam1.3*, que codificam  $\beta$ -1,3-glicanases; e *prb1* e *pra1*, que codificam proteases (BENÍTEZ et al., 2004). As enzimas  $\beta$ -1,3-glicanases e quitinases em geral são consideradas enzimas chave no processo de micoparasitismo e *T. harzianum* é capaz de produzi-las em quantidades elevadas (VITERBO et al., 2002; OZBAY & NEUWAN, 2004).

Com relação à função de genes envolvidos na produção de metabólitos secundários, CARDOZA et al. (2007) silenciaram o gene *hmgR* (que codifica uma enzima chave da via de biossíntese de terpenos, a hydroxymethylglutarylCoA reductase - HMGR) da linhagem *T. harzianum* CECT 2413. Os autores verificaram que os transformantes mostraram uma diminuição da produção de ergosterol e

também uma redução na atividade antifúngica contra os patógenos *R. solani* e *F. oxysporum*, em comparação com a cepa selvagem.

YAO et al. (2016) verificaram que os genes codificadores de duas policetídeo sintases (genes *pksT-1* e *pksT-2*) da cepa *T. harzianum* 88 são diferencialmente regulados durante a interação com os patógenos *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *F. oxysporum*. Embora os metabólitos secundários produzidos por essas PKS não sejam conhecidos, os autores verificaram que a disrupção do gene *pksT-2* levou à uma drástica diminuição do crescimento micelial e ao acúmulo de pigmentação alaranjada nos conídios em comparação com a cepa parental, corroborando o envolvimento da enzima PKS na produção de pigmentos.

CARDOZA et al. (2014) avaliaram o efeito da superexpressão do gene *erg1* em *T. harzianum* CECT 2423 (T34). Esse gene codifica uma enzima chave da via biossintética do ergosterol (um triterpeno), a squalene epoxidase (SE). O ergosterol por sua vez é um agente elicitor de respostas de defesa nas plantas. Os autores verificaram que a superexpressão do gene *erg1* não alterou os níveis de ergosterol, mas resultou em uma redução drástica no nível de squalene. Diferenças significativas foram observadas nas respostas de defesa de plantas de tomate inoculadas com a cepa transformada, em comparação com a cepa parental. Além disso, os autores verificaram que o transformante que superexpressou o gene *erg1* mostrou um aumento significativo na sua atividade antifúngica contra o fitopatógeno *B. cinerea* em experimentos *in vitro* em folhas de tomate. Em seguida, MALMIERCA et al. (2015) realizaram a disrupção do gene *erg1* e observaram um acúmulo do squalene. Os autores observaram um aumento significativo nas respostas de defesa de plantas de tomate inoculadas com o fungo transformante superprodutor do squaleno, revelando o papel essencial desse intermediário da síntese do ergosterol na interação com a planta.

LIU et al. (2012) avaliaram a função do gene *Thmfs1*, que codifica uma proteína transportadora da família MFS (*major facilitator superfamily*). Os autores verificaram que a linhagem *T. harzianum* LC2 com deleção no gene *Thmfs1* foi mais sensível à toxina endógena trichodermin, enquanto que a superexpressão do gene conferiu à cepa maior resistência (auto-proteção) contra esse antibiótico de *T. harzianum*. Além disso, a superexpressão da proteína transportadora conferiu maior resistência à diferentes compostos antifúngicos. Também foi observado

que a disrupção do gene diminuiu significativamente a atividade antifúngica do extrato do sobrenadante do cultivo da cepa LC2 contra diferentes fitopatógenos, e que a superexpressão da proteína transportadora aumentou a atividade antifúngica dos extratos produzidos, em comparação com a cepa parental.

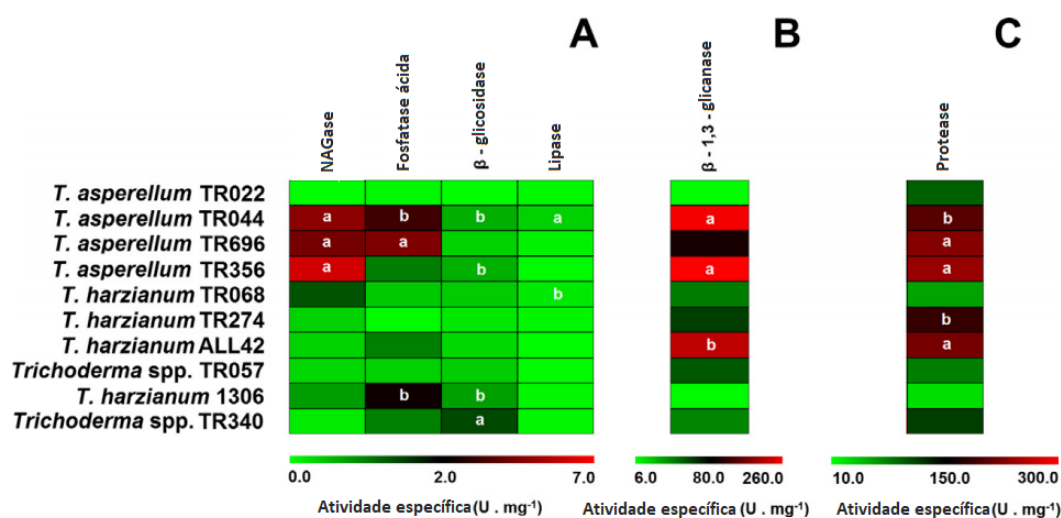
Esses estudos exemplificam e revelam que ainda há uma lacuna no conhecimento do metabolismo secundário de *T. harzianum*. Nesse aspecto, mais estudos são necessários para a descoberta dos compostos produzidos pelas dezenas de genes (clusters) de metabolismo secundário anotados no genoma dessa espécie (DRUZININA et al., 2018).

### **A linhagem *Trichoderma harzianum* BRM27158**

A linhagem de *T. harzianum*, objeto deste estudo, é a BRM27158, que foi isolada de amostras de solo em Holambra, SP, Brasil. Desde então, passou a integrar a Coleção de Microrganismos para o Controle de Fitopatógenos e Plantas Daninhas (CMCFD) da Embrapa Arroz e Feijão (CNPAP) sob o código 303.02. À época, o isolado foi identificado como *Trichoderma* sp. com base em análises morfológicas (ALELO, 2018).

Em 2013, GERALDINE et al. testaram o potencial para controle biológico de 10 linhagens de *Trichoderma*, incluindo a 303.02, que deste ponto em diante passou a ser chamada de TR274, contra *S. sclerotiorum*, fungo causador da podridão branca no feijão. Neste mesmo trabalho, a identificação do isolado a nível de espécie foi feita com base nas sequências de DNA ribossômico (ITS1-5.8S-ITS2) e de TEF1, sendo classificada como *T. harzianum*. Os autores também dosaram a atividade específica de várias enzimas envolvidas no processo de controle biológico para cada um dos isolados estudados e a linhagem TR274 exibiu alta atividade de proteases (Figura 3).

Ainda em 2013, QUALHATO et al. compararam a atividade antagonista de quatro diferentes espécies de *Trichoderma*: *T. harzianum* (representada pela linhagem TR274), *T. tomentosum*, *T. asperellum* e *T. ghanense*. Eles observaram que TR274 apresentou antagonismo muito eficiente contra os três patógenos estudados, além de uma expressiva inibição do crescimento de *S. sclerotiorum* por metabólitos voláteis (Tabela 2).



**Figura 3.** Heatmap de enzimas degradadoras de parede celular de *Trichoderma* spp., cultivadas na presença de parede celular de *S. sclerotiorum*. Atividades específicas das enzimas: NAGase, fosfatase ácida, β-glicosidase e lipase (A), β-1,3-glicanase (B) e protease (C). Letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott ( $\alpha = 0,05$ ). a = atividade mais alta; b = alta atividade. Adaptado de GERALDINE et al. (2013).

**Tabela 2.** Antagonismo e inibição de crescimento de *S. sclerotiorum*, *F. solani* e *R. solani* por espécies de *Trichoderma*. Adaptado de QUALHATO et al. (2013).

Espécies	Antagonismo*			Inibição de crescimento por metabólitos voláteis (%)**		
	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>F. solani</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>F. solani</i>	<i>R. solani</i>
<i>T. harzianum</i>	2.0a	1.6a	3.0a	66a	33b	41c
<i>T. ghanense</i>	3.3b	1.3a	3.6a	33b	32b	33b
<i>T. asperellum</i>	2.0a	1.6a	2.6a	17c	71a	66a
<i>T. tomentosum</i>	2.6b	3.6b	2.6a	0	28b	52b

\* a antagonismo muito eficiente; b antagonismo eficiente

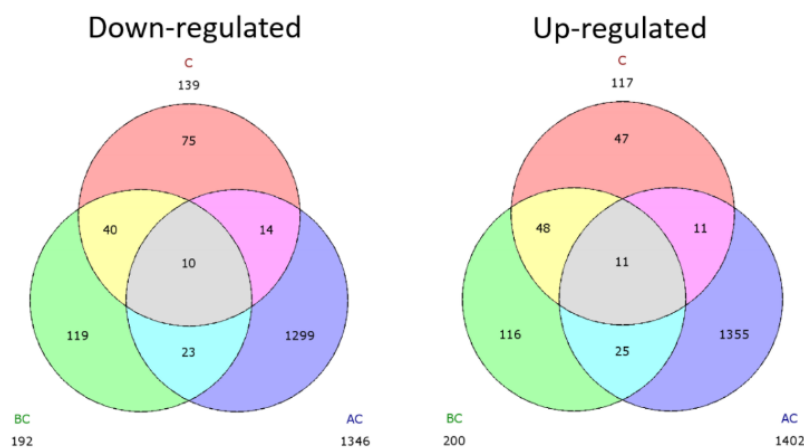
\*\* Valores seguidos da mesma letra não diferem pelo teste Scott-Knott ( $\alpha = 0,05$ ).

Em 2014, STEINDORF et al. fizeram um estudo de expressão diferencial de genes da linhagem TR274 em resposta ao fitopatógeno *S. sclerotiorum* por RNA-seq. Os autores constataram que, especialmente nas 12 primeiras horas de cultivo com a parede celular do fitopatógeno como substrato, os genes com maior expressão diferencial possuem função predita de protease, conforme observado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Fold Change (FC) em  $\log_2$  dos 10 genes com maior expressão diferencial após 12 h e suas expressões após 24 h e 36 h. Adaptado de STEINDORF et al. (2014).

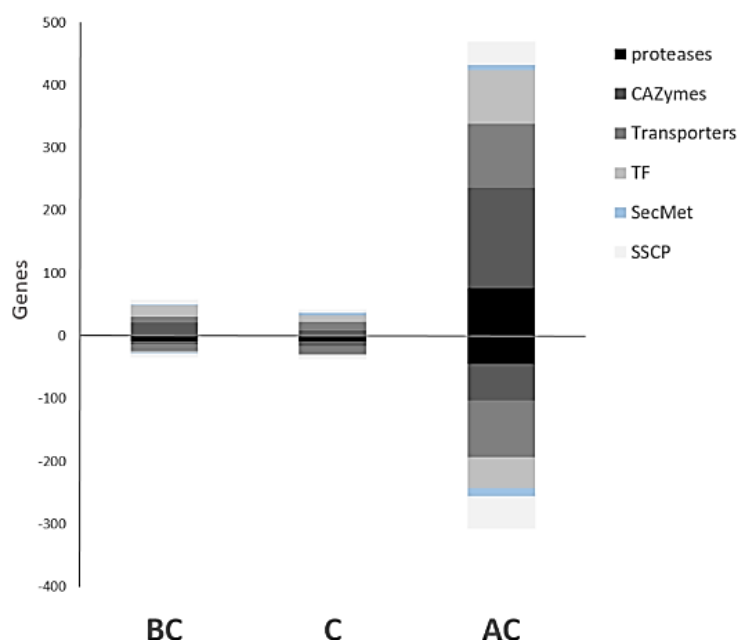
JGI ID	Possível função	12 h	24 h	36 h
86893	Protease aspártica	114.208	0.62564	-3.18003
91534	Proteína proteinase ácida	111.366	0.04225	-7.00264
526221	Protease similar à tripsina.	108.711	10.817	495.966
154554	Serina protease alcalina	107.861	0.062284	-8.35379
500888	Quitinase chi18-17	107.537	-0.26535	-3.95398
521588	Isotrichodermina c-15 hidroxilase	106.739	696.978	-1.43531
100207	Proteína hipotética TRIVIDRAFT_62551	10.488	196.719	164.245
524327	N,O-diacetil muramidase(GH25)	100.928	671.248	393.055
43497	Proteína hipotética TRIVIDRAFT_130513	100.535	623.974	118.343
476485	Proteína rica em serina, não caracterizada	100.402	201.486	-0.79684

Finalmente, STEINDORF (2016) sequenciou o genoma de TR274, tendo o genoma de *T. harzianum* CBS 226.94 como referência. Neste mesmo estudo, foram avaliadas as expressões diferenciais em todo o genoma antes, durante e após o contato com o fitopatógeno. Aproximadamente 24,4% de todos os modelos gênicos previstos para o genoma desta linhagem foram diferencialmente expressos em todas as etapas da interação, destes, 80,9% foram expressos após o contato com o patógeno (Figura 4).



**Figura 4.** Genes diferencialmente expressos, num total de 3396, divididos em reprimidos (down-regulated) e induzidos (up-regulated) antes do contato (BC), durante o contato (C) e após o contato (AC) com o fitopatógeno *S. sclerotiorum* (STEINDORF, 2016).

STEINDORF (2016) relata ainda que dos genes diferencialmente expressos nas diferentes fases da interação com o patógeno, a maioria representa pequenas proteínas secretadas ricas em cisteína, seguidas de genes envolvidos no metabolismo secundário, de fatores de transcrição, de transportadores, de enzimas ativas de carboidrato (CAZymes), e, finalmente, das proteases (Figura 5).



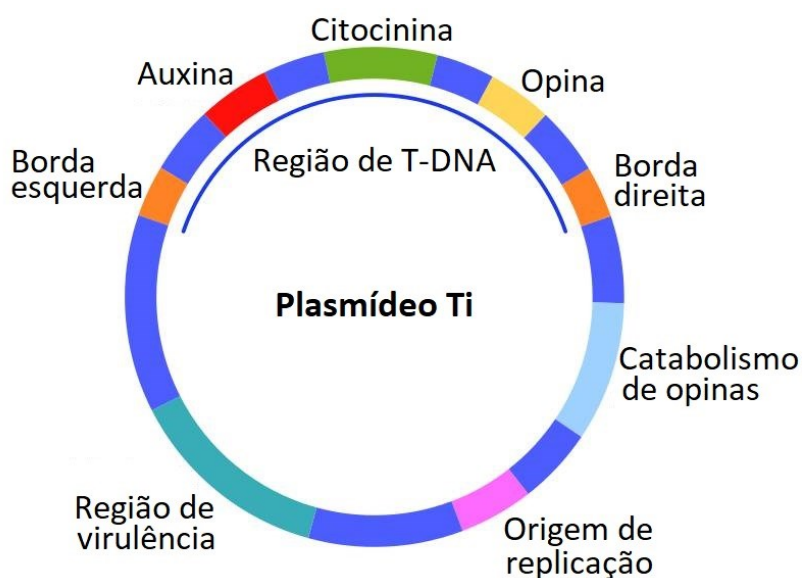
**Figura 5.** Genes diferencialmente expressos classificados em proteases, CAZymes, transportadores, fatores de transcrição (TF), metabolismo secundário (SecMet) e pequenas proteínas secretadas e ricas em cisteína (SSCP). As barras positivas denotam genes induzidos e as barras negativas, reprimidos (STEINDORF, 2016).

Com base nestes trabalhos, a linhagem TR274, referida daqui em diante como BRM27158, foi estabelecida como potencial agente de controle biológico, justificando sua escolha como objeto de estudo para esta dissertação.

### **Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* em fungos filamentosos**

O método de transformação mediada por *A. tumefaciens* (ATMT) consiste na utilização de uma estratégia de virulência da bactéria Gram negativa que induz a formação de tumor em plantas por meio de um DNA plasmidial chamado Ti (*tumor inducing*), de tamanho aproximado de 200 Kb (LI et. al., 2017; MICHIELSE et al., 2005). Este plasmídeo contém uma região de DNA de transferência, chamada T-DNA, que se integra no genoma do hospedeiro de forma aleatória. É flanqueado por regiões formadas de 25 pares de bases repetidas chamadas borda esquerda (*left border* – LB) e borda direita (*right border* – RB). O T-DNA contém ainda genes que codificam hormônios vegetais, auxina e citocinina, que induzem a formação do tumor, e genes codificadores de opinas, que funcionam como fonte de nitrogênio e carbono para a bactéria (GELVIN, 2003; MICHIELSE et al., 2005; PITZSCHKE, 2010).

O plasmídeo Ti possui ainda genes de virulência, ou *vir* genes, que estão relacionados ao reconhecimento e à integração do T-DNA no genoma hospedeiro sendo VirA e VirG2 os principais componentes da transdução de sinais. VirA é uma quinase que ativa VirG, um fator de transcrição que induz a expressão de outros genes *vir* (GELVIN, 2003). Quanto à integração do DNA de transferência, VirD1 e VirD2, endonucleases específicas, formam um complexo no qual as proteínas reconhecem as bordas do T-DNA, separando-o do plasmídeo Ti gerando um fragmento de T-DNA fita simples (GELVIN, 2003). VirB e VirD4 formam o *pili* de conjugação, pelo qual o complexo será transferido da bactéria para a célula vegetal, cujo núcleo será penetrado pelo T-DNA fita simples e convertido em fita dupla (GELVIN, 2003; PITZSCHKE, 2010). Além do T-DNA e dos genes *vir*, o plasmídeo Ti também possui origem de replicação e genes associados ao metabolismo de opinas (GELVIN, 2003), conforme ilustrado na figura 6.



**Figura 6.** Representação de um plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*.

Para a utilização do plasmídeo Ti como ferramenta biotecnológica para transformações genéticas, o mesmo precisa ser “desarmado”, ou seja, os oncogenes devem ser removidos (HIEI et al., 1997). Os genes de produção e metabolização de opinas também são retirados do plasmídeo, pois são necessários à sobrevivência da bactéria e não à transformação do hospedeiro, portanto, sendo dispensáveis (HIEI et al., 1997). O DNA de interesse pode ser inserido então entre as bordas direita e esquerda do T-DNA. Esta técnica permite a inserção (na maioria dos casos inserção única) aleatória de um gene de interesse (normalmente são usados genes marcadores seletivos como fluoróforos e genes de resistência a antibióticos) no genoma da célula hospedeira (HIEI et al., 1997).

Quando comparada aos métodos existentes para transformação genética de fungos filamentosos, a transformação mediada por *A. tumefaciens* destaca-se pela eficiência e estabilidade (LI et al., 2017; SUN et al., 2018). Além disso, há certa liberdade na escolha do material a ser transformado, podendo ser utilizados protoplastos, micélio ou esporos (LI et al., 2017). Por último, a região de inserção do T-DNA pode ser facilmente identificada por TAIL-PCR, PCR inversa ou resgate plasmidial (SUN et al., 2018).

Fatores como o tipo de material utilizado para transformação, a



concentração de acetoseringona (composto fenólico que induz a transcrição dos genes *vir*), a razão entre as quantidades de células da bactéria e células do fungo e condições do co-cultivo influenciam a eficiência do método e devem ser otimizados para cada espécie ou linhagem de fungo (LI et al., 2017).

Alguns dos métodos alternativos à ATMT na mutagênese aleatória são mutagênese por transposon e integração mediada por enzimas de restrição (REMI). Porém, há relatos de que ambos ocorrem de forma não totalmente randômica, havendo preferência para regiões não codantes pelo primeiro e por regiões de elevada transcrição pelo segundo (MICHIELSE et al., 2005).

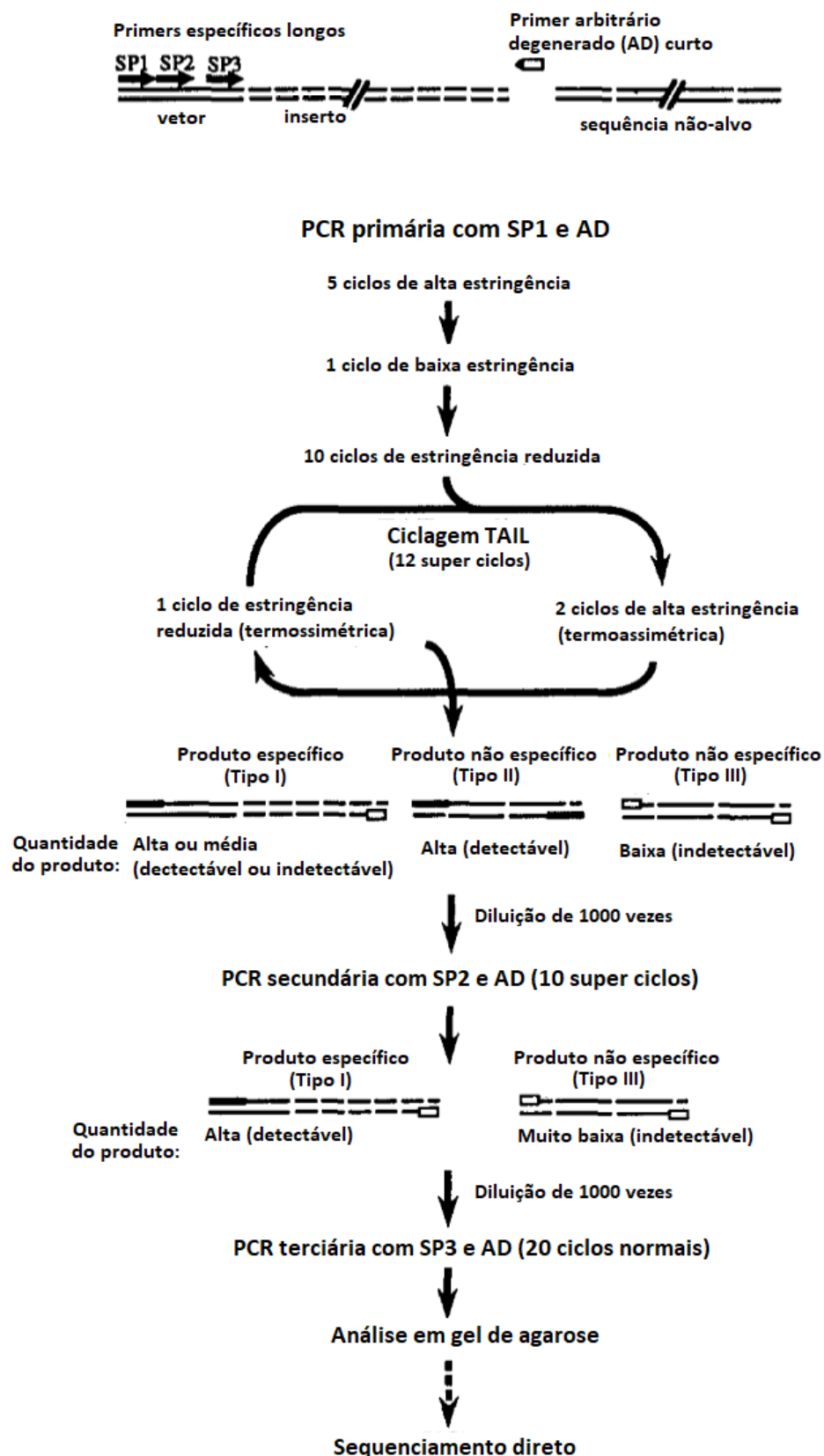
Embora a transformação de fungos por protoplasto-PEG seja amplamente difundida e utilizada, a transformação por *Agrobacterium* tem ganhado destaque na pesquisa em genética de fungos filamentosos devido à facilidade da metodologia. As principais aplicações da transformação mediada por *Agrobacterium* em fungos filamentosos têm sido a interrupção de genes alvo e a expressão de genes de interesse. Outra utilidade dessa estratégia é a mutagênese insercional aleatória, a qual tem sido aplicada para obtenção de bibliotecas de transformantes como ferramentas úteis para descoberta e validação de função de genes (LI et al., 2017).

Um dos desafios enfrentados ao realizar inserções aleatórias no genoma de qualquer organismo é descobrir qual região do DNA foi alterada, por exemplo, pela inserção do T-DNA de *A. tumefaciens* (LIU et al., 1995). Na tentativa de contornar este problema, técnicas como as PCRs hemiespecífica, a inversa e a unilateral foram desenvolvidas. No entanto, estes métodos dependiam de manipulação prévia da amostra de DNA, como *Southern Blot*, marcação e cortes com enzimas de restrição, tornando-os mais caros e laboriosos (LIU et al., 1995).

Os pesquisadores Yao-Guang Liu e Robert F. Whittier desenvolveram então em 1995 a técnica *Thermal Asymmetric Interlaced PCR* ou TAIL-PCR, que dispensa qualquer tratamento prévio da amostra de DNA. A técnica utiliza dois tipos de primers: o específico, que reconhece uma região conhecida do genoma; e o arbitrário degenerado, que irá reconhecer regiões aleatórias do genoma do organismo devido à sua baixa especificidade. A PCR hemiespecífica se baseia na mesma lógica, porém, ao final da reação são gerados vários fragmentos não-alvo. A novidade trazida pela TAIL-PCR são as três etapas (primária, secundária e

terciária), nas quais o *pool* de fragmentos vai afunilando e diminuindo a quantidade de sequências não-alvo (LIU & WHITTIER, 1995). A estratégia é chamada de assimétrica, pois o par de primers utilizados possuem diferentes temperaturas de anelamento. Durante a ciclagem, a alta temperatura favorece o primer mais longo e específico, enquanto a temperatura baixa permite que ambos os primers funcionem com eficiência similar, favorecendo a amplificação da região alvo. Para que a assimetria seja garantida, a temperatura de anelamento ( $T_m$ ) dos primers específicos deve ser pelo menos 10°C maior que a dos primers AD e a temperatura de anelamento dos ciclos de alta estringência deve ser superior em 1 a 5°C em relação à  $T_m$  do primer específico (LIU & WHITTIER, 1995).

Após as ciclagens, basta analisar os amplicons em gel de eletroforese e sequenciar os fragmentos em seguida. Liu e Whittier sugerem que o produto da reação terciária da TAIL-PCR é adequado, inclusive, para o sequenciamento direto com os primers específicos, sem necessidade de clonagem em vetor plasmidial (LIU & WHITTIER, 1995).



**Figura 7.** Representação esquemática da TAIL-PCR. SP denota primer específico (segmentos pretos) e AD os inespecíficos (segmentos brancos). Adaptado de LIU & WHITTIER (1995).

### **Transformação de *Trichoderma harzianum* por *Agrobacterium tumefaciens***

Dada a importância deste fungo no contexto do controle biológico, não surpreende que existam outros trabalhos que já realizaram transformação mediada por *A. tumefaciens* visando o estudo funcional de genes. Alguns, inclusive, utilizando a mesma técnica com aplicações distintas. FAN et al. (2014), por exemplo, combinaram ATMT com o método de nocaute gênico por recombinação homóloga. Os autores inseriram flancos 5' e 3', com homologia aos genes *Thc6* e *Thg2*, nas extremidades do gene do marcador seletivo e entre as bordas esquerda e direita do T-DNA. Isto permitiu não só uma inserção única, mas também uma inserção sítio dirigida na região de interesse, além de aumentar a eficiência da transformação por favorecer o reparo homólogo no genoma do fungo (FAN et al., 2014).

No estudo em questão, FAN et al. (2014) obtiveram uma biblioteca de 450 transformantes, dos quais 6 apresentaram alterações relacionadas à indução de resistência do milho ao fungo fitopatogênico *Curvularia lunata*. Destes 6 mutantes, 4 apresentaram inserções do T-DNA em regiões não codificadoras, acompanhadas por deleções nas bordas do T-DNA. Os outros 2 alteraram as respostas de defesa do milho ao patógeno *C. lunata* modificando a expressão de genes relacionados à via dependente de ácido jasmônico (JA) (FAN et al., 2014). Em seguida, os autores investigaram um destes transformantes, por meio de superexpressão, complementação e silenciamento do gene *Thc6* (codificador de uma proteína de 327 aminoácidos até então sem função conhecida) que havia sido deletado por ATMT e comprovaram seu envolvimento na expressão de genes responsivos a JA no milho (FAN et al., 2015).

LIU et al. (2012) e YAO et al. (2016), em trabalhos já citados nesta dissertação no item “O fungo *Trichoderma harzianum*: aspectos gerais e mecanismos moleculares envolvidos no micoparasitismo e interação com a planta hospedeira”, também conseguiram associar genes às suas funções utilizando ATMT em *T. harzianum*.

YANG et al. (2010) superexpressaram uma superóxido dismutase (SOD) endógena em *T. harzianum*, por meio de transformação mediada por *Agrobacterium*. Os autores verificaram que a inserção ocorreu em cópia única, e que a capacidade de antagonismo contra *S. sclerotiorum* não foi alterada em

comparação com a cepa parental. Como esperado, verificou-se que o transformante apresentou maior tolerância à estresses abióticos, tais como elevada temperatura a alta salinidade, em comparação com a cepa parental. Em outro exemplo, Yang et al. (2011) expressaram um gene endógeno codificador de quitinase (ChiV) em *T. harzianum*. Os autores verificaram que a inserção do T-DNA contendo o gene de interesse ocorreu em cópia única e que o transformante teve significativo aumento da capacidade de inibição de *R. solani* em comparação com a cepa parental.

GAO & YANG (2004) inseriram o gene *Cry I A(b)* da bactéria *Bacillus thuringiensis* em *T. harzianum* por transformação mediada por *Agrobacterium*. Os autores comprovaram a inserção de uma única cópia do T-DNA no genoma do fungo, bem como a expressão do gene heterólogo. A capacidade antifúngica da cepa transformante não foi alterada. Além disso, verificou-se um aumento significativo da mortalidade de larvas do inseto alvo alimentadas com esporos do transformante, em comparação com a linhagem parental.

Os exemplos citados aqui demonstram as diversas aplicabilidades da estratégia de transformação por *Agrobacterium* para o fungo *T. harzianum*, sendo uma ferramenta útil para investigações sobre o genoma deste microrganismo, que, apesar de tão relevante no contexto do controle biológico de fungos fitopatógenos, ainda tão pouco caracterizado quanto à função de genes envolvidos em sua atuação antagonista, o que justifica o presente estudo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar genes de *Trichoderma harzianum* BRM27158 envolvidos no processo de controle biológico.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar uma metodologia de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para *T. harzianum* BRM27158;
- Obter, purificar e preservar uma biblioteca de agrotransformantes de *T. harzianum* BRM27158 resistentes à higromicina, visando à identificação de genes envolvidos no controle biológico;
- Caracterizar os transformantes quanto à capacidade de produção de proteases em comparação com a linhagem selvagem;
- Caracterizar os transformantes quanto à atividade antimicrobiana em comparação com a linhagem selvagem;
- Avaliar a estabilidade genética dos transformantes selecionados;
- Confirmar a transformação por meio de amplificação por PCR dos genes marcadores seletivos (*gfp* e *hph*);
- Identificar as regiões flanqueadoras do T-DNA por TAIL-PCR, clonagem, sequenciamento e análise do contexto genômico da região alterada nos transformantes selecionados.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Adaptação de transformação mediada por *A. tumefaciens* para o fungo *T. harzianum* BRM27158 e obtenção de uma biblioteca de transformantes

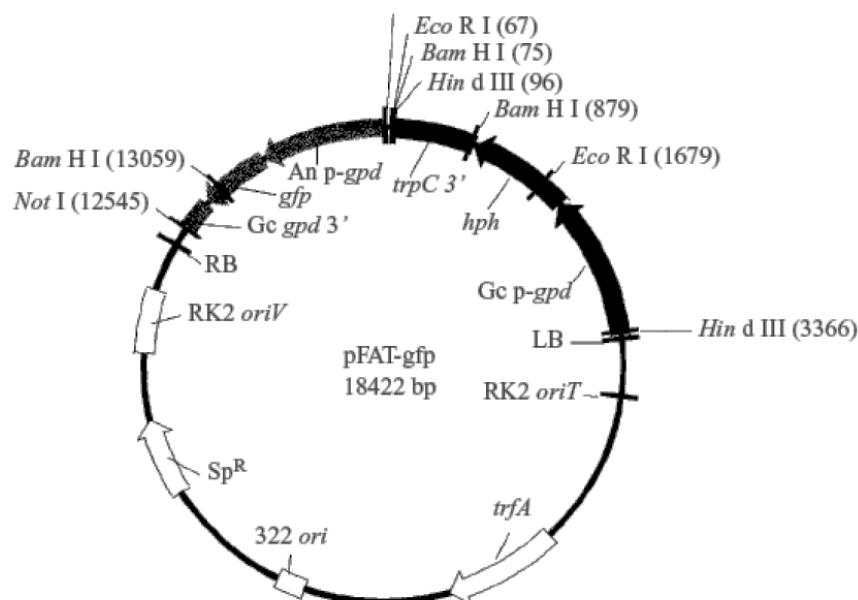
##### 3.1.1. Linhagens, vetores utilizados e condições de cultivo

O fungo *T. harzianum* BRM27158, também chamado de TR274 e 303-02, coletado de amostras de solo de Cerrado brasileiro pela Embrapa Arroz e Feijão (CNPAPF), encontra-se preservado em água deionizada na coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília (Brasília – DF).

O vetor binário utilizado (pFAT-GFP) foi cedido gentilmente pela Dra. Kim M. Plummer (CSIRO Plant Industry, Austrália) (FITZGERALD et al., 2003). Este plasmídeo contém, na região T-DNA, o gene marcador seletivo *hph*, que codifica a higromicina B fosfotransferase de *Escherichia coli* e que confere resistência à higromicina B (usado para seleção de transformantes do fungo de interesse). O promotor deste gene é o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd*) de *Glomerella cingulata*, *Gc gpd 3'*, e o terminador é o *trpC 3'* de *Aspergillus nidulans*. No T-DNA o vetor também contém o gene repórter *gfp*, que codifica a proteína verde fluorescente GFP (pGreen Lantern, Life Technologies). Seu promotor é o An *p-gpd* (de *A. nidulans*) e o terminador é o *Gc gpd 3'* (de *G. cingulata*). O plasmídeo contém um gene de resistência à espectinomicina ( $Sp^R$ ) (para seleção de transformantes de *E. coli* e de *A. tumefaciens*), uma origem de replicação RK2 *oriV*, uma origem de transferência RK2 *oriT*, uma origem de replicação 322 *ori* e um gene de replicação *trfA* (FITZGERALD et al., 2003).

Este vetor foi previamente transformado em células de *E. coli* DH5 $\alpha$  e de *A. tumefaciens* EHA105 por FÁVARO (2009). As células de *E. coli* DH5 $\alpha$  e de *A. tumefaciens* EHA105 contendo o vetor binário pFAT-GFP encontram-se preservadas por ultracongelamento no Laboratório de Genética e Biotecnologia da Embrapa Agroenergia (Brasília – DF). Para cultivo e manutenção de *A. tumefaciens* EHA105/pFAT-GFP, utilizou-se o meio de cultura YEP (10 g de extrato de levedura; 10 g de peptona bacteriológica; 5 g de NaCl; 1000 mL de água

destilada, pH 7,0) suplementado com espectinomicina e rifampicina (100 µg/mL). As células de *E. coli* DH5α utilizadas para manutenção do vetor pFAT-GFP foram cultivadas e mantidas em meio de cultura Luria-Bertani suplementado com espectinomicina (100 µg/mL).



**Figura 8.** Mapa do vetor pFAT-GFP (FITZGERALD et al., 2003).

### 3.1.2. Teste de sensibilidade à higromicina B

Antes de iniciar a transformação do fungo foi realizada uma análise de sensibilidade da cepa BRM27158 à higromicina B, para verificar se esse antibiótico poderia ser utilizado como agente seletivo. Para isso foi realizada a análise de crescimento do fungo na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações de higromicina B (5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 e 400 µg/mL). Os testes foram realizados em triplicata em placas de Petri (60 x 15 mm) contendo meio de cultura sólido Batata Dextrose Agar (BDA, Sigma-Aldrich). O inóculo foi realizado com discos de 8 mm de diâmetro contendo micélio proveniente de uma cultura previamente crescida por 7 dias à 28°C em BDA. O fungo foi incubado em câmara de crescimento por até 15 dias à 28°C na ausência de luz. A concentração de higromicina B que inibiu completamente o crescimento da colônia em comparação com o controle foi escolhida para os experimentos de transformação.



### 3.1.3. Transformação de *T. harzianum* BRM27158 mediada por *A. tumefaciens*

A linhagem *T. harzianum* BRM27158 foi cultivada em BDA a partir do estoque preservado em água destilada esterilizada (Castellani). O fungo foi cultivado por 5 dias até a esporulação (25°C com fotoperíodo). Após este período, os conídios foram coletados em água destilada esterilizada e uma suspensão de conídios foi preparada para utilização na transformação.

A transformação por *A. tumefaciens* foi realizada conforme FÁVARO (2009), com modificações. Células de *A. tumefaciens* EHA105 contendo o vetor pFAT-GFP (FITZGERALD et al., 2003) foram crescidas em meio de cultura YEP contendo espectinomicina e rifampicina (100 µg/mL), a 28°C, 200 rpm, por 16 horas. Esta cultura foi diluída para uma densidade ótica de 0,15 (660 nm) em meio de indução líquido (10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,5 mM NaCl; 2 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,7 mM CaCl<sub>2</sub>; 9 mM FeSO<sub>4</sub>; 4 mM NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>; 10 mM glicose; 0,5% glicerol; 40 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid, pH 5,3) suplementado com acetoseringona (200 mM) e incubada até atingir densidade ótica de 0,6 (600 nm).

Esta suspensão de células bacterianas foi misturada (1:1) com a suspensão de conídios de *T. harzianum* BRM27158 (10<sup>6</sup> conídios/mL). Aliquotas de 200 µL desta mistura foram espalhadas com alça de Drigalski sobre discos de membrana de nylon (0,45 µm, Amersham Hybond N+, GE Healthcare) dispostos sobre a superfície de placas de Petri contendo meio de indução sólido (igual ao meio de indução líquido, porém contendo 10 mM de glicose, e 0,1% de Triton X-100, para restringir o crescimento das colônias) suplementado com 200 mM de acetoseringona. Placas de co-cultivo sem acetoseringona foram utilizadas como controle.

Após o período de co-cultivo a 25°C por 48h na ausência de luz, as membranas foram transferidas com pinça esterilizada para meio seletivo BDA contendo higromicina B (200 µg/mL) e cefoxitina sódica (200 µg/mL). As placas foram incubadas por 7-20 dias à 28°C, até o surgimento de colônias resistentes à higromicina B. O número de colônias resistentes foi contado e em seguida os transformantes foram repicados para novo meio de cultura seletivo (contendo higromicina B, 200 µg/mL, e cefoxitina sódica, 200 µg/mL). A preservação de cada transformante foi realizada pelo método Castellani (duplicata). Este estoque

foi denominado estoque original. Um total de 168 transformantes foi preservado na “Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias” da Embrapa Agroenergia.

#### *3.1.4. Purificação e preservação de transformantes de *T. harzianum* BRM27158*

Os transformantes obtidos foram transferidos do estoque original para meio de cultura seletivo com auxílio de palitos esterilizados, e então cultivados por 5 dias a 28°C. Após o crescimento, suspensões de conídios foram preparadas em solução Tween 80 0,1% e submetidas à diluição seriada seguida de plaqueamento em BDA contendo Triton X-100 e higromicina B (200 µg/mL), para obtenção de culturas monospóricas ou purificadas. Uma vez purificados, os transformantes foram preservados em duplicata em microtubos de 2,0 mL contendo água destilada esterilizada (método Castellani). Este estoque foi denominado estoque purificado. Essa biblioteca de transformantes contendo 168 linhagens purificadas encontra-se preservada na “Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias” da Embrapa Agroenergia.

### **3.2. Caracterização da biblioteca de transformantes de *T. harzianum* BRM27158**

Esta etapa foi realizada em colaboração com o Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília, juntamente com a Dra. Eliane F. Noronha e sua aluna de iniciação científica, Débora C. Cunha.

#### *3.2.1. Caracterização de transformantes de *T. harzianum* BRM27158 quanto à capacidade de produção de proteases e inibição de *F. oxysporum**

A biblioteca contendo 168 transformantes de *T. harzianum* BRM27158 (estoque original) foi triada em três experimentos visando à seleção de linhagens com fenótipo alterado em comparação com a cepa parental.

O primeiro experimento consistiu na avaliação do crescimento micelial em meio mínimo sólido (meio TLE) (RODRIGUES et al, 2014) e caseína como única

fonte de carbono. Para tanto, os 168 transformantes do estoque original foram cultivados em meio Batata Dextrose Agar (BDA) à temperatura ambiente e após o crescimento foram inoculados no meio com caseína. Os transformantes que não apresentaram crescimento ou que cresceram com lentidão em comparação à linhagem selvagem foram selecionados e considerados protease negativos.

No segundo teste, foi avaliada a inibição do crescimento do patógeno *F. oxysporum*. Duas estratégias foram avaliadas: a) ensaio de produção de metabólitos secretados por *T. harzianum* crescido sobre membranas em meio sólido seguido de inóculo do patógeno nas mesmas placas; e b) ensaio de confronto direto (antagonismo).

Para a análise de inibição por metabólitos secretados, os transformantes e o parental foram inoculados em meio BDA coberto por uma membrana de celofane. Após crescimento à temperatura ambiente, a membrana foi retirada e o patógeno foi inoculado nas mesmas placas, agora contendo os metabólitos secundários secretados por BRM27158 e seus transformantes. Após 7 dias de crescimento à temperatura ambiente, verificou-se se houve ou não o crescimento do patógeno. Em caso negativo, considerou-se que houve inibição por metabólitos secretados.

Na avaliação da inibição do crescimento do patógeno por confronto direto, o patógeno e os transformantes foram inoculados ao mesmo tempo em extremidades opostas das placas contendo meio BDA, tendo o confronto entre o selvagem e o patógeno como controle. Após 7 dias de crescimento à temperatura ambiente, verificou-se se os transformantes foram capazes de crescer sobre o micélio do fitopatógeno tal como o parental.

Por último, foi realizado um teste de dosagem de atividade de proteases, no qual os extratos enzimáticos, obtidos por filtração após cultivo em meio TLE líquido, de cada transformante e da linhagem parental, foram avaliados quanto à atividade proteolítica contra azocaseína a 0,5% (m/v), conforme protocolo de HUTADILOK-TOWATANA et al (1999). A fase sólida obtida após a filtração, composta pelo micélio fúngico, teve sua massa medida após completa secagem em estufa a 60°C, constituindo os dados da massa seca. Para o cálculo da atividade, uma unidade de atividade proteolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar em 0,1 a unidade de absorvância a 440 nm por minuto de reação. Os valores da atividade enzimática foram

normalizados com os valores de massa seca, de modo que a unidade final foi de U por mL de extrato por g de massa seca (U/mL/g).

Após essas três análises, alguns transformantes foram selecionados por apresentarem diferenças fisiológicas em comparação com a cepa parental. Esses transformantes foram submetidos à uma segunda etapa de testes fisiológicos e também à caracterização molecular, conforme descrito a seguir.

### **3.3. Caracterização fisiológica e molecular de transformantes selecionados de *T. harzianum* BRM27158**

#### *3.3.1. Testes de estabilidade mitótica dos transformantes selecionados*

Dez transformantes selecionados anteriormente pela equipe do projeto ao qual este trabalho está vinculado (considerados protease negativos) foram submetidos à análise de estabilidade mitótica. Para tanto, os transformantes selecionados foram repicados a partir do estoque monospórico purificado para meio de cultura BDA sem higromicina B (meio denominado não seletivo). As linhagens foram incubadas à 25°C durante 4 dias, sendo este cultivo denominado como primeira geração. A cada quatro dias, as colônias foram transferidas para novo meio não seletivo sob as mesmas condições até a 5ª geração. Para os repiques sucessivos, foi coletada uma pequena porção de micélio a partir da borda da colônia, considerada a região mais jovem e de crescimento rápido da colônia fúngica, com o auxílio de palitos de madeira esterilizados. O 6ª repique foi inoculado em meio de cultura BDA acrescido de higromicina B na concentração de 200 µg/mL (meio seletivo).

Os transformantes que permaneceram resistentes ao fungicida em comparação à linhagem parental após os sucessivos repiques foram considerados geneticamente estáveis. Esses transformantes foram então preservados por ultracongelamento em glicerol 30%, sendo que esse estoque foi denominado estoque purificado geneticamente estável. Esses transformantes foram então submetidos à diferentes tipos de caracterização fisiológica e molecular, conforme descrito à seguir.

### 3.3.2. Análise dos transformantes selecionados de *T. harzianum* BRM27158 por microscopia de fluorescência

Para a confirmação da expressão da proteína verde fluorescente (GFP) pelos transformantes, lamínulas foram colocadas em placas de BDA, onde os fungos selecionados e o selvagem foram inoculados em seguida. As lâminas foram montadas e observadas sob microscópio de fluorescência da marca Zeiss e modelo Axio Imager Z2, onde foram excitadas com laser de argônio (488 nm).

### 3.3.3. Caracterização de transformantes selecionados de *T. harzianum* BRM27158 quanto à capacidade de produção de proteases

Os dez transformantes geneticamente estáveis selecionados foram submetidos à diferentes tipos de testes fenotípicos para avaliar mais detalhadamente sua capacidade de produzir proteases, em comparação com a cepa parental.

Inicialmente, os transformantes e a linhagem parental foram inoculados em placas de Petri (90 x 15mm) contendo 20 mL de meio mínimo sólido de sais (PONTECORVO et al., 1953) sem glicose e com um dos seguintes substratos: caseína a 1% (m/v), ou leite desnatado pasteurizado a 10% (v/v) (marca Itambé), ou gelatina a 1% (m/v) (Sigma-Aldrich), conforme descrito na tabela 4. Ao meio de cultura foi acrescido o reagente Triton X-100 a 1% (v/v) no intuito de restringir o crescimento dos fungos e facilitar a visualização de halo de degradação enzimática.

**Tabela 4.** Meio mínimo de sais conforme PONTECORVO et al. (1953), sem glicose.

Reagentes	Concentração (g/L)
NaNO <sub>3</sub>	6,000
KCl	0,500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,500
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,500
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,001
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,001
Ágar bacteriológico	15,000

O inóculo foi feito a partir de um disco de micélio previamente crescido em meio BDA, cortado com a extremidade larga de uma ponteira P1000, com micélio crescido durante 5 dias a 28°C. Uma vez inoculados nos meios com diferentes substratos, os fungos foram incubados nas mesmas condições durante 7 dias e o crescimento das colônias foi medido com paquímetro digital sendo tomadas duas medidas perpendiculares de seu diâmetro. Nos casos em que foi observado halo de degradação, os mesmos foram medidos da mesma forma que suas respectivas colônias e os índices enzimáticos (razão entre as médias dos diâmetros dos halos e a média dos diâmetros das respectivas colônias) foram calculados. O desenho experimental foi do tipo inteiramente casualizado com três repetições. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio das ferramentas implementadas no software Genes®. Os dados foram submetidos à análise de variância seguida de teste de comparação de médias Scott-Knott, ao nível de significância de 0,05.

Os transformantes e a linhagem selvagem também foram avaliados quanto à produção de proteases em meio líquido em frascos agitados. Para tanto, foram realizados dois experimentos diferentes. As linhagens foram repicadas do estoque e cultivadas em meio BDA durante 4 dias a 25°C. Em seguida, os fungos foram inoculados em meio de cultura TLE (RODRIGUES et al, 2014) (tabela 5), com caseína a 1,0% (m/v) como principal fonte de carbono.

**Tabela 5.** Meio de cultura TLE, conforme Rodrigues et al. (2014) com caseína.

<u>Reagentes</u>	<u>Concentração (g/L)</u>
Peptona bacteriológica	1,000
Ureia	0,300
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,000
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,400
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,300
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,200
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,001
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,001
Caseína	10,000

O inóculo foi feito com 5 discos de micélio com 8 mm de diâmetro a partir

das placas cultivadas anteriormente, cortados com a extremidade larga de ponteiras p1000. O cultivo foi feito em triplicata em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL do meio TLE, incubados em shaker a 28°C e 120 rpm durante 5 dias. Após este período, o cultivo foi transferido para tubos Falcon de 50 mL estéreis e previamente pesados. O micélio foi separado da fase líquida, referida daqui em diante como extrato enzimático, por meio de centrifugação a 3000 g a 4°C durante 10 minutos.

O ensaio enzimático foi realizado conforme HUTADILOK-TOWATANA, 1999, com adaptações. O tampão utilizado foi o Tris-HCl a 0,1 M e pH 8,0, o substrato utilizado foi uma solução de azocaseína (Sigma) a 0,5%, dissolvida no tampão Tris-HCl. Em placas de PCR de 96 poços, 75 µL dos extratos enzimáticos foram incubados com 125 µL do substrato a 40°C durante 20 minutos em termociclador. Em seguida, O conteúdo das placas foi passado para uma placa de 96 poços do tipo *deep-well*, já 600 µL de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10,0% (m/v), no intuito de paralisar a reação. As placas foram centrifugadas a 3000 g a 4°C durante 10 minutos, separando a azocaseína do restante da solução. O volume de 120 µL do sobrenadante foi transferido para placas de ELISA, onde foram adicionados 140 µL de NaOH a 1M às placas e, com o auxílio de uma micropipeta, 1 mL desta solução foi coletado e passado a uma cubeta para leitura em espectrofotômetro. A leitura foi feita a 440nm.

Para descontar a absorbância do extrato enzimático, este foi incubado com 125 µL de tampão. Para o desconto do substrato, este foi incubado com 75 µL de tampão. Finalmente, para o desconto do tampão, este foi utilizado como branco da leitura no espectrofotômetro.

O micélio remanescente da separação por centrifugação feita anteriormente foi colocado em uma estufa a 60°C para sua completa desidratação e determinação do peso seco (subtração da massa do tubo pela massa do tubo contendo o micélio seco).

A dosagem de proteínas solúveis dos extratos enzimáticos foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) (Sigma-Aldrich), conforme instruções do fabricante, utilizando soro de albumina bovina (BSA) como padrão. A leitura foi feita a 563 nm em espectrofotômetro após 30 minutos de incubação a 37°C.

Para o cálculo da unidade de atividade enzimática, U, convencionou-se que

cada aumento de 0,1 em absorbância, nas condições de leitura supracitadas para o ensaio proteolítico, equivale a 1 U. A atividade enzimática foi medida em U (unidade) por massa seca em gramas de micélio total do cultivo por mililitro de extrato enzimático utilizado no ensaio (U/g/mL). A atividade específica foi calculada como a atividade enzimática por g de proteína no ensaio.

Foi realizado ainda um segundo experimento, desta vez, com o cultivo feito em meio TLE com glicose a 0,3 % (m/v), nas mesmas condições descritas anteriormente, com a diferença de que o extrato enzimático e o substrato foram incubados em microtubos de 1,5 mL, num termoagitador. Os 600 µL de TCA foram adicionados diretamente aos microtubos e estes foram submetidos a centrifugação a 3000g durante 10 min a 4°C. Em seguida, 1mL do sobrenadante foi transferido para cubetas de leitura já contendo 700 µL de NaOH a 1M e a leitura a 440 nm foi tomada em espectrofotômetro. Para determinação dos descontos do extrato e do substrato, os extratos enzimáticos foram inativados com TCA antes da incubação com o substrato. Para o desconto do tampão, este foi utilizado como branco da leitura no espectrofotômetro.

#### *3.3.4. Caracterização de transformantes selecionados de *T. harzianum* BRM27158 quanto à atividade antimicrobiana em comparação com a linhagem parental*

Os dez transformantes geneticamente estáveis selecionados foram submetidos à diferentes tipos de testes de atividade antimicrobiana. Inicialmente, os transformantes e a linhagem selvagem foram inoculados em meio BDA coberto por um disco de papel filtro, no qual cresceram durante 5 dias a 28°C. Em seguida, o disco de papel filtro foi retirado com pinça estéril e o patógeno *S. sclerotiorum* foi inoculado nos meios contendo os metabólitos secretados pela linhagem selvagem BRM27158 e seus transformantes. O inóculo foi feito a partir de um disco de meio BDA, cortado com ponteira P1000, com micélio crescido durante 5 dias a 25°C. O crescimento do patógeno foi medido com paquímetro digital sendo tomadas duas medidas perpendiculares do diâmetro das colônias. A porcentagem de inibição foi calculada em comparação com o fungo patogênico crescido no meio BDA sem crescimento prévio de *T. harzianum* selvagem ou seus transformantes. O fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum* foi gentilmente cedido



pelo Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília.

Também foi avaliada a atividade antimicrobiana de extratos da linhagem parental e de seus transformantes obtidos a partir do cultivo em três diferentes meios de cultura líquidos. Um desses extratos foi o mesmo obtido a partir do cultivo para dosagem de protease (meio de cultura TLE contendo caseína e glicose, descrito na seção 3.3.2). Neste caso, a análise foi feita em triplicata.

Os outros dois extratos avaliados quanto à atividade antimicrobiana foram obtidos a partir do cultivo no meio de cultura Malt Extract Broth - MEB (Sigma-Aldrich) e no meio de cultura Potato Dextrose Broth - PDB (Sigma-Aldrich). Para tanto, 5 discos de micélio da linhagem parental e de seus transformantes foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de cada meio de cultura (MEB ou PDB). Os frascos foram incubados à 25°C em cultivo estático na ausência de luz por 7 dias. Após esse período, o conteúdo dos frascos foi coletado e centrifugado por duas vezes para separação do micélio. Este extrato foi mantido em geladeira por no máximo 24 horas, até o momento do uso nos ensaios. Os cultivos nos meios MEB e PDB foram realizados em duplicata.

A atividade antimicrobiana dos extratos provenientes dos cultivos nos meios TLE, MEB e PDB foi avaliada contra os seguintes microrganismos: a) cepa de bactéria de referência *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach ATCC 25923 (gram positiva); b) cepa de bactéria de referência *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula ATCC 27853 (gram negativa); e c) fungo fitopatogênico *F. oxysporum*. As bactérias encontram-se preservadas no Laboratório de Genética e Biotecnologia da Embrapa Agroenergia. O fungo fitopatogênico foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília.

A atividade antibacteriana dos extratos foi avaliada conforme descrito a seguir. As bactérias patogênicas foram repicadas do estoque em placas de Petri contendo o meio de cultura Tryptic Soy Agar (Sigma-Aldrich). Após crescimento por 24 horas à 37°C, uma colônia isolada foi coletada e inoculada em 10 mL de meio de cultura líquido Mueller-Hinton (Difco). A cultura foi incubada overnight à 30°C e 180 rpm. Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços de fundo chato, em volume final de 200 µL, contendo: 20 µL da cultura bacteriana crescida *overnight* (ou seja, 10%), 80 µL de cada extrato fúngico (ou seja, 40% do extrato TLE, MEB ou PDB), e 100 µL de meio de cultura Mueller-Hinton. As microplacas

foram incubadas à 37°C sem agitação e as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro (600 nm) nos tempos zero, 6 h e 24 h de crescimento. Os controles consistiram na utilização dos meios de cultura TLE, MEB e PDB sem o prévio crescimento fúngico.. Os dados foram plotados em gráficos incluindo a média e o desvio padrão das leituras de absorvância.

A atividade antifúngica dos extratos da linhagem parental e dos transformantes foi determinada conforme descrito a seguir. O fungo fitopatogênico *F. oxysporum* foi cultivado por 7 dias à 25°C em meio de cultura BDA (Sigma-Aldrich). Em seguida, discos de micélio foram coletados e transferidos para o centro de placas de Petri (60 x 15 mm) contendo 6 mL de meio de cultura BDA acrescido de 4 mL de extrato fúngico TLE, MEB ou PDB (ou seja, 10 mL de volume final em cada placa de Petri, sendo que os extratos foram testados na concentração de 40%). As placas foram incubadas à 25°C por 4 dias na ausência de luz. Após esse período, o diâmetro de crescimento do fungo patogênico foi medido com paquímetro digital e a porcentagem de redução do crescimento foi calculada. Os controles consistiram na adição dos meios de cultura TLE, MEB ou PDB sem o prévio crescimento dos fungos.

### 3.3.5. Confirmação da transformação por PCR

O DNA genômico das linhagens selecionadas foi obtido por extração com fenol-clorofórmio conforme descrito por RAEDER & BRODA (1985). Para a confirmação da inserção do gene *gfp*, os primers glGFP5 (5'GCCGGAATTCATGAGCAAGGGCGAGGAACTGTTC3') e glGFP3 (5'GCCGAGCTCAGATCTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCC3') (FITZGERALD et al., 2003) foram utilizados. Para a montagem da reação, com 25 µL de volume final, foram utilizados o tampão Colorless GoTaq® Flexi Reaction Buffer pH 8,5 (Promega) a 1x; a solução de MgCl<sub>2</sub> (Promega) a 3,7 mM; dNTP a 0,2 mM; primers (forward e reverso) a 0,2 µM; GoTaq® MDx Hot Start Polymerase (Promega), 1U; 10 ng do DNA genômico do parental ou dos transformantes; e água ultrapura completando o volume final. As condições de amplificação foram: 94°C de temperatura de desnaturação inicial durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e

extensão a 72°C também durante 1 minuto, e extensão final a 72°C durante 7 minutos. Para a confirmação da inserção do gene *hph*, os primers *hph1* (5'TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT3') e *hph2* (5'CGCGTCTGCTGCTCCATACAAG3') (MALONEK & MEINHARDT, 2001) foram utilizados. A montagem das reações e as condições da PCR foram idênticas às utilizadas na amplificação do gene *gfp*. Os produtos de PCR, foram submetidos a eletroforese em gel de agarose. Em seguida, o gel foi observado sob luz U.V. em fotodocumentador e a imagem foi registrada.

### 3.3.6. Amplificação por TAIL-PCR das regiões que flanqueiam o T-DNA

Para a TAIL-PCR, os primers utilizados encontram-se listados na tabela 6. Os primers com prefixo AD são arbitrários degenerados e os de prefixo LB são específicos para a borda esquerda, região de 24 pares de bases repetidas do T-DNA.

**Tabela 6.** Primers utilizados nas reações de TAIL-PCR.

Primers	Sequência (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)	GC(%)
AD2_Ses <sup>1</sup>	TGWDNAGSANCASAGA	48,99	37,5-50,0
AD3_Ses <sup>1</sup>	AGWGNAGWANCAWAGG	46,43	37,5-50,0
AD5_Par <sup>2</sup>	WCAGNTGWTNGTNCTG	50,27	37,5-56,3
AD11_Par <sup>2</sup>	NCASGAWAGNCSWCAA	51,55	43,8-56,3
AD6_Ama <sup>3</sup>	WGCNAGTNAGWANAAG	44,00	26,7-46,7
AD7_Ama <sup>3</sup>	AWGCANGNCWGANATA	47,71	31,3-50,0
AD1_Liu <sup>4</sup>	NTCGASTWTSWGTT	39,90	40,0-46,7
AD2_Liu <sup>4</sup>	NGTCGASWGANAWGAA	43,86	37,5-50,0
AD3_Liu <sup>4</sup>	WGTGNAGWANCANAGA	43,86	31,3-50,0
AD4_Liu <sup>4</sup>	TCSTICGNACITWGGA	52,83	43,8-62,5
AD2_Tsu <sup>5</sup>	STTGNTASTNCTNTGC	50,27	37,5-56,3
LB-1 <sup>6</sup>	GTCAGCTCCGGCACCTTATCCTTG	65,30	58,3
LB-2 <sup>6</sup>	CCTCGTTACATCAGCTCGCAGCTAC	67,30	60,0
LB-3 <sup>6</sup>	CGTCCGAATGTGTTATTAAGTTGTC	61,40	42,3

\* Números de 1 a 6 correspondem, respectivamente, às referências: SESSIONS et al (2002) PARINOV et al (1999), MEINKE et al (2009), LIU et al (1995), TSUGEKI et al (1996), FÁVARO (2009).

#### Reação primária:

Para a reação primária, as amostras de DNA foram diluídas, com base nos valores de concentração em ng/μL medidos anteriormente em espectrofotômetro Nanodrop para 20 ng/μL em água ultrapura esterilizada. A montagem das reações de PCR para 11 amostras (10 fungos e 1 controle sem DNA) foi feita conforme descrito nas tabelas 7 e 8:

**Tabela 7.** Reagentes utilizados na reação **primária** da TAIL-PCR.

Reagentes	Concentração no estoque	Concentração na reação	Volume para 1 reação (µl)
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	-	Completar para o volume total
Tampão	5 X	1 X	4,00
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM	1,60
dNTP	2,5 mM	200 µM	1,60
Primer LB-1 *1	100µM	0,2 µM	0,04
Primer AD *2	100 µM	variável	variável
Taq polimerase	5 U/µl	0,8 U	0,16
DNA genômico	-	20 ng	1,00
Total	-	-	20,00

\*1 - Nas reações para os primers AD6 e AD7\_Ama, a concentração na reação do primer específico LB-1 foi de 0,6 µM.

\*2 - Consultar a concentração de cada primer degenerado na tabela 8.

**Tabela 8.** Concentração dos primers degenerados utilizados na reação **primária** da TAIL-PCR.

Primer	Concentração na reação	Volume para 1 reação (µl)
AD2_Ses	3,0 µM	0,60
AD3_Ses	3,0 µM	0,60
AD5_Par	10,0 µM	2,00
AD11_Par	10,0 µM	2,00
AD6_Ama	1,3 µM	0,26
AD7_Ama	1,3 µM	0,26
AD1_Liu	4,0 µM	0,80
AD2_Liu	3,0 µM	0,60
AD3_Liu	2,0 µM	0,40
AD4_Liu	2,5 µM	0,50
AD2_Tsu	4,0 µM	0,80

Para a montagem da reação, foi feita uma solução mix contendo a água, o tampão Colorless GoTaq® Flexi Reaction Buffer pH 8,5 (Promega), o cloreto de magnésio (Promega), o dNTP, os primers específico e degenerado e a Taq polimerase (GoTaq® MDx Hot Start Polymerase - Promega) nas concentrações especificadas na tabela 7. Todos os reagentes foram mantidos no gelo durante o procedimento. Em placas de PCR de 96 poços, foram distribuídos 1 µL do DNA diluído a 20 ng/µL de cada transformante e 1 µL de água ultrapura no poço reservado ao controle negativo (branco) da reação. Em seguida, foram distribuídos 19 µL da solução mix em cada um dos poços, totalizando os 20 µL de reação. As placas foram levadas ao termociclador (Applied Biosystems, Veriti), onde a PCR ocorreu nas condições citadas na tabela 9.

**Tabela 9.** Ciclagem da reação TAIL-PCR **primária** (MULLINS et al, 2001).

Etapa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação inicial	1	92	2 min
		95	1 min
Desnaturação	5	94	30 s
Anelamento		66	1 min
Elongação		72	2 min
Desnaturação	1	94	30 s
Anelamento		30	3 min
Elongação		72	3 min
Elongação		72	2 min
Desnaturação	10	94	5 s
Anelamento		44	1 min
Elongação		72	2 min
Desnaturação	15	94	5 s
Anelamento		66	1 min
Elongação		72	2 min
Desnaturação	15	94	5 s
Anelamento		66	1 min
Elongação		72	2 min
Desnaturação	15	94	5 s
Anelamento		44	1 min
Elongação		72	2 min
Elongação final	1	72	5 min

*Reação secundária:*

Para a reação secundária, os produtos da reação primária foram diluídos 50 vezes (1 µL do produto de PCR em 49 µL de água ultrapura). A montagem das reações de PCR para 11 amostras (10 fungos e 1 controle sem DNA) foi feita conforme resumido nas tabelas 10 e 11.

**Tabela 10.** Reagentes utilizados na reação **secundária** da TAIL-PCR.

Reagentes	Concentração no estoque	Concentração na reação	Volume para 1 reação (µl)
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	-	Completar para o volume total
Tampão	5 X	1 X	4,00
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM	1,60
dNTP	2,5 mM	200 µM	1,60
Primer LB-2 * <sup>1</sup>	100µM	0,2 µM	0,04
Primer AD * <sup>2</sup>	100 µM	variável	variável
Taq polimerase	5 U/µl	0,6 U	0,12
Produto da reação <b>primária</b> diluído	-	-	1,00
Total			20,00

\*<sup>1</sup> - Nas reações para os primers AD6 e AD7\_Ama, a concentração na reação do primer específico LB-2 foi de 0,6 µM.

\*<sup>2</sup> - Consultar a concentração de cada primer degenerado na tabela 11.

**Tabela 11.** Concentração dos primers degenerados utilizados na reação **secundária** da TAIL-PCR.

Primer	Concentração na reação	Volume para 1 reação (µl)
AD2_Ses	1,8 µM	0,36
AD3_Ses	1,8 µM	0,36
AD5_Par	10,0 µM	2,00
AD11_Par	10,0 µM	2,00
AD6_Ama	1,3 µM	0,26
AD6_Ama	1,3 µM	0,26
AD1_Liu	2,0 µM	0,40
AD2_Liu	2,0 µM	0,40
AD3_Liu	1,5 µM	0,30
AD4_Liu	1,5 µM	0,30
AD2_Tsu	2,0 µM	0,40

Novamente, foi feita uma solução mix contendo a água, o tampão, o cloreto de magnésio, o dNTP, os primers específico e degenerado e a Taq polimerase. Em placas de PCR de 96 poços, foram distribuídos 1 µL do produto da PCR primária diluído 50 vezes de cada transformante e 1 µL de água ultrapura no poço reservado ao controle negativo (branco) da reação. Em seguida, foram distribuídos 19 µL da solução mix em cada um dos poços, totalizando os 20 µL de reação. As placas foram levadas ao termociclador onde a PCR ocorreu nas condições citadas na tabela 12.

**Tabela 12.** Ciclagem da reação TAIL-PCR **secundária** (MULLINS et al, 2001).

Etapa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação		94	10 s
Anelamento	15	66	1 min
Elongação		72	2 min
Desnaturação		94	10 s
Anelamento	15	66	1 min
Elongação		72	2 min
Desnaturação		94	10 s
Anelamento	15	44	1 min
Elongação		72	2 min
Elongação final	1	72	5 min

*Reação terciária:*

Para a reação terciária, os produtos da reação secundária foram diluídos 10 vezes (1 µL do produto de PCR em 9 µL de água ultrapura). A montagem das

reações de PCR para 11 amostras (10 fungos e 1 controle sem DNA) foi feita conforme as tabelas 13 e 14.

**Tabela 13.** Reagentes utilizados na reação **terciária** da TAIL-PCR.

Reagentes	Concentração no estoque	Concentração na reação	Volume para 1 reação (µl)
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	-	Completar para o volume total
Tampão	5 X	1 X	10,00
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM	4,00
dNTP	2,5 mM	200 µM	4,00
Primer LB-3 * <sup>1</sup>	100µM	0,2 µM	0,10
Primer AD * <sup>2</sup>	100 µM	Variável	Variável
Taq	5 U/µl	0,6 U	0,12
Produto da reação <b>secundária</b> diluído	-	-	1,00
Total	-	-	50,00

\*<sup>1</sup> - Nas reações para os primers AD6 e AD7\_Amad, a concentração na reação do primer específico LB-3 foi de 0,6 µM.

\*<sup>2</sup> - Consultar a concentração de cada primer degenerado na tabela 14.

**Tabela 14.** Concentração dos primers degenerados utilizados na reação **terciária** da TAIL-PCR.

Primer	Concentração na reação	Volume para 1 reação (µl)
AD2_Ses	1,8 µM	0,90
AD3_Ses	1,8 µM	0,90
AD5_Par	10,0 µM	5,00
AD11_Par	10,0 µM	5,00
AD6_Ama	0,6 µM	0,30
AD6_Ama	0,6 µM	0,30
AD1_Liu	2,0 µM	1,00
AD2_Liu	2,0 µM	1,00
AD3_Liu	1,5 µM	0,75
AD4_Liu	1,5 µM	0,75
AD2_Tsu	2,0 µM	1,00

A solução mix foi preparada contendo a água, o tampão, o cloreto de magnésio, o dNTP, os primers específico e degenerado e a Taq polimerase. Em placas de PCR de 96 poços, foram distribuídos 1 µL do produto da PCR secundária diluído 10 vezes de cada transformante e 1 µL de água ultrapura no poço reservado ao controle negativo (branco) da reação. Em seguida, foram distribuídos 49 µL da solução mix em cada um dos poços, totalizando os 50 µL de reação. As placas foram levadas ao termociclador onde a PCR ocorreu nas condições citadas na tabela 15.

**Tabela 15.** Ciclagem da reação TAIL-PCR terciária (MULLINS et al, 2001).

Etapa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação inicial	1	94	10 s
Desnaturação		94	15 s
Anelamento	30	42	15 s
Elongação		72	2 min
Elongação final	1	72	5 min

### 3.3.7. Seleção de fragmentos da TAIL-PCR, clonagem, sequenciamento e análise das regiões que flanqueiam o T-DNA dos transformantes selecionados

Após as três etapas da TAIL-PCR, os produtos das reações secundária e terciária de cada combinação dos 11 primers degenerados obtidos para os 10 transformantes foram aplicados em gel de agarose a 1,2 % (m/v) com voltagem de 100 V e corrente 120 A. O marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder GeneRuler™, da Thermo Scientific® também foi aplicado no intuito de estimar o tamanho das bandas observadas. O gel foi observado em um transiluminador e as imagens foram registradas no fotodocumentador (Loccus biotecnologia/L-PIX CHEMI). Com base nestas imagens, foram selecionados os fragmentos com tamanhos maiores, os mais isolados e os de maior intensidade para seguirem para o sequenciamento.

Uma vez selecionados os fragmentos, a TAIL-PCR foi repetida com o conjunto de primer específico e mutante que os originou, com o objetivo de produzir o fragmento em maior quantidade. Os produtos desta nova PCR foram aplicados novamente em gel de agarose a 1,2% (m/v) com voltagem de 100 V e corrente 120 A, utilizando-se o mesmo marcador. O gel foi observado em transluminador e, após a comparação com a banda original, as bandas correspondentes foram cortadas do gel e purificadas com o kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen) conforme o manual do fabricante.

Após a purificação, os fragmentos foram ligados em vetor de clonagem e transformados em células de *E. coli* TOP10 com o kit TOPO® TA Cloning® (Thermo Scientific) conforme o manual do fabricante. A extração plasmidial foi feita com o kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen) também conforme o manual do fabricante. De posse dos fragmentos clonados e purificados, estes foram enviados para sequenciamento pela empresa Eurofins.



Com o auxílio do software Geneious<sup>®</sup> (versão 11.1.4) foi obtida a sequência consenso para cada fragmento de TAIL-PCR clonado. As sequências consenso encontradas foram então comparadas contra o banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e do JGI (Joint Genome Institute) MycoCosm com a ferramenta BLASTn<sup>®</sup>, especificamente contra a sequência genômica anotada da linhagem selvagem *T. harzianum* BRM27158 com a qual foram identificadas as regiões adjacentes ao sítio de inserção do T-DNA.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Transformação de *T. harzianum* BRM27158 por *A. tumefaciens*

Com o objetivo de identificar genes de *T. harzianum* BRM27158 envolvidos no controle biológico foi escolhida para este estudo estratégia de mutagênese insercional aleatória mediada por *A. tumefaciens*, gerando uma biblioteca de transformantes, desta forma, permitindo a busca de genes associados a um fenótipo de interesse.

Quanto à sensibilidade ao marcador seletivo higromicina B, o crescimento da linhagem selvagem foi completamente inibido na presença de 200 µg/mL do fungicida, o que possibilitou a utilização do gene *hph* de *E. coli* como gene marcador seletivo no experimento de transformação. Este marcador vem sendo utilizado para transformação com *Trichoderma* há mais de 3 décadas. Herrera-Estrella et al, (1990) já haviam demonstrado que *T. harzianum* era sensível a este composto, porém, nas condições testadas por eles, 100 µg/mL foi o suficiente para suprimir o crescimento do fungo.

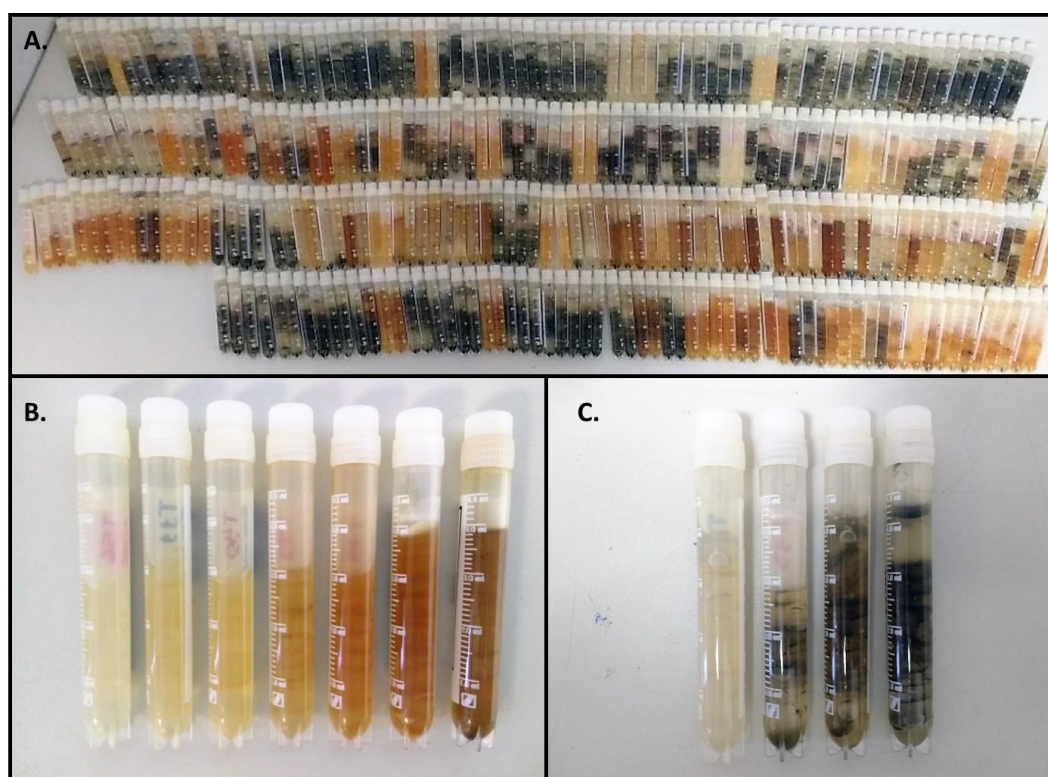
Foram obtidas 168 linhagens resistentes à higromicina B na concentração de 200 µg/mL. O número de transformantes recuperados foi de aproximadamente 3,36 transformantes/10<sup>5</sup> conídios nas condições utilizadas (sem otimização do co-cultivo). Na ausência de acetoseringona, nenhum transformante foi recuperado, mostrando que esse composto fenólico é de fato necessário para a transformação de *T. harzianum* BRM27158. Isto se explica devido ao efeito indutor da acetoseringona na expressão dos genes *vir*, que atuam no processamento e endereçamento do T-DNA de *A. tumefaciens* (LI et al., 2017).

Gao & Yang (2004) obtiveram 60-180 transformantes/10<sup>6</sup> conídios da linhagem *T. harzianum* T88, enquanto que YANG et al. (2007) obtiveram 60-110 transformantes/10<sup>7</sup> conídios dessa mesma linhagem de *Trichoderma*. CARDOZA et al. (2006) relatam a obtenção de 260 transformantes/10<sup>7</sup> conídios da linhagem *T. harzianum* T34. Número de transformantes variando de 70-110/10<sup>7</sup> conídios de *T. harzianum* foram relatados por YANG et al. (2010, 2011) quando utilizada a cepa AGL-1 de *A. tumefaciens*.

No presente trabalho, foi utilizada a cepa EHA105 de *A. tumefaciens* e o vetor binário pFAT-GFP. Esta combinação cepa/vetor já foi previamente utilizada

para transformar outras espécies de *Trichoderma*, como *T. virens* T20, com recuperação de 12 transformantes/ $10^7$  conídios (ROMÃO-DUMARESQ et al., 2016) e também *T. harzianum* CFAM-422, com recuperação de 1-20 transformantes/ $10^5$  conídios (SHIMIZU et al., 2015). Nesse aspecto, estima-se que o número de transformantes obtidos no presente trabalho possa ser aumentado com a utilização de maior concentração de conídios ou com a otimização de outros parâmetros de co-cultivo (concentração de acetoseringona, tempo de co-cultivo, temperatura e utilização de conídios germinados), conforme relatado para outros fungos (MULLINS et al., 2001; MICHELSE, 2005).

A coleção de agrotransformantes de BRM27158 exibiu diversidade quanto à esporulação e à pigmentação do meio de cultura, conforme evidenciado na figura 9. Foi possível agrupar os transformantes em uma escala com 7 níveis de pigmentação diferentes e com 4 níveis distintos de esporulação. Estes fenótipos variados indicam a ocorrência de alterações genéticas nessas linhagens, o que torna esta biblioteca uma fonte interessante para futuras pesquisas sobre genética desta linhagem de fungo.



**Figura 9.** Diversidade fenotípica da biblioteca de agrotransformantes de *T. harzianum* BRM27158. **A** - coleção completa, **B** - Diferenças quanto à pigmentação, **C** - diferenças quanto à esporulação.

## **4.2. Caracterização de uma biblioteca de transformantes de *T. harzianum* BRM27158 e seleção de linhagens com fenótipo alterado**

Diferentes testes foram realizados com os 168 transformantes obtidos, visando triar aqueles com alterações na capacidade de produção de proteases e inibição de *F. oxysporum* sob a premissa de que estas alterações fenotípicas estivessem associadas à mutação que receberam. Estes testes foram realizados pela equipe do Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília e os resultados serão descritos superficialmente para melhor contextualização sobre a origem das linhagens estudadas, porém, não serão explicitados devido à possibilidade de publicação futura pelas autoras.

Dentre os 168 transformantes, as linhagens T11, T25, T26, T40, T49, T50, T112, T113, T135 e T136 não apresentaram crescimento em meio de cultura com caseína como única fonte de carbono em comparação com o parental, sendo denominados protease negativos.

Do mesmo modo, a dosagem de atividade proteolítica foi inferior à da linhagem parental, tanto para proteases ácidas quanto alcalinas. No entanto, no teste de inibição por metabólitos secretados, o crescimento de *F. oxysporum* foi inibido tanto pelos transformantes como pelo parental.

No teste de confronto direto, os transformantes foram capazes de crescer por cima do micélio do patógeno, tal como o parental, indicando que não ocorreu alteração na capacidade de micoparasitismo desses transformantes nas condições utilizadas. Por apresentarem diferenças fenotípicas consistentes em comparação com a linhagem parental (especialmente quanto à produção de proteases), esses 10 transformantes foram selecionados para caracterização fisiológica e molecular no presente trabalho.

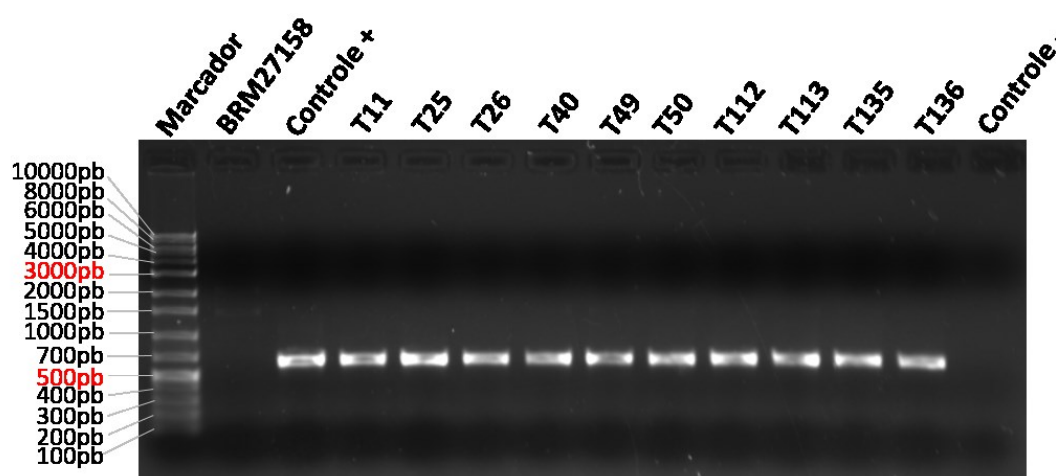
## **4.3. Caracterização fisiológica e molecular de 10 transformantes selecionados de *T. harzianum* BRM27158**

### *4.3.1. Estabilidade genética e confirmação da transformação*

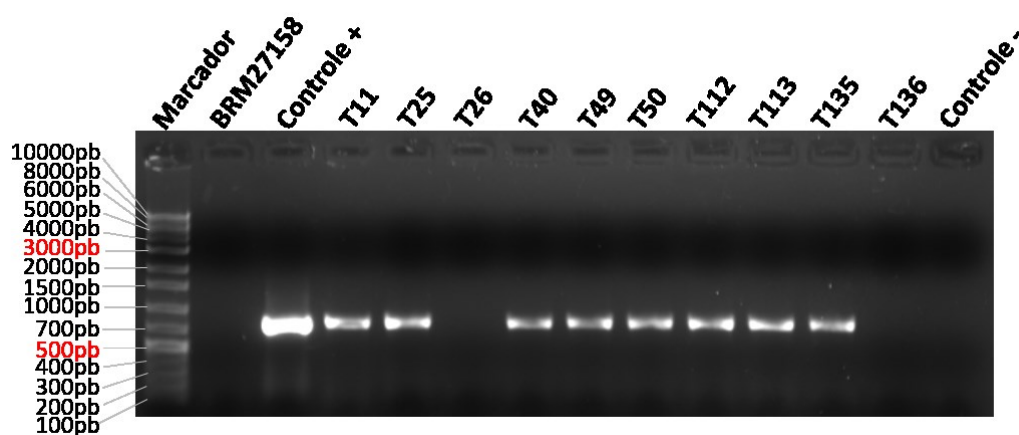
Os 10 transformantes selecionados foram submetidos à análise de estabilidade mitótica, por meio de repiques sucessivos na ausência de pressão seletiva (higromicina B). Verificou-se que todos os transformantes (T11, T25, T26, T40, T49, T50, T112, T113, T135 e T136) permaneceram resistentes à higromicina B mesmo após 5 gerações de crescimento na ausência deste composto antifúngico.

A confirmação da transformação das linhagens geneticamente estáveis foi realizada por meio de testes fenotípicos (análise da resistência à higromicina B e análise por microscopia de fluorescência) e testes moleculares (amplificação dos genes marcadores *hph* e *gfp* por PCR). Todos os 10 transformantes selecionados apresentaram amplificação do gene de resistência à higromicina B, *hph*, no tamanho esperado de cerca de 700 pb, ao contrário do fungo parental (figura 10). Os controles positivo (plasmídeo pFAT-GFP) e negativo (reação de PCR com água ultrapura em vez do DNA alvo) validam o resultado observado.

Com relação ao gene *gfp*, os mutantes T136 e T26 não apresentaram amplificação (figura 11). Os demais apresentaram bandas no tamanho esperado de aproximadamente 700 pb. Apesar disso, a amplificação do gene *hph* é um indício de que a transformação ocorreu nessas linhagens. A ausência de amplificação do gene *gfp* nessas linhagens pode ser devida a falhas na reação de PCR ou a alterações genéticas durante a integração do T-DNA no genoma do fungo, impossibilitando sua amplificação por PCR nas condições utilizadas.



**Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose 1% dos fragmentos resultantes da PCR do gene *hph* com os primers *hph1* e *hph2* dos 10 transformantes selecionados de *T. harzianum* BRM27158.

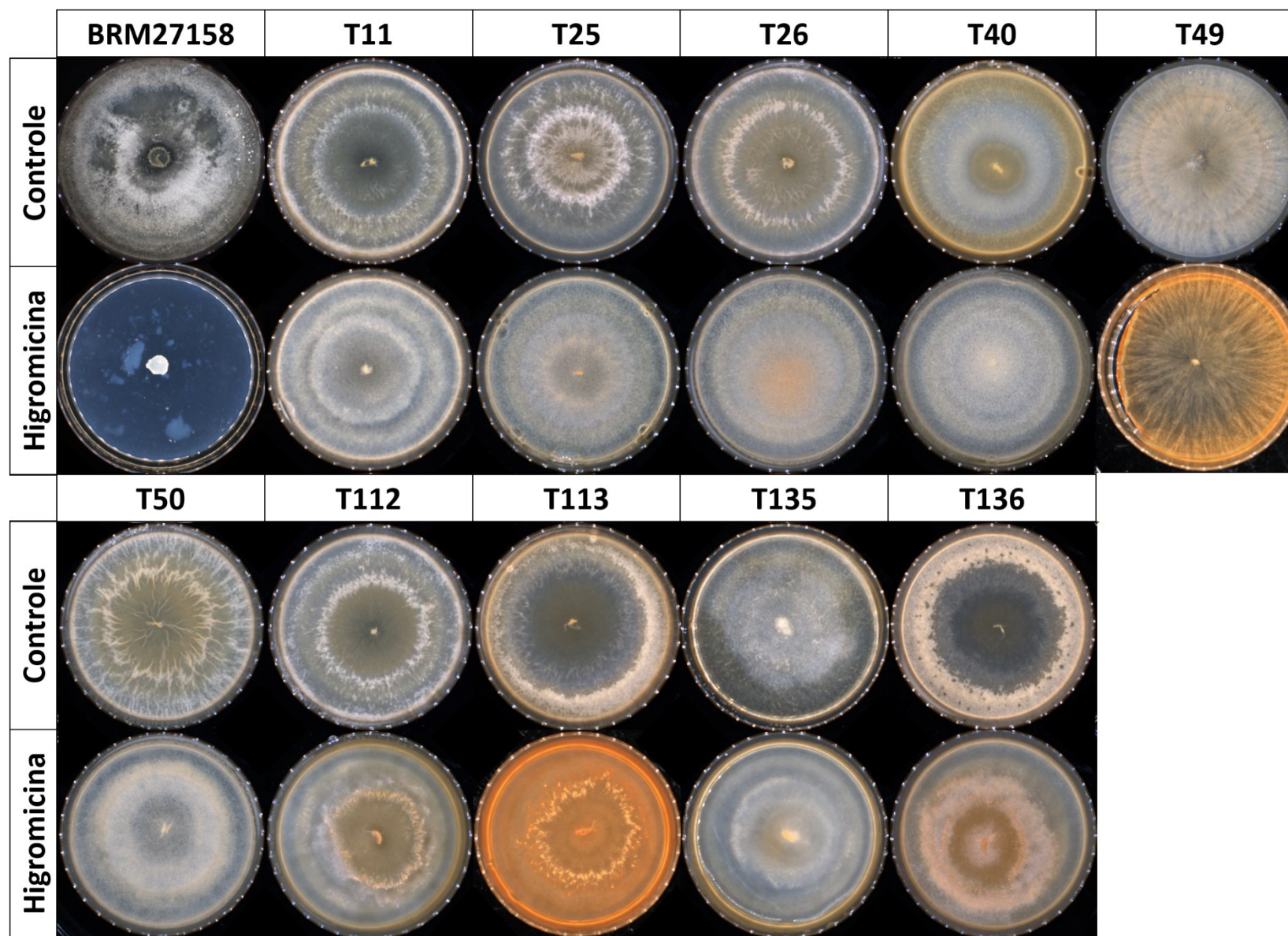


**Figura 11.** Eletroforese em gel de agarose 1% dos fragmentos resultantes da PCR do gene *gfp* com os primers glGFP5 e glGFP3 dos 10 transformantes selecionados de *T. harzianum* BRM27158.

Todos os transformantes selecionados foram capazes de crescer em BDA com higromicina B a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , concentração que inibe completamente o crescimento da linhagem selvagem (figura 12). Observou-se que, em relação ao crescimento em BDA com higromicina, os transformantes em meio não restritivo crescem de forma mais rápida e vigorosa, com abundante esporulação (dados não mostrados). Quando são expostos à higromicina, no entanto, observa-se uma menor esporulação e verifica-se que algumas linhagens (T49 e T113) apresentam maior pigmentação do meio de cultura (figura 12), indicando maior secreção de metabólitos.

Os transformantes foram avaliados por microscopia ótica de fluorescência, no entanto, a visualização da fluorescência dos transformantes em comparação com a cepa parental foi inconclusiva, todas as amostras apresentaram fluorescência de baixa intensidade e somente na parede celular e nos septos, além do plano de fundo também estar fluorescente, não sendo possível afirmar que a fluorescência observada vem, de fato, da expressão da GFP.

Embora a transformação tenha sido confirmada por PCR e testes de resistência à higromicina B, e que a inserção do T-DNA no genoma de fungos filamentosos seja predominantemente cópia única (MICHIELSE et al., 2005), outras análises moleculares (tais como *Southern blot* ou PCR em tempo real) serão necessárias para determinar o número exato de cópias do T-DNA inseridas no genoma de cada transformante.



**Figura 12.** Linhagens de mutantes selecionados e do *T. harzianum* BRM27158 selvagem cultivados em meio BDA com e sem higromicina (concentração de 200 µg/mL) durante 15 dias a 25°C.

#### 4.3.2. Caracterização de transformantes quanto à capacidade de produção de proteases

Após a triagem inicial feita pela Dra. Eliane F. Noronha e pela aluna Débora C. Cunha, os 10 transformantes de *T. harzianum* BRM27158 selecionados foram submetidos a novos testes (qualitativos e quantitativos) para determinação de atividade proteolítica para uma caracterização mais detalhada quanto à produção de proteases destes mutantes.

Quanto aos testes de degradação de substrato proteico em meio sólido, foi possível calcular o índice enzimático apenas para o meio contendo leite como substrato, pois foi o único em que se observou a formação dos halos de degradação enzimática. No entanto, o crescimento da colônia em milímetros foi medido para todos os meios após 7 dias de incubação a 25°C, dados que se encontram representados na tabela 16.

**Tabela 16.** Crescimento em milímetros dos fungos mutantes e do parental em meios com diferentes substratos proteicos.

Crescimento (mm) em diferentes fontes proteicas			
Linagem	Leite	Gelatina	Caseína
Selvagem	71,32 <sup>b</sup>	43,59 <sup>b</sup>	42,86 <sup>a</sup>
T11	77,37 <sup>a</sup>	41,28 <sup>b</sup>	46,52 <sup>a</sup>
T25	57,98 <sup>d</sup>	57,61 <sup>a</sup>	35,09 <sup>b</sup>
T26	66,30 <sup>c</sup>	41,62 <sup>b</sup>	44,63 <sup>a</sup>
T40	52,20 <sup>d</sup>	51,93 <sup>a</sup>	34,16 <sup>b</sup>
T49	66,64 <sup>c</sup>	44,21 <sup>b</sup>	46,39 <sup>a</sup>
T50	71,19 <sup>b</sup>	50,97 <sup>a</sup>	51,84 <sup>a</sup>
T112	72,35 <sup>b</sup>	58,78 <sup>a</sup>	46,13 <sup>a</sup>
T113	55,77 <sup>d</sup>	55,39 <sup>a</sup>	35,23 <sup>b</sup>
T135	69,07 <sup>c</sup>	45,91 <sup>b</sup>	47,96 <sup>a</sup>
T136	64,31 <sup>c</sup>	60,36 <sup>a</sup>	40,41 <sup>b</sup>

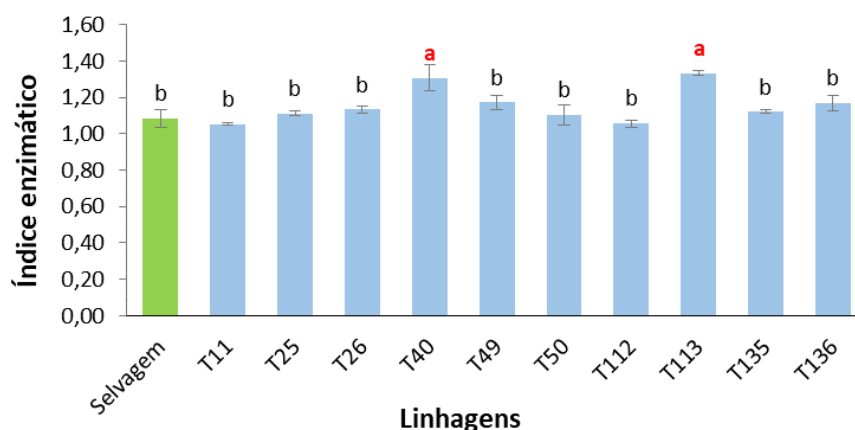
\* Valores com letras distintas indicam diferença estatística segundo teste Scott-Knott a significância de 0,05.

No substrato leite, 7 das 10 linhagens tiveram crescimento significativamente inferior ao parental, o que corrobora a alteração na capacidade proteolítica dessas linhagens. No entanto, essas diferenças em relação ao parental foram menos evidentes nos substratos gelatina e caseína. Em todo caso, 4 transformantes (T25, T40, T113 e



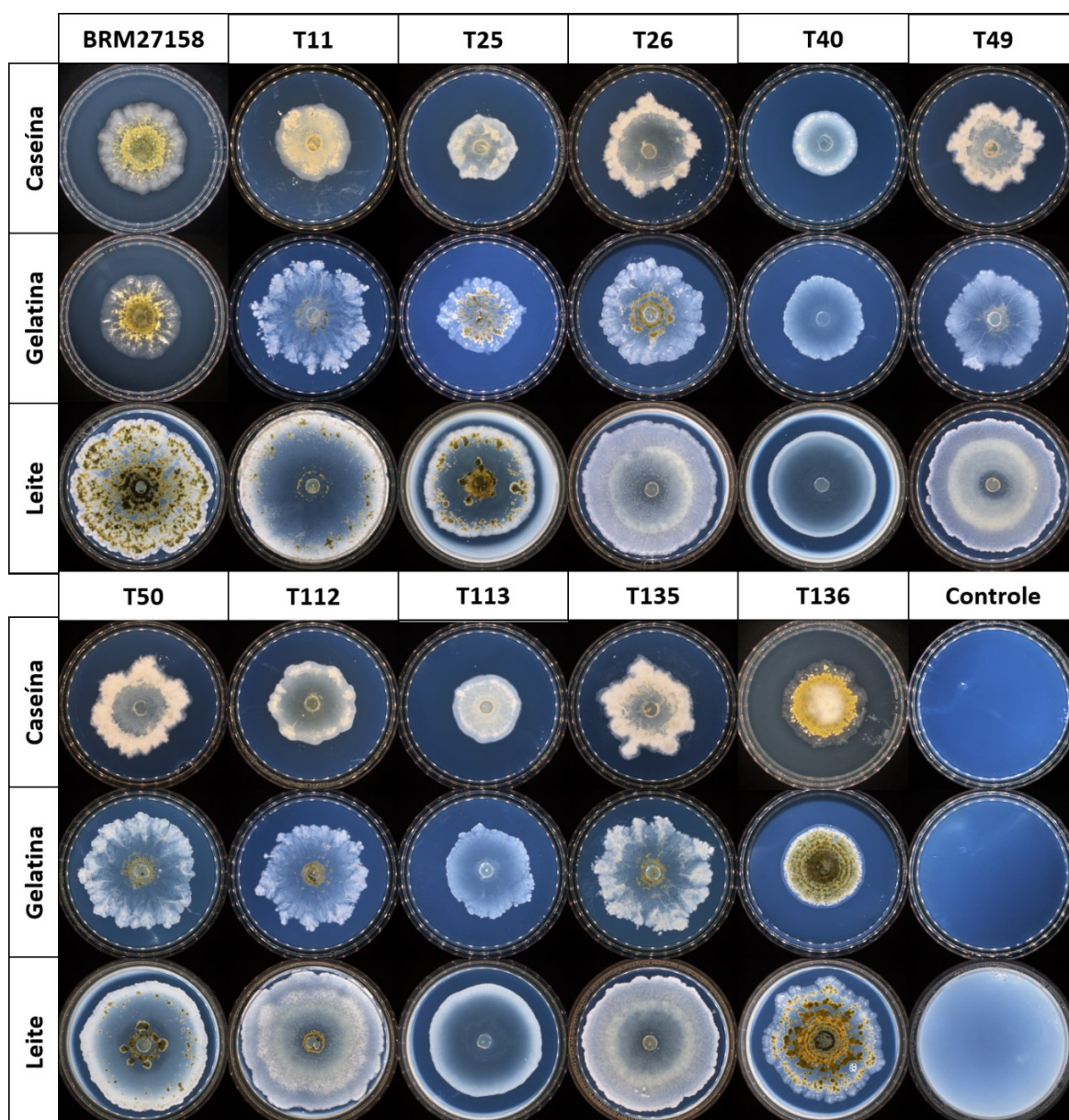
T136) apresentaram crescimento significativamente inferior ao parental nos meios de leite e caseína, simultaneamente. Além disso, observou-se que, alguns transformantes exibiram crescimento superior à linhagem parental, destacando-se o T11, que foi o único a superar o selvagem em meio contendo leite como substrato, e os transformantes T50 e T112, que apresentaram crescimento superior ao parental em meio contendo gelatina e equivalente ao parental nos demais meios.

Quanto aos índices enzimáticos em meio contendo leite como substrato (figura 13), duas linhagens apresentaram valores estatisticamente superiores ao selvagem, o T40 e o T113, apesar de terem apresentado crescimento micelial inferior ao parental nesse substrato e também em caseína (tabela 16). Os demais transformantes apresentaram índices enzimáticos similares ao do selvagem.



**Figura 13.** Índices enzimáticos de 10 transformantes e da linhagem selvagem *T. harzianum* BRM27158 em meio mínimo acrescido de leite como substrato. As letras diferentes representam diferença estatística pelo teste Scott- Knott com nível de significância a 0,05.

Observou-se ainda que todas as linhagens mostraram preferência pelo meio contendo leite com substrato, onde cresceram de forma mais vigorosa, chegando a esporular. Isto pode ser explicado devido ao fato de o meio de leite ser o único com outra fonte de carbono que não fosse proteica, já que o leite desnatado utilizado continha 50 g/L de carboidratos não especificados, em concentração superior à de proteínas (32 g/L).



**Figura 14.** Transformantes selecionados e linhagem parental *T. harzianum* BRM27158 cultivados em meio mínimo de sais com caseína, gelatina ou leite desnatado como substrato após 8 dias de crescimento a 25°C.

Os 10 transformantes geneticamente estáveis também foram avaliados quanto à produção de proteases em cultivo submerso, em comparação com a cepa parental. Os resultados de do experimento realizado em meio TLE com glicose se encontra na tabela 17 enquanto que os dados do experimento realizado em meio TLE com glicose é apresentado na tabela 18.

**Tabela 17.** Atividade enzimática (U/mL/g) e atividade específica (U/mg) de proteases, bem como sua massa seca (g) após cinco dias de cultivo em meio TLE.

Linhagem	Atividade (U/g/mL)	Atividade específica (U/mg)	Massa seca (g)
BRM27158	0,0025 <sup>b</sup>	0,0013 <sup>a</sup>	0,0612 <sup>b</sup>
T11	0,0178 <sup>b</sup>	0,0067 <sup>a</sup>	0,0477 <sup>b</sup>
T25	0,0581 <sup>a</sup>	0,0345 <sup>a</sup>	0,0900 <sup>a</sup>
T26	0,0158 <sup>b</sup>	0,0099 <sup>a</sup>	0,0544 <sup>b</sup>
T40	0,0093 <sup>b</sup>	0,0049 <sup>a</sup>	0,0565 <sup>b</sup>
T49	0,0080 <sup>b</sup>	0,0056 <sup>a</sup>	0,0753 <sup>a</sup>
T50	0,0099 <sup>b</sup>	0,0065 <sup>a</sup>	0,0622 <sup>b</sup>
T112	0,0164 <sup>b</sup>	0,0117 <sup>a</sup>	0,0776 <sup>a</sup>
T113	0,0098 <sup>b</sup>	0,0065 <sup>a</sup>	0,0858 <sup>a</sup>
T135	0,0231 <sup>b</sup>	0,0139 <sup>a</sup>	0,0691 <sup>a</sup>
T136	0,0008 <sup>b</sup>	0,0004 <sup>a</sup>	0,0793 <sup>a</sup>
Meio TLE	0,0000 <sup>b</sup>	0,0000 <sup>b</sup>	0,0347 <sup>b</sup>

\* Valores com letras diferentes indicam diferença estatística segundo teste Scott-Knott a significância de 0,05.

Nota-se que as atividades foram muito baixas nas condições utilizadas. Além disso, o resultado observado durante as triagens iniciais (selvagem com atividade muito superior à dos mutantes) não se repetiu. À exceção do T25, não houve diferença estatística entre as atividades enzimáticas dos mutantes e do parental. Quanto à atividade específica, em que as atividades foram normalizadas com a quantidade em mg de proteínas solúveis presentes no extrato, também não houve diferença estatística. Houve uma pequena diferença em relação à massa seca, havendo linhagens que produziram mais biomassa do que outras. Curiosamente, o parental ficou no grupo das linhagens que produziu menos biomassa. Neste experimento, optou-se por utilizar o meio TLE sem glicose, a fim de evitar a repressão catabólica por glicose. Contudo, esta alteração acabou causando uma diminuição na produção de biomassa dos fungos, o que também pode ter afetado suas atividades proteolíticas. Por este motivo, realizou-

se outro ensaio, desta vez com glicose no meio TLE, na tentativa de obter resultados similares aos obtidos nas triagens iniciais. Os dados deste segundo ensaio se encontram na tabela 18.

**Tabela 18.** Atividade enzimática (U/g/mL) e atividade específica (U/mg) de proteases, bem como sua massa seca (g) após cinco dias de cultivo em meio TLE com glicose.

Linhagem	Atividade (U/g/mL)	Atividade específica (U/mg)	Massa seca (g)
BRM27158	0,0025 <sup>a</sup>	0,0010 <sup>a</sup>	0,1315 <sup>a</sup>
T11	0,0164 <sup>a</sup>	0,0061 <sup>a</sup>	0,0893 <sup>a</sup>
T25	0,0175 <sup>a</sup>	0,0053 <sup>a</sup>	0,1118 <sup>a</sup>
T26	0,0166 <sup>a</sup>	0,0056 <sup>a</sup>	0,1124 <sup>a</sup>
T40	0,0114 <sup>a</sup>	0,0052 <sup>a</sup>	0,1457 <sup>a</sup>
T49	0,0171 <sup>a</sup>	0,0058 <sup>a</sup>	0,1232 <sup>a</sup>
T50	0,0100 <sup>a</sup>	0,0044 <sup>a</sup>	0,1337 <sup>a</sup>
T112	0,0130 <sup>a</sup>	0,0049 <sup>a</sup>	0,1457 <sup>a</sup>
T113	0,0136 <sup>a</sup>	0,0055 <sup>a</sup>	0,1384 <sup>a</sup>
T135	0,0130 <sup>a</sup>	0,0047 <sup>a</sup>	0,1181 <sup>a</sup>
T136	0,0019 <sup>a</sup>	0,0005 <sup>a</sup>	0,1437 <sup>a</sup>
Meio TLE	0,0000 <sup>a</sup>	0,0000 <sup>a</sup>	0,0360 <sup>b</sup>

\* Valores com letras diferentes indicam diferença estatística segundo teste Scott-Knott a significância de 0,05.

Não houve diferença entre as atividades enzimática e específica de proteases das linhagens transformantes e do selvagem, tampouco em relação à massa seca. Novamente, os valores das atividades enzimáticas não alcançaram os obtidos nas triagens iniciais, feitas no Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília, mesmo com a adição da glicose.

Uma possível explicação para essas diferenças entre a triagem inicial e a realizada neste trabalho são as variações nas condições do experimento como: materiais, equipamentos, reagentes, tipo de inóculo (suspensão de esporos ou discos de micélio) e origem das linhagens (diferenças entre o estoque original e o estoque purificado geneticamente estável). Para chegar a conclusões mais contundentes, será necessário repetir estes experimentos em condições mais próximas àquelas realizadas no Laboratório de Enzimologia.

#### 4.3.3. Caracterização de transformantes quanto à atividade antimicrobiana

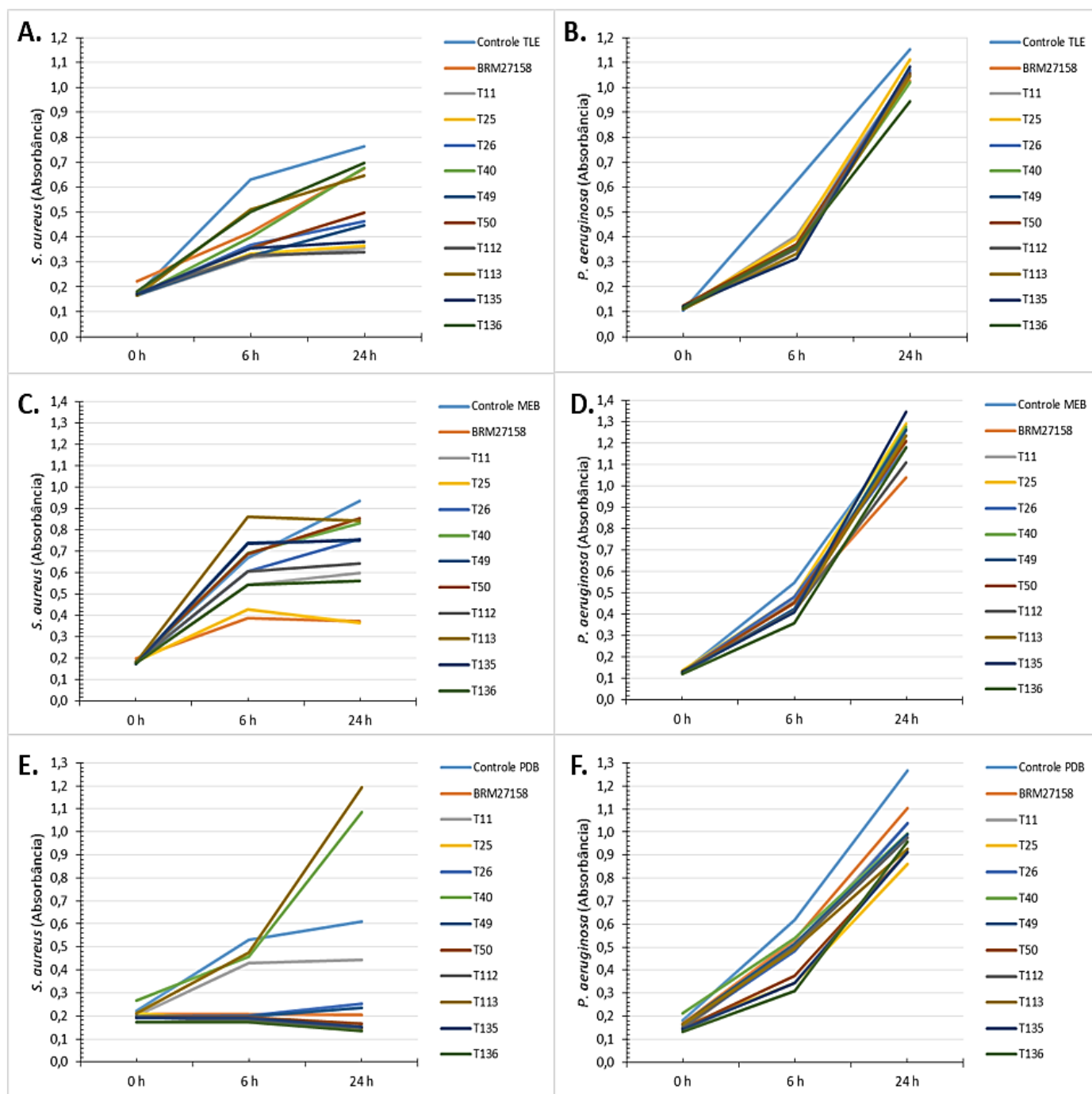
Além da capacidade de produzir proteases, a linhagem parental *T. harzianum* BRM27158 e os 10 transformantes geneticamente estáveis selecionados foram caracterizados quanto à atividade antimicrobiana. Conforme relatado anteriormente, esses 10 transformantes foram inicialmente avaliados, pelo grupo da em teste de inibição por compostos secretados em placas de meio sólido com o fungo *F. oxysporum* pelo Laboratório de Enzimologia. Neste caso, os compostos secretados tanto pelo fungo selvagem quanto pelos transformantes inibiram completamente o crescimento do patógeno, indicando que as alterações que os mutantes carregam não afetam a capacidade de inibição de *F. oxysporum* nestas condições.

Após a purificação e o teste de estabilidade mitótica, foi realizado um teste de inibição por metabólitos secretados muito semelhante ao anterior, porém, contra o patógeno *S. sclerotiorum*. No entanto, o selvagem e os mutantes conseguiram atravessar a membrana de papel. Já que o objetivo era avaliar o efeito dos compostos de maneira isolada (sem a presença do fungo antagonista) a correta leitura dos resultados foi inviabilizada.

Ainda com o objetivo de caracterizar a atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica), ensaios foram feitos com o extrato bruto proveniente de cultivo submerso do parental e dos transformantes em três meios de cultura diferentes (TLE, MEB e PDB) e a figura 15 ilustra estes resultados.

Observa-se que, de modo geral, o crescimento da bactéria *P. aeruginosa* não foi significativamente inibido pelos três extratos avaliados (TLE, MEB e PDB), em comparação com os controles. Do mesmo modo, também não foram observadas diferenças marcantes entre os extratos da linhagem parental e dos transformantes quanto à inibição do crescimento de *P. aeruginosa*. Este resultado é congruente com o relato de Viscaíno et al (2005) de que esta bactéria parece ser menos suscetível à inibição por extratos de *Trichoderma* spp..

Alguns trabalhos sugerem ainda que *T. harzianum* e *P. aeruginosa* podem estabelecer uma interação sinérgica contra patógenos quando co-inoculados na planta hospedeira (SHAFIQUE et al., 2015) e que metabólitos secretados por *T. harzianum* podem estimular o metabolismo de algumas espécies de *Pseudomonas* benéficas às plantas (SRIVASTAVA et al., 2010; SIDDIQUI & SHAUKAT, 2004).



**Figura 15.** Leitura das absorbâncias de *S. aureus* e *P. aeruginosa* incubadas durante 0, 6 e 24 horas na presença de extrato bruto a 40% (v/v) do cultivo de fungos em meios TLE, MEB e PDB. As letras **A**, **C** e **E** correspondem à absorbância de *S. aureus* Rosenbach ATCC 25923 nos meios TLE, MEB e PDB, respectivamente. As letras **B**, **D**, e **F** correspondem à absorbância de *P. aeruginosa* Migula ATCC 27853 nos meios TLE, MEB e PDB, respectivamente.

Com relação à bactéria *S. aureus*, no entanto, foi possível verificar diferenças significativas no seu crescimento dependendo da linhagem de fungo que gerou o extrato (parental ou transformante), diferenças estas que variaram entre os três substratos distintos de cultivo fúngico.

Quanto aos extratos do cultivo em TLE, nota-se que apenas as linhagens T11, T25, T112 e T135 apresentaram porcentagem de inibição superior a 50%, sendo a T112 a que mais inibiu o crescimento de *S. aureus*. A linhagem parental, no entanto, apresentou inibição de apenas 11% em relação ao controle.

Para o extrato MEB da linhagem parental BRM27158 inibiu 60% do crescimento de *S. aureus* após 24 horas em comparação ao controle. Enquanto que os extratos MEB dos transformantes T50, T113, T40, T135 e T26 perderam a ação antibacteriana quando comparados ao parental.

Já para o extrato oriundo do cultivo em PDB, as linhagens T40 e T113 não só não inibiram como chegaram a favorecer o crescimento da bactéria gram positiva. A linhagem T11 conseguiu inibir parcialmente enquanto que todas as demais, inclusive a selvagem, apresentaram inibição expressiva. Foi neste substrato que as diferenças entre os extratos de cada linhagem se mostrou mais proeminente.

Supõe-se que as alterações causadas nos transformantes sejam a razão pela qual se observam diferenças quanto a inibição do crescimento bacteriano. A avaliação da atividade antimicrobiana em diferentes condições de cultivo e contra diferentes microrganismos patogênicos permitiu uma melhor caracterização do fenótipo dos agrotransformantes de *T. harzianum*. Tais condições podem servir de base para experimentos futuros sobre análise metabolômica dos transformantes em comparação com a cepa parental, visando identificar os metabólitos secundários produzidos.

A atividade antibacteriana de extratos brutos de *T. harzianum*, ou de extratos orgânicos, contra *S. aureus* já foi relatada por diferentes autores (SANTAMARINA et al., 2002; MARFORI et al., 2002; VISCAÍNO et al., 2005; LEELAVATHI et al., 2014; PHUPIEWKHAM et al., 2015; ANWAR & IQBAL, 2017). Assim como observado no presente trabalho, a capacidade de inibição foi dependente das condições utilizadas para o crescimento do fungo, especialmente quanto às fontes de carbono e nitrogênio usadas como nutrientes (VISCAÍNO et al., 2005).

A atividade antifúngica dos extratos também foram testadas contra o patógeno

*F. oxysporum*. Nenhuma dos extratos, incluindo o do parental, foi capaz de inibir o crescimento do fungo fitopatígeno, que cresceu com o mesmo independente da condição que lhe foi dada. Como o experimento foi realizado apenas na concentração de 40%, será necessário repetir estes testes com diferentes concentrações dos extratos para concluir com maior propriedade sobre a capacidade de inibição de cada linhagem.

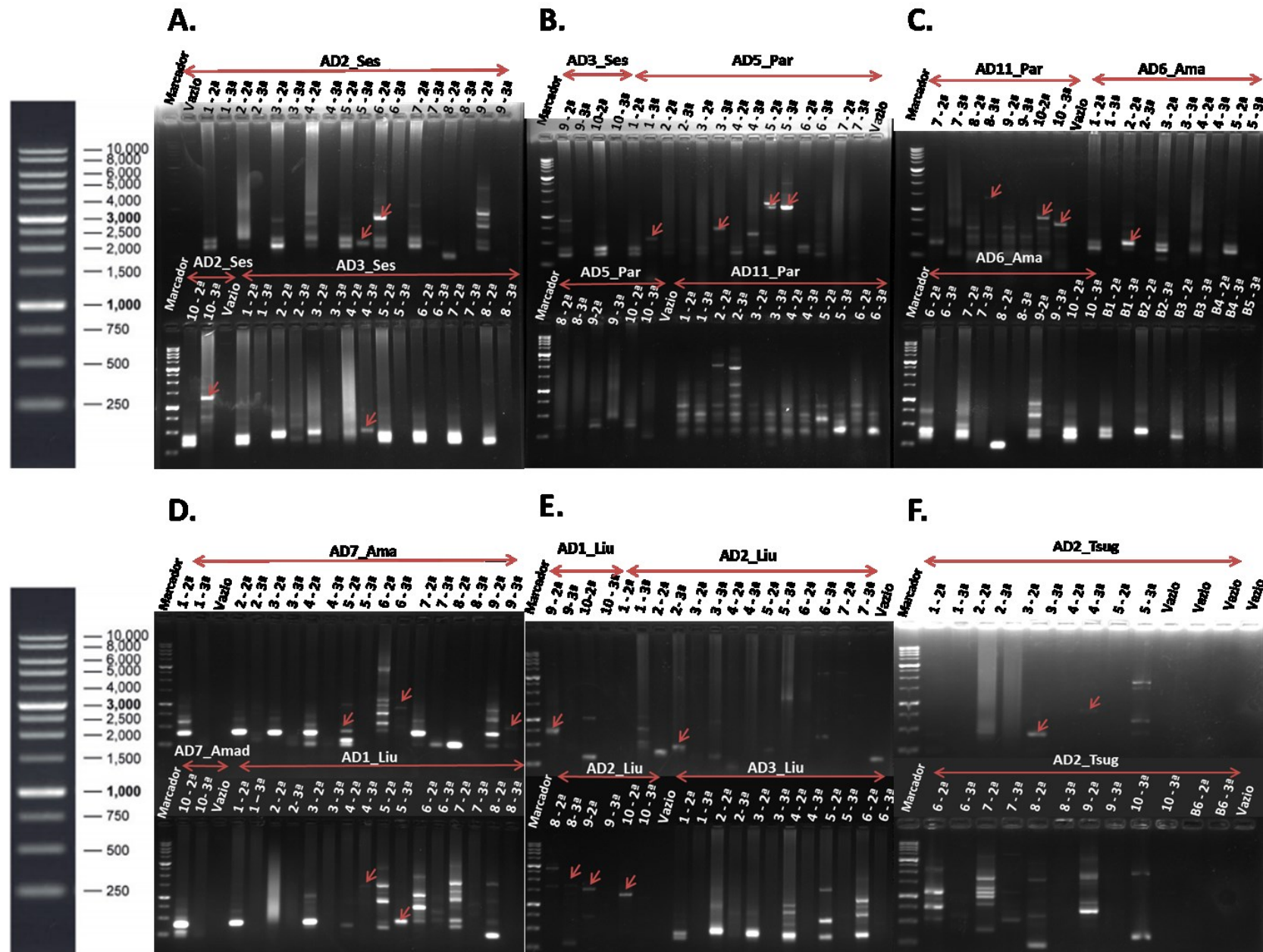
A análise dos dados de caracterização fenotípica dos transformantes revela que a mutagênese insercional mediada por *A. tumefaciens* foi uma estratégia promissora para a obtenção de linhagens com alterações em diferentes vias relacionadas ao controle biológico, por exemplo, produção de proteases e metabólitos antimicrobianos. Também foi possível, em alguns casos, associar mais do que um fenótipo para um mesmo transformante. Os transformantes T40 e T113, por exemplo, apresentaram diminuição de crescimento micelial em substratos proteicos e também perderam a atividade antibacteriana contra *S. aureus* quando cultivados nos meios MEB e PDB.

A utilização da transformação mediada por *Agrobacterium* para caracterização de genes de *T. harzianum* também foi relatada por FAN et al. (2014). Os autores obtiveram 450 transformantes, dos quais 6 mostraram capacidade reduzida de modular a resistência de plantas de milho ao patógeno *Curvularia lunata*. SHIMIZU et al. (2015) caracterizaram 618 transformantes de *T. harzianum* CFAM-422 quanto à produção de celulases e hemicelulases e selecionaram 11 mutantes com aumento ou diminuição da produção de enzimas. No presente trabalho, uma biblioteca com 168 transformantes foi obtida, sendo que 10 linhagens foram selecionadas com alterações na produção de proteases e metabólitos bioativos. Os 10 transformantes selecionados foram então submetidos à análise molecular visando à identificação de genes envolvidos nas características avaliadas.

#### 4.3.4 Identificação das regiões adjacentes ao T-DNA dos transformantes selecionados

A Figura 16 exemplifica a análise de eletroforese das reações de TAIL-PCR realizadas para os transformantes T11, T25, T26, T40, T49, T50, T112, T113, T135 e T136 com diferentes primers degenerados. A análise de TAIL-PCR foi realizada para identificação de sequências adjacentes à borda esquerda do T-DNA.





**Figura 16.** Seleção de fragmentos resultantes da TAIL-PCR para posteriores sequenciamento e análise. As setas vermelhas indicam os fragmentos escolhidos. Os números de 1 a 10 denotam, respectivamente, T11, T25, T26, T40, T49, T50, T112, T113, T135 e T136. Os números ordinais 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> representam a segunda e a terceira etapas da TAIL-PCR. No gel A. estão os produtos da PCR com os Primers degenerados AD2\_Ses e AD3\_Ses, no B. estão AD5\_Par e AD11\_Par, no C. estão AD11\_Par e AD6\_Ama, no D. estão AD7\_Ama e AD1\_Liu, no E. estão AD1\_Liu, AD2\_Liu e AD3\_Liu e no F. o primer AD2\_Tsug. Os controles negativos, ou brancos, são os produtos da reação de PCR sem DNA (B1- primer AD2\_Ses, B2- AD3\_Ses, B3- AD5\_Par, B4- AD11\_Par, B5- AD6\_Ama e B6- AD7\_Ama).

A Tabela 19 resume os fragmentos que foram selecionados para serem clonados e sequenciados, bem como seu tamanho estimado em pares de bases.

**Tabela 19.** Relação de fragmentos amplificados por TAIL-PCR selecionados e seu tamanho estimado em pares de bases.

<u>Nome do fragmento</u>	<u>Tamanho estimado da banda (Kb)</u>
AD2_Ses_T49_3a	0,30
AD2_Ses_T50_2a	0,75
AD2_Ses_T136_3a	1,25
AD5_Par_T11_3a	0,50
AD5_Par_T26_3a	0,70
AD5_Par_T49_3a	1,25
AD5_Par_T49_2a	1,25
AD11-Par_T25_3a	2,00
AD11-Par_T25_2a	2,00
AD11-Par_T113_3a	1,25
AD11-Par_T136_3a	0,75
AD11-Par_T136_2a	0,70
AD6_Ama_T25_2a	0,40
AD7_Ama_T112_2a	0,40
AD7_Ama_T135_3a	0,45
AD2_Liu_T40_3a	1,25
AD2_Liu_T49_3a	0,40
AD2_Liu_T135_2a	0,75
AD3_Liu_T25_3a	0,40
AD3_Liu_T113_3a	1,60
AD3_Liu_T135_2a	1,50
AD3_Liu_T136_2a	1,25
AD2_Tsu_T26_2a	0,45
AD2_Tsu_T40_2a	0,75

Foram obtidos fragmentos amplificados para todos os 10 transformantes, totalizando 24 sequências selecionadas para análise. O primer AD11\_Par foi o que produziu o maior número de fragmentos, 5. Já os primers AD1\_Liu e AD4\_Liu não geraram fragmentos adequados para as análises posteriores. Pouco mais da metade dos fragmentos selecionados resultaram da reação terciária da TAIL-PCR (13 dos 24 fragmentos).

A clonagem e o sequenciamento dos 24 fragmentos selecionados na TAIL-PCR dos 10 transformantes (Tabela 19) foram realizadas, no entanto, sequências com qualidade adequada para análise foram obtidas para seis transformantes (T11, T40, T50, T112, T113 e T135). As sequências adjacentes à borda esquerda do T-DNA desses seis transformantes são mostradas integralmente na Figura 17.

**T. harzianum** BRM27158 - T11

GACAGATGAGGGGOGAGGGCAACCAGCCGGTGGAGCGTGGAAAGGGTTCGACGATCGTCAAOGTTCACTTCTAAAGAAATAGCGCCACTCAGCTTCTCAGCGGCTTT  
 ATCCAGCGAATTCCTATATATGTCGGCATAGTTCTCAAGATCGACAGCCCTGTCAOGGTTAAGOGAGAAATGAATAAGAAGGCTGATAATTCGGATCTCTGCGAGGGAGA  
 TGATAATTTGATCACAGGCAGCAACGCTCTGTCTATCGTTACAATCAACATGCTACCCCTCCGCGAGATCATCCGTGTTTCAAACCCGGCAGCTTAGTTGCCGTTCTTCOG  
 AATAGCATCGGTAACATGAGCAAAGTCTGOCGCCCTTACAACGGCTCTCCGCTGACGCGCTCCCGGACTGATGGGCTGCCTGTATCGAGTGGTGAATTTGTGCCGAGC  
 TCCCGTGGGGAGCTGTTGGCTGGCTGGTGGCAGGATATATTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAACCTTAATAACACATTGCCGAGC

**T. harzianum** BRM27158 - T40

CGAATTCGCCCTTCTCTGTTACATCAGCTCGCAGCTACCTTATCTGTTGTCGACATCGACGACCCCAATCTGTCTTTTGTCTTCAATGCCAAAGGTCCGCGCTTCC  
 ACGTGTGAAAAAGCTTAGAGAGGCATAGAGCGGGCAACCAATCCOGGCACTGCOGATOGGTGATATTTGATOGACTCCATTCAGGAGCTGCCAATCTGTACAA  
 GTTGGGAAACAAAAGCCGGAACACAAAACATGGTGGTAGCCAGGCGCAGGCACAGGCTCAGCTGCTGGGCCGTGCAAGCAACATTGAAGCCAGGGGTGGCAAAGCG  
 CCCATGTAACCTGTACAGATAGAGAGAGAGTCCATGAGTGTGCCAATGCTCTACCTTACATATTTTCTTCCCTTTTTTGTATTTGATAGTGCATATCCGCGCTCTAA  
 ACTGACAAAATCGGCTGCATCTGTGCGGGCCAGTAGCTGATCCGAGGCGTGGCTTACAACCTCTCAITTTAAACAACAGCATTCTTATGCAAGCCACATGTTCCAAACCA  
 GCCACCCCTGGCTGACGTTTTTTCGCGTGTCTCGTTTGGGGTGGAGTATTCTATCCGCCACTCACACCATTGTCTCCGTGCATOGATCGGTGCAGGGCTTCCGG  
 ATATATTGGTGTCAAACAAATTGACGCTTAGACAACCTTAATAACACATTGCCGAGC

**T. harzianum** BRM27158 - T50

GATAACATAGCTTCCAATGGATTATAGTCTTCAATGGTCCAAATGAGGAAAGAAATTCAGCTGGTGGCCAGCCAGATATAAGGCCCTTGAAGCGGTCCGGAATGAG  
 GACACAATCGCTGCCATTTGCGGTGGAGACAGAACGGCAGCATTGTACTOGATGCGCGAGTGTAGTCCATCATCTGCTCCGTAACCTCTAGCTGCAATGTGAACTTG  
 GTTCTCCGCTCCGAATGCGATTGCTGGAAAATTTGAGCAACCAGTATCTTGGAGGAGTGTCCAGTGGCTGGACTGOCAGTATAAATCACCACAACATCAAAGAGA  
 GATCTTCGATCCCTTCCCAATGTAAAATTTGAGAAATAGGGCATCTGGTTTTCAAACGAAAGGTTAACTTCCGACACAATATCGTTAATGAGCATACTAGAGTCTGCC  
 ATGTTATTATCATOGAGTTTTATGCGCACTGGTAGCTGTGCGAGAAGGAGACCCATAGTGTTCGCGCCCCAGGCTCGTCTCGATTATATATGGAATTCANATACA  
 ATGTCCTTATTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAACCTTAATAACACATTGCCGAGC

**T. harzianum** BRM27158 - T112

CGGCCCCATCTTCTCTCCCAAGTTGTGCGACTCTTTGTGATACTCGTAGTTTCTTATATGGCCGTGGGATTTGGTTCCGACCCCTAGGCATTTTTGACTGGVAA  
 GGATGCAATTTTTAGCAATCCGATGTGGCCCTGGCAGATGTTAGCTATCAGAAGAGCACACATGTAACGTTAGGAGGATATATTGGTGTAAACAAATTGACGCTT  
 AGACAACCTTAATAACACATTGCCGAGC

**T. harzianum** BRM27158 - T113

ACTTAGGACAAATCTAGATATATCCATTTTTATACAGTCCCTTACOGAGAACGGATCTGGTCAATCCGCTGAGAAAGTAATCATCCGGTCCGGCGGATGTCACGGCATT  
 CGAGCTAGAAGAGCTTTCTCTAGTGTCAACCGTCACTACCTGGCAGCTACACATGTTCCGCAAGGCCATTTCTGGGAGGATATATTGGTGTAAACAAATTGAC  
 GCTTAGACAACCTTAATAACACATTGCCGAGC

**T. harzianum** BRM27158 - T135

GTTACATCAGCTCGCAGCTACCTCCACTGGCAATAGCCGCTGTATTCAACTTGTTCATOGCTGGAAACAATACAATGGTAATAAAAGCAATCCCTGACGACGCAATGC  
 CATTCGCAAAACCGCGCTTTGAGACCCCTGCATGTAGGCTACCAAAAATCCAGGAATTTGGTCTCCGAAAACACTTTTCCGAAATCCGTCCGGCCGGTGTCAACCAG  
 GGGCCCAITGACTCCCTGTGTCTGTCTGGGAAGATTGTTGATCATGACGTTAACAAGCCAGCTTGGGCAGCAGAAACCATCCCTGCACCACCAAGCGTCTGAAGAA  
 ATAACAGCATGGCTGTCACTTCTGCGAGATCTATGGCCGGAGCTGTAGCTTGTACCGTGTATAATGGCGATCTGGGACCGGATACCCGACCAACACCACCGATGATCT  
 GGTAGCCGATTCATTTGCCCTCAGAGTAACCAATATCCAAAGTGTAAAGCAAACTGTACATAACCGTCCGACAGGTCAGTCCCGCAACGGTAATCCGGCCGCAATAC  
 CAGTGGCAGAGATGTAAGCACCGCTGCAAAAGCATGGAGATGCAACAGCGACGATGAGGGGCGAGTTTCTAACACCACCTTGACTGGGCACCTCCGCTGTCAATACTC  
 GGAAGTATAATTGGTAGTAATATAGAAACCAAGTAGTACGCGCAGAGTAGAAGAAATGAAAGCACTGATTCCGACTATGTAAACTCTCAAACAAATTGACGCTTAGACA  
 CTTAATAACACATTGCCGAGC

**Figura 17.** Sequências adjacentes à borda esquerda (*left border*) do T-DNA dos transformantes T11, T40, T50, T112, T113 e T135 de *T. harzianum* BRM27158. Em azul: sequência genômica do fungo *T. harzianum* BRM27158. Em vermelho sublinhado: sequência da borda esquerda do T-DNA (podendo estar completa com 24 nucleotídeos como mostrado para o transformante T11, ou truncada no momento da inserção, como nos demais transformantes). Em verde itálico: sequência da borda esquerda do T-DNA do vetor binário pFAT-GFP que contém o sítio de anelamento do primer específico LB3 (sublinhado), utilizado nas reações de TAIL-PCR.

Verificou-se diferenças no padrão de inserção do T-DNA nessas seis linhagens. Por exemplo, a sequência da borda esquerda (*left border*) que tem 24 pares de bases foi truncada em todas as linhagens, exceto no transformante 11, no qual a borda esquerda permaneceu intacta (com 24 pares de bases) (Figura 17).

A análise da sequência do transformante T11 revelou que a região adjacente à borda esquerda corresponde à própria sequência do plasmídio pFAT-GFP. Isso mostra que nesse transformante a inserção não foi apenas do T-DNA, mas também de vetor binário, o que revela uma falha na clivagem do T-DNA pela maquinaria da *Agrobacterium* no momento da transformação. Nessa sequência foi possível encontrar o sítio de anelamento do primer degenerado AD5\_Par (dados não mostrados), que levou à amplificação do referido fragmento. Para esse transformante, não foi possível determinar a sequência fúngica adjacente à borda esquerda. Em todo caso, os testes fenotípicos realizados mostraram que os extratos brutos obtidos nos meios MEB e PDB perderam parcialmente a capacidade de inibir o crescimento de *S. aureus* em comparação com o extrato da cepa parental. Isso mostra que essa diferença pode ser devida à alterações metabólicas causadas pela transformação.

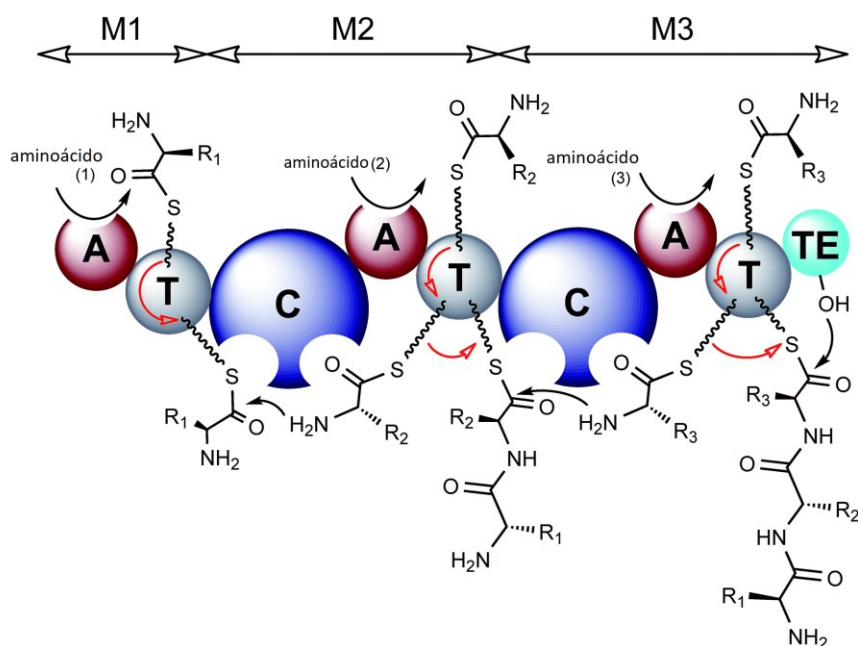
A integração de DNA plasmidial para além da região do T-DNA no genoma de fungos filamentosos já foi relatada para algumas espécies. Em alguns casos, esse fenômeno ocorreu com elevada frequência, por exemplo, para *Colletotrichum graminicola* (FLOWERS & VAILLANCOURT, 2005), *Epicoccum nigrum* (FÁVARO, 2009), *T. reesei* (ZHONG et al., 2007). GELVIN (2003) relata que a transferência do T-DNA inicia-se pela borda direita e termina na borda esquerda, o que resulta na transferência de toda a sequência localizada entre essas bordas. No entanto, em alguns casos a transferência continua para além da borda esquerda, como já demonstrado em plantas (VAN DER GRAAFF et al., 1996) e alguns fungos (MENG et al., 2007). Esse fenômeno é geralmente atribuído à uma falha na clivagem da região da borda esquerda do T-DNA pelo complexo VirD1/VirD2 da *A. tumefaciens*.

A análise da sequência do transformante T40 pela ferramenta BLAST do GenBank não retornou nenhum resultado sobre sua similaridade. Quando a análise foi feita na base de dados do JGI, verificou-se uma correspondência (99,8%) com a sequência do scaffold Trihar1|scaffold\_93:26039-26311, de *T. harzianum* TR274 (que corresponde à linhagem parental BRM27158). Porém não há nenhuma informação sobre codificação de proteína para essa sequência, e ela não está presente em outras

espécies de *Trichoderma* com genoma disponível no JGI. O transformante T40 apresentou fenótipo alterado em relação à linhagem parental, especificamente uma diminuição de crescimento em substratos proteicos e marcante diminuição da atividade antibacteriana do extrato bruto obtido no cultivo em MEB e PDB.

Já para o transformante T50, a análise pelo banco de dados do GenBank revelou que houve uma correspondência com M431DRAFT\_549063, uma proteína hipotética de *T. harzianum* CBS 226.95 (acesso XM\_024921276.1) com 99% de identidade. Quando a análise foi feita no banco de dados do JGI, foi encontrada uma proteína de *T. virens* Gv29-8 com 99,6% de identidade, a proteína SirP, uma possível peptídeo sintase não ribossômica (NRPS) que estaria relacionada à biossíntese de metabólitos secundários, transporte e catabolismo. É ortóloga da proteína SidD (*Aspergillus fumigatus*), envolvida na síntese de sideróforos (KUBICEK, 2011). O ferro é um micronutriente cuja assimilação mais eficiente poderia garantir ao fungo uma vantagem em relação ao fitopatógeno nesta competição (MUKHERJEE, 2012).

As NRPSs são enzimas multimodulares nas quais cada módulo acrescenta um monômero ao peptídeo, não havendo dependência de um molde de mRNA ou ribossomos (figura 18). Cada módulo possui um domínio de adenilação (A), um peptidil carreador (T) e um de condensação (C). No último módulo da enzima existe um domínio adicional de tioesterase, que libera o peptídeo e termina sua produção (MUKHERJEE, 2012).



**Figura 18.** Representação de uma NRPS. M1, M2 e M3 representam os módulos da enzima. A denota o domínio de adenilação, T o domínio de tioilação ou peptidil carreador, C o domínio de condensação e TE o domínio de tioesterase ou de terminação. Adaptado de WINN (2016).

Genes envolvidos na produção de metabólitos secundários de fungos filamentosos geralmente encontram-se organizados em clusters, nos quais as NRPSs, tal como as policetídeo sintases (PKSs) e as dimetilalilriptofano sintases (DMATSs), são considerados genes assinaturas, sendo inclusive utilizados como referência para identificação de novos clusters de metabólitos secundários (HAUTBERGUE, 2018).

Ademais, as NRPSs são responsáveis pela produção dos peptaibols, peptídeos constituídos de ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico (aib) e um 1,2-aminoálcool C-terminal, que complementam o arsenal de metabólitos antimicrobianos de fungos do gênero *Trichoderma*. Peptaibols também podem agir como indutores de resistência sistêmica em plantas contra colonização por microrganismos patogênicos (MUKHERJEE, 2012). No caso do transformante T50, o fenótipo observado mostra uma redução marcante na capacidade de inibição de *S. aureus* em comparação com a cepa parental, quando o cultivo do fungo é realizado em meio a base de malte (MEB), mas não quando realizado em meio PDB. Esse transformante T50 pode ser considerado uma ferramenta útil para auxiliar a descoberta da identidade do composto produzido pela NRPS alterada.

Com relação à sequência do transformante T112, não houve correspondência pelo análise do GenBank. No JGI, por outro lado, houve 91,3% de identidade com a proteína hipotética TRIVIDRAFT\_79473 de *T. virens* Gv29-8. Segundo análises de ontologia e alinhamento com proteínas caracterizadas, trata-se de uma possível proteína de ligação à GTP. Por se tratar de uma proteína hipotética, não há informações suficientes para inferir sua função.

Para o transformante T113, a análise pelo NCBI revelou uma proteína hipotética, M431DRAFT\_287046, de *T. harzianum* CBS 226.95 (acesso XM\_024914059.1) com 100% de identidade. No JGI, o resultado foi o mesmo: 100% de identidade com uma proteína hipotética originada de *T. harzianum*. Não há qualquer anotação sobre a função destas proteínas. O transformante T113 apresentou fenótipo alterado em relação ao parental, especificamente uma diminuição de crescimento em meio contendo leite ou caseína. Outra característica do T113 foi a perda da capacidade antimicrobiana contra *S. aureus* do extrato bruto obtido no cultivo em MEB e PDB.

Finalmente, para o transformante T135, houve 2 correspondências no NCBI: a primeira, com 85% de identidade, diz respeito a uma proteína hipotética de *T. virens* Gv29-8 (acesso XM\_014094927) e a segunda, com 99% de identidade, à M431DRAFT\_536000, outra proteína hipotética, porém originada de *T. harzianum* CBS

226.95 (acesso XM\_024920978). No JGI, houve 99,5% de identidade com uma proteína com função predita de facilitadora de transporte de membrana (MFS). O fenótipo do linhagem T135 foi caracterizado pela perda parcial da capacidade antibacteriana contra *S. aureus*.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foi produzida uma biblioteca com 168 agrotransformantes do potencial agente de controle biológico *T. harzianum* BRM27158, dos quais 10 foram selecionados para estudos mais detalhados. A biblioteca apresenta diversidade fenotípica sendo, portanto, uma rica fonte para descoberta e validação funcional de genes deste fungo.

Com base nos dados obtidos na caracterização molecular e nos testes fenotípicos, pode-se inferir que a inserção do T-DNA alterou a fisiologia dos transformantes quanto ao nível de produção de metabólitos secundários, e que essas alterações foram menos evidentes quanto à produção de proteases. Uma possível explicação para esta constatação é que as triagens iniciais não tenham sido eficientes em destacar a característica desejada, que seria uma produção de proteases afetada negativamente em relação ao fungo selvagem.

A transformação foi confirmada por PCR e TAIL-PCR, no entanto, embora a transferência do T-DNA resulte na maioria das vezes em inserções de cópia única (MICHIELSE et al., 2005), será preciso determinar o número de cópias inseridas de modo a ratificar a relação fenótipo/genótipo dos mutantes obtidos.

O transformante T50 apresentou redução da capacidade antimicrobiana e esta diferença foi evidenciada a nível genético, com a identificação da região nocauteada pelo T-DNA como uma NRPS, cuja função descrita em outras espécies de *Trichoderma* está relacionada à produção de metabólitos secundários, incluindo peptaibióticos.

A NRPS identificada é ortóloga de uma proteína envolvida na produção de sideróforos em outras espécies de *Trichoderma*, responsável pela assimilação de metais pelo organismo. Uma forma de aprofundar este estudo seria testar a capacidade deste mutante de absorver metais em comparação com o fungo parental e, em seguida, inserir novamente o gene alvo por transformação, na tentativa de confirmar sua função predita.

Além disso, foram identificadas 3 proteínas hipotéticas. Estudos mais aprofundados quanto às alterações fenotípicas destes mutantes, T112, T113 e T135, em relação ao fungo selvagem poderiam fornecer esclarecimentos quanto as funções destes genes e sua relevância para a atividade antagonista deste fungo.

A combinação das técnicas de transformação mediada por *A. tumefaciens* e de TAIL-PCR se mostrou útil para identificação de regiões desconhecidas do genoma e pode ser aplicada em diversos contextos, muito além do controle biológico. O método permitiu a identificação e um gene que, até então, não havia sido descrito para esta espécie, além de pavimentar o caminho para a descoberta e outros 3. Isto com uma amostragem de apenas 6% de toda a biblioteca.

## 6. BIBLIOGRAFIA

AGLER, Matthew T. et al. Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. **PLoS biology**, v. 14, n. 1, p. e1002352, 2016.

ANWAR, Jawad; IQBAL, Zafar. Effect of Growth Conditions on Antibacterial Activity of *Trichoderma harzianum* against Selected Pathogenic Bacteria. **Sarhad Journal of Agriculture**, v. 33, n. 4, 2017.

BENÍTEZ, Tahía et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.

BETTIOL, W. et al. Controle biológico de doenças de plantas na América Latina. **Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2008.

BETTIOL, Wagner; MAFFIA, Luiz Antonio; CASTRO, M. L. M. P. Control biológico de enfermidades de plantas en Brasil. **Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2014.

BISSETT, John et al. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. **IMA fungus**, v. 6, n. 2, p. 263-295, 2015.

CARDOZA, R. E. et al. Cloning and characterization of the *erg1* gene of *Trichoderma harzianum*: effect of the *erg1* silencing on ergosterol biosynthesis and resistance to terbinafine. **Fungal Genetics and Biology**, v. 43, n. 3, p. 164-178, 2006.

CARDOZA, Rosa Elena et al. Partial silencing of a hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase-encoding gene in *Trichoderma harzianum* CECT 2413 results in a lower level of resistance to lovastatin and lower antifungal activity. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, n. 4, p. 269-283, 2007.

CARDOZA, Rosa Elena; MALMIERCA, Mónica G.; GUTIÉRREZ, Santiago. Overexpression of *erg1* gene in *Trichoderma harzianum* CECT 2413: effect on the induction of tomato



defence-related genes. **Journal of applied microbiology**, v. 117, n. 3, p. 812-823, 2014.

COCHRANE, Kevern et al. Climate change implications for fisheries and aquaculture. **FAO Fisheries and aquaculture technical paper**, v. 530, p. 212, 2009.

CONTRERAS-CORNEJO, Hexon Angel et al. Ecological functions of *Trichoderma spp.* and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. **FEMS microbiology ecology**, v. 92, n. 4, p. fiw036, 2016.

DEGENKOLB, Thomas et al. Peptaibol, secondary-metabolite, and hydrophobin pattern of commercial biocontrol agents formulated with species of the *Trichoderma harzianum* complex. **Chemistry & biodiversity**, v. 12, n. 4, p. 662-684, 2015.

DU, Lin et al. Unique amalgamation of primary and secondary structural elements transform peptaibols into potent bioactive cell-penetrating peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201707565, 2017.

DRUZHININA, Irina S. et al. Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts. **PLoS genetics**, v. 14, n. 4, p. e1007322, 2018.

EPA, 2018. Disponível em: <[www.epa.gov/ingredients-used-pesticideproducts/biopesticide-active-ingredients](http://www.epa.gov/ingredients-used-pesticideproducts/biopesticide-active-ingredients)>. Acesso em: 02/08/2018.

EUROPEAN COMMISSION, 2018. Disponível em: <<http://zec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/>>. Acesso em 02/08/2018.

FAN, Lili et al. Construction and functional analysis of *Trichoderma harzianum* mutants that modulate maize resistance to the pathogen *Curvularia lunata*. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 49, n. 8, p. 569-577, 2014.

FAN, Lili et al. Thc6 protein, isolated from *Trichoderma harzianum*, can induce maize defense response against *Curvularia lunata*. **Journal of basic microbiology**, v. 55, n. 5, p. 591-600, 2015.

FAVARO, L. C. de L. Diversidade e interação de *Epicoccum spp.* com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). **Embrapa Agroenergia-Tese/dissertação (ALICE)**, 2009.

FITZGERALD, Anna M. et al. Agrobacterium and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. **Mycological research**, v. 107, n. 7, p. 803-810, 2003.

FLOWERS, Jennifer L.; VAILLANCOURT, Lisa J. Parameters affecting the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Colletotrichum graminicola*. **Current genetics**, v. 48, n. 6, p. 380-388, 2005.

GAO, Xingxi; YANG, Qian. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Cry IA (b) gene to *Trichoderma harzianum*. **Chinese Science Bulletin**, v. 49, n. 23, p. 2491-

2494, 2004.

GELVIN, Stanton B. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 1, p. 16-37, 2003.

GERALDINE, Alaerson Maia et al. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. **Biological Control**, v. 67, n. 3, p. 308-316, 2013.

GRAMS, W.; MEYER, W. What exactly is *Trichoderma harzianum* Rifai. **Mycologia**, v. 90, p. 904-915, 1998.

HAUTBERGUE, T. et al. From genomics to metabolomics, moving toward an integrated strategy for the discovery of fungal secondary metabolites. **Natural product reports**, v. 35, n. 2, p. 147-173, 2018.

HARMAN, Gary E. et al. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature reviews microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43, 2004.

HARMAN, Gary E. et al. Changing models for commercialization and implementation of biocontrol in the developing and the developed world. **Plant Disease**, v. 94, n. 8, p. 928-939, 2010.

HERRERA-ESTRELLA, A.; GOLDMAN, G. H.; MONTAGU, M. van. Notes High-efficiency transformation system for the biocontrol agents, *Trichoderma* spp. **Molecular microbiology**, v. 4, n. 5, p. 839-843, 1990.

HIEI, Yukoh; KOMARI, Toshihiko; KUBO, Tomoaki. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant molecular biology**, v. 35, n. 1-2, p. 205-218, 1997.

HYNES, Russell K.; BOYETCHKO, Susan M. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 845-849, 2006.

HUTADILOK-TOWATANA, Nongporn; PAINUPONG, Anongnat; SUNTINANALERT, Prasert. Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. PS719. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 87, n. 5, p. 581-587, 1999.

JGI, 2018. Disponível em: <<https://genome.jgi.doe.gov/cgi-bin/dispGeneModel?db=Trihar1&tid=796901>> Acesso em: 03/08/2018.

KASHYAP, Prem Lal et al. *Trichoderma* for climate resilient agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 8, p. 155, 2017.

KUBICEK, C. P. et al. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. **Journal of Plant Pathology**, p. 11-23, 2001.

KUBICEK, Christian P.; KOMON-ZELAZOWSKA, Monika; DRUZHININA, Irina S. Fungal

genus *Hypocrea*/Trichoderma: from barcodes to biodiversity. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 10, p. 753, 2008.

KUBICEK, Christian P. et al. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of Trichoderma. **Genome biology**, v. 12, n. 4, p. 1, 2011.

KUBICEK, Christian P. (Ed.). The Actors: Plant Biomass Degradation by Fungi. In: **Fungi and Lignocellulosic Biomass**. John Wiley & Sons, p. 29-44, 2012.

LEELAVATHI, M. S.; VANI, L.; REENA, Pascal. Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci**, v. 3, p. 96-103, 2014.

LI, Dandan et al. Methods for genetic transformation of filamentous fungi. **Microbial cell factories**, v. 16, n. 1, p. 168, 2017.

LIU, Mu; LIU, Jun; WANG, Wei Min. Isolation and functional analysis of *Thmfs1*, the first major facilitator superfamily transporter from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. **Biotechnology letters**, v. 34, n. 10, p. 1857-1862, 2012.

LIU, Yao-Guang et al. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. **The Plant Journal**, v. 8, n. 3, p. 457-463, 1995.

LIU, Yao-Guang; WHITTIER, Robert F. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. **Genomics**, v. 25, n. 3, p. 674-681, 1995.

LOCATELLI, Gabriel Olivo et al. Development of *Trichoderma sp.* formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life. **Biological Control**, v. 117, p. 21-29, 2018.

LORITO, Matteo et al. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 14, p. 7860-7865, 1998.

MALMIERCA, Mónica G. et al. Relevance of trichothecenes in fungal physiology: disruption of *tri5* in *Trichoderma arundinaceum*. **Fungal genetics and biology**, v. 53, p. 22-33, 2013.

MALONEK, Stefan; MEINHARDT, Friedhelm. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic ascomycete *Calonectria morgani*. **Current genetics**, v. 40, n. 2, p. 152-155, 2001.

MAPA, 2018. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 02/08/2018

MARFORI, Eufrocínio C. et al. Trichosetin, a novel tetramic acid antibiotic produced in

dual culture of *Trichoderma harzianum* and *Catharanthus roseus* callus. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57, n. 5-6, p. 465-470, 2002.

MEINKE, David; SWEENEY, Colleen; MURALLA, Rosanna. Integrating the genetic and physical maps of *Arabidopsis thaliana*: identification of mapped alleles of cloned essential (EMB) genes. **PLoS one**, v. 4, n. 10, p. e7386, 2009.

MENG, Zhao-Hong; LIANG, Ai-Hua; YANG, Wei-Cai. Effects of hygromycin on cotton cultures and its application in *Agrobacterium*-mediated cotton transformation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 43, n. 2, p. 111-118, 2007.

MICHIELSE, Caroline B. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current genetics*, v. 48, n. 1, p. 1-17, 2005.

MONTE, Enrique. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **International Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 1-4, 2001.

MONTERO-BARRIENTOS, Marta et al. The heterologous overexpression of *hsp23*, a small heat-shock protein gene from *Trichoderma virens*, confers thermotolerance to *T. harzianum*. **Current genetics**, v. 52, n. 1, p. 45-53, 2007.

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

MONTERO-BARRIENTOS, M. et al. Functional analysis of *Trichoderma harzianum nox1* gene, encoding a NADPH oxidase, relates ROS production to specific biocontrol activity against *Pythium ultimum*. **Applied and environmental microbiology**, 2011.

MOORE, David; ROBSON, Geoffrey D.; TRINCI, Anthony PJ. 21st century guidebook to fungi with CD. **Cambridge University Press**, 2011.

MOOSAVI, Mohammad Reza; ASKARY, Tarique Hassan. Nematophagous fungi-commercialization. **Biocontrol agents of phytonematodes**. Wallingford, UK: CABI Publishing, p. 187-202, 2015.

MUKHERJEE, Prasun K. et al. Functional analysis of non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) in *Trichoderma virens* reveals a polyketide synthase (PKS)/NRPS hybrid enzyme involved in the induced systemic resistance response in maize. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 155-165, 2012a.

MUKHERJEE, Prasun K.; HORWITZ, Benjamin A.; KENERLEY, Charles M. Secondary metabolism in *Trichoderma*—a genomic perspective. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 35-45, 2012b.

MUKHERJEE, Prasun K. et al. (Ed.). **Trichoderma: biology and applications**. CABI, 2013a.

MUKHERJEE, Prasun K. et al. *Trichoderma* research in the genome era. **Annual review**

of **phytopathology**, v. 51, p. 105-129, 2013b.

MULLINS, E. D<sup>†</sup> et al. Agrobacterium-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. **Phytopathology**, v. 91, n. 2, p. 173-180, 2001.

NCBI, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/?term=trichoderma>> Acesso em: 28/05/2018.

NICOLÁS, Carlos et al. Trichoderma genes in plants for stress tolerance-status and prospects. **Plant Science**, v. 228, p. 71-78, 2014.

OZBAY, Nusret; NEWMAN, Steven E. Biological control with *Trichoderma* spp. with emphasis on *T. harzianum*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 4, p. 478-484, 2004.

PARINOV, Serguei et al. Tol2 transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes in vivo. **Developmental dynamics**, v. 231, n. 2, p. 449-459, 2004.

PARNELL, J. Jacob et al. From the lab to the farm: an industrial perspective of plant beneficial microorganisms. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1110, 2016.

PITZSCHKE, Andrea; HIRT, Heribert. New insights into an old story: Agrobacterium-induced tumour formation in plants by plant transformation. **The EMBO Journal**, v. 29, n. 6, p. 1021-1032, 2010.

PHUPIEWKHAM, Weeraya et al. Antibacterial agents from *Trichoderma harzianum* strain T9 against pathogenic bacteria. **Chiang Mai J. Sci**, v. 42, p. 304-316, 2015.

QUALHATO, Thiago Fernandes et al. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology letters**, v. 35, n. 9, p. 1461-1468, 2013.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 17-20, 1985.

RIFAI, Mien Achmad. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological papers**, v. 116, p. 1-56, 1969.

RODRIGUES, Amanda Rafaela et al. Análise do secretoma de isolados do fungo *Trichoderma asperellum* (TR356) em resposta ao fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*. 2014.

ROMÃO-DUMARESQ, Aline Silva et al. Diversity of cultivated fungi associated with conventional and transgenic sugarcane and the interaction between endophytic *Trichoderma virens* and the host plant. **PloS one**, v. 11, n. 7, p. e0158974, 2016.

RUBIO, M. Belén et al. Involvement of the transcriptional coactivator ThMBF1 in the

biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2273, 2017.

SAMOLSKI, Ilanit et al. The *qid74* gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 129-138, 2012.

SANTAMARINA, M<sup>a</sup> Pilar et al. Antagonistic activity of *Penicillium oxalicum* Corrie and Thom, *Penicillium decumbens* Thom and *Trichoderma harzianum* Rifai isolates against fungi, bacteria and insects in vitro. **Revista iberoamericana de micología**, v. 19, n. 2, p. 99-103, 2002.

SESSIONS, Allen et al. A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system. **The Plant Cell**, v. 14, n. 12, p. 2985-2994, 2002.

SIDDIQUI, I. A.; SHAUKAT, S. S. *Trichoderma harzianum* enhances the production of nematicidal compounds in vitro and improves biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas fluorescens* in tomato. **Letters in applied microbiology**, v. 38, n. 2, p.

SHAFIQUE, Hafiza Asma et al. Effect of endophytic *Pseudomonas aeruginosa* and *Trichoderma harzianum* on soil-borne diseases, mycorrhizae and induction of systemic resistance in okra grown in soil amended with *Vernonia anthelmintica* (L.) seed's powder. **Pak. J. Bot**, v. 47, n. 6, p. 2421-2426, 2015.

SHIMIZU, Alyssa MF et al. Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* do fungo celulolítico *Trichoderma harzianum* CFAM-422 e obtenção de uma biblioteca de transformantes. **II Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia-II EnPI: anais/Alexandre Alonso Alves...[et al.], editores técnicos. Brasília, DF: Embrapa**, p. 45-47, 2015.

SRIVASTAVA, Rashmi et al. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. **Biological control**, v. 53, n. 1, p. 24-31, 2010.

STEINDORFF, Andrei Stecca 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, 2014.

STEINDORFF, Andrei Stecca. Genômica estrutural e funcional de fungos do gênero *Trichoderma*. 2016

STOPPACHER, Norbert et al. The comprehensive peptaibiotics database. **Chemistry & biodiversity**, v. 10, n. 5, p. 734-743, 2013.

SUN, Jiaying et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as an efficient tool for insertional mutagenesis of *Kabatiella zeae*. **Journal of microbiological methods**, v. 149, p. 96-100, 2018.

TOZLU, Elif; TEKINER, Nasibe; KOTAN, Recep. SCREENING OF TRICHODERMA HARZIANUM RIFAI (1969) ISOLATES OF DOMESTIC PLANT ORIGIN AGAINST DIFFERENT FUNGAL PLANT PATHOGENS FOR USE AS BIOPESTICIDE. 2018.

TSUGEKI, Ryuji; KOCHIEVA, Elena Z.; FEDOROFF, Nina V. A transposon insertion in the Arabidopsis SSR16 gene causes an embryo-defective lethal mutation. **The Plant Journal**, v. 10, n. 3, p. 479-489, 1996.

VAN DER HEIJDEN, Marcel GA; HARTMANN, Martin. **Networking in the plant microbiome**. PLoS Biology, v. 14, n. 2, p. e1002378, 2016.

VAN DER GRAAFF, Eric; HOOYKAAS, Paul JJ. Improvements in the transformation of *Arabidopsis thaliana* C24 leaf-discs by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant cell reports**, v. 15, n. 8, p. 572-577, 1996.

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

VIEIRA, Pabline Marinho et al. Overexpression of an aquaglyceroporin gene from *Trichoderma harzianum* improves water-use efficiency and drought tolerance in *Nicotiana tabacum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 121, p. 38-47, 2017.

VITERBO, Ada et al. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma spp.* in the biocontrol of fungal plant pathogens. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1-4, p. 549-556, 2002.

VIZCAINO, Juan A. et al. Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three *Trichoderma* sections. **Mycological Research**, v. 109, n. 12, p. 1397-1406, 2005.

WINN, M. et al. Recent advances in engineering nonribosomal peptide assembly lines. **Natural product reports**, v. 33, n. 2, p. 317-347, 2016.

YANG, Qian. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Trichoderma harzianum*. **CURRENT APPLIED SCIENCE AND TECHNOLOGY**, v. 7, n. 2-1, 2007.

YANG, Liming et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of SOD gene to *Trichoderma harzianum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 353-358, 2010.

YANG, Liming et al. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of ChiV gene to *Trichoderma harzianum*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 163, n. 8, p. 937-945, 2011.

YAO, Lin et al. Isolation and expression of two polyketide synthase genes from *Trichoderma harzianum* 88 during mycoparasitism. **Brazilian journal of microbiology**, v. 47, n. 2, p. 468-479, 2016.

ZHONG, Yao Hua et al. *Agrobacterium*-mediated transformation (AMT) of *Trichoderma*

*reesei* as an efficient tool for random insertional mutagenesis. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 73, n. 6, p. 1348-1354, 2007.