



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE DOUTORADO EM BIOLOGIA MOLECULAR

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO
DE UMA EXO- β -1,3-GLUCANASE
ENVOLVIDA NO MECANISMO DE MICOPARASITISMO
DE *Trichoderma asperellum*

CESAR MARCOS MARCELLO

Brasília – DF
Agosto de 2008



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE DOUTORADO EM BIOLOGIA MOLECULAR

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO
DE UMA EXO- β -1,3-GLUCANASE
ENVOLVIDA NO MECANISMO DE MICOPARASITISMO
DE *Trichoderma asperellum*

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

Aluno: CESAR MARCOS MARCELLO

Orientador: Prof. Cirano José Ulhoa
Laboratório de Enzimologia
Universidade Federal de Goiás
Goiânia, Goiás.

Brasília – DF
Agosto de 2008

DEDICATÓRIA

A Deus:

Por permitir desenvolver mais esta etapa em minha vida.

A minha Esposa:

Rachel Otoni, pelo estímulo constante, carinho e compreensão.

Aos meus Pais:

Raimundo e Odila, pelo apoio constante, confiança e estímulo.

Aos meus Irmãos:

Sirlei, Silvana e Ronaldo, pelo estímulo aos estudos e apoio constante.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cirano José Ulhoa, do Instituto de Ciências Biológicas do Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Goiás, meu especial agradecimento pela orientação, estímulo científico e amizade.

Ao Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus, do Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Biologia Molecular, da Universidade Federal de Goiás, pela colaboração na orientação deste trabalho.

A Prof. Dra. Silvana Petrofeza, do Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás, pela colaboração na orientação deste trabalho.

A Prof. Dra. Lídia Pepe, do laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília – UnB, pela colaboração e orientação durante o preparo da biblioteca de cDNA.

A Prof. Dra. Maria Sueli Felipe, do laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília – UnB, pela orientação no início deste trabalho e apoio para realização da PCR *real time*.

A Roberto Nascimento da Silva, do Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Enzimologia, da Universidade Federal de Goiás, pela amizade, discussão nos experimentos moleculares e convivência durante a realização deste trabalho

A Valdirene Neves Monteiro, do Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Enzimologia, da Universidade Federal de Goiás, pela amizade, discussão nos ensaios enzimáticos, colaboração e convivência durante a realização deste trabalho

Ao Andrei Stecca Steindorff, do Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Enzimologia, da Universidade Federal de Goiás, pela amizade, apoio e colaboração na parte experimental.

A Simoneide Souza Silva, do laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília – UnB, pelo apoio durante o experimento PCR em tempo real.

A todos os docentes do curso de pós-graduação em Biologia Molecular, do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília – UnB, pela didática e envolvimento científico.

A Ana e Sandra funcionárias da secretaria da secretaria de pós-graduação em Biologia Molecular, do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília – UnB, pela atenção e orientação dispensada.

Ao Dr. Dráuzio Medeiros reitor da Instituição Educacional Matrogrossense - IEMAT, pelo apoio durante os primeiros dois anos da realização deste trabalho.

A Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Mato Grosso (SES-MT), pelo apoio durante a realização deste trabalho.

A Gilberto e Terezinha Benedetti pela disponibilidade de estadia em Goiânia durante os experimentos no *campi* da Universidade Federal de Goiás – UFG e pelo apoio constante.

A Francisco Garcia e Siloé Benedetti Garcia pelo apoio durante os experimentos no *campi* da Universidade Federal de Goiás – UFG.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	viii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xi
Resumo.....	xii
<i>Abstract</i>	xiii
I - INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Fungos do gênero <i>Trichoderma</i>	16
1.2 Micoparasitismo.....	21
1.3 Enzimas β -1,3-glucanases.....	25
1.4 <i>Trichoderma asperellum</i> e micoparasitismo.....	28
1.5 Justificativa.....	32
II - OBJETIVOS.....	36
III - MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1. Meios de cultura, tampões e soluções.....	37
3.2. Plasmídeo, linhagem bacteriana e marcadores	40
3.3. Origem e manutenção dos fungos.....	41
3.4. Teste de confronto em placa	41
3.5 Cultivo de <i>R. solani</i> e purificação da parede celular.....	41
3.6 Cultivo de <i>T. asperellum</i> e produção de β -1,3 glucanases.....	42
3.7 Determinação atividade enzimática de β -1,3 glucanase.	43
3.8 Dosagem de proteínas totais.....	43
3.9 Determinação da atividade enzimática em gel.....	44
3.10 Extração ácidos nucleicos de <i>T. asperellum</i>	44
3.11 Síntese de oligonucleotídeos e seqüenciamento.....	45
3.12 Clonagem do gene tag de <i>T. asperellum</i>	48
3.13 RT-PCR E PCR.....	49

IV-RESULTADOS.....	51
4.1 Avaliação da produção de α -1,3-glucanases em diferentes fontes de carbono.....	51
4.2 Cinética de produção de α -1,3-glucanase.....	53
4.3 Caracterização do gene.....	55
4.4 Estudos moleculares da interação in vivo entre <i>T.</i> <i>asperellum</i> e <i>R. solani</i>	60
VI- DISCUSSÃO.....	62
VII- CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>act</i>	Gene da actina de <i>Trichoderma asperellum</i>
AGN 13.2	Endo- α -1,3-glucanase de <i>Trichoderma asperellum</i>
ADNS	Ácido dinitrosalicílico
BDA	Meio agar dextrose batata
BLASTN	Basic local alignment search tool nucleotide
<i>bgn</i>	Gene de endo- α -1,3-glucanase de <i>Trichoderma virens</i>
<i>bgn</i> 13.1	Gene de endo- α -1,3-glucanase de <i>Trichoderma harzianum</i>
<i>bgn</i> 16.2	Gene de α -1,6-glucanase de <i>Trichoderma harzianum</i>
<i>bgn</i> 3.2	Gene 1 de endo- α -1,6-glucanase de <i>Acremonium blochii</i>
<i>bgn</i> 6.2	Gene 2 de endo- α -1,6-glucanase de <i>Acremonium blochii</i>
BSA	Albumina sérica bovina
<i>chit</i> 36	Gene de quitinase de <i>T. asperellum</i>
<i>cmg</i> 1	Gene de exo- α -1,3-glucanase de <i>Coniothyrium minitans</i>
C-terminal	Carboxi-terminal
Da	Dalton
D.O.	Densidade ótica
E.C.	Classificação enzimática
<i>ech</i> 42	Gene de endoquitinase de <i>Trichoderma harzianum</i>
EST	<i>Expressed sequence tags</i>
<i>et al.</i>	E colaboradores
EXC	N-acetilglucosaminidase de <i>Trichoderma asperellum</i>
<i>exg</i> 1	Gene de exo- α -(1,3)-glucanase de <i>Cochliobolus carbonum</i>
<i>exg</i> A	Gene de exo- α -(1,3)-glucanase de <i>Ampelomyces quisqualis</i>
<i>exg</i> S	Gene de exo- α -(1,3)-glucanase de <i>Aspergillus saitoi</i>
<i>glu</i>	Fragmento do gene de α -(1,3)-glucanase de <i>T. asperellum</i>
<i>gluc</i> 78	Gene de exo- β -1,3-glucanase de <i>Trichoderma atroviride</i>
GLUC110	Enzima exo- α -1,3-glucanase de <i>Trichoderma harzianum</i>
GLU19	Enzima endo- α -1,3-glucanase de <i>Trichoderma asperellum</i> de 19 kDa
GLU83	Enzima exo- α -1,3-glucanase de <i>Trichoderma asperellum</i> de 83 kDa

ITS	Espaço interno do transcrito de rDNA
<i>lamA1</i>	Gene de endo- α -(1,3-1,6)-glucanase de <i>T. viride</i>
<i>lam 1.3</i>	Gene exo- α -1,3-glucanase de <i>Trichoderma harzianum</i>
LB	Meio Lúria-Broth
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
N-terminal	Amino-terminal
PAP	Proteases do tipo A e B de <i>Trichoderma asperellum</i>
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBHYD1	Hidrofobina de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>pbhyd1</i>	Gene de hidrofobina de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Rpm	Rotações por minuto
T.A.	Temperatura ambiente
<i>Tag</i>	Gene de α -1,3-glucanase de <i>Trichoderma asperellum</i>
TAG	Proteína α -1,3-glucanase de <i>Trichoderma asperellum</i>
Taglu	Oligonucleotídeo específico de <i>tag</i> usado na RT-PCR
TASHYD	Hidrofobina de <i>Trichoderma asperellum</i>
<i>Tef</i>	Gene do fator de alongação de <i>Trichoderma asperellum</i>
TEX1	Enzima peptídeo sintase de <i>Trichoderma asperellum</i>
TLE	Meio de cultura líquido para fungos
Tm	Temperatura de anelamento
TM	Marca registrada
T00	Linhagem de fungo <i>Trichoderma asperellum</i>
UFG	Universidade Federal de Goiás
UnB	Universidade de Brasília
V	Volts

LISTA DE FIGURAS

1- Ciclo de vida geral de fungos.....	16
2- Estrutura e ultraestrutura do <i>Trichoderma asperellum</i> (T00).....	20
3- Micrografia da zona de interação entre culturas de <i>Trichoderma asperellum</i> e <i>Rhizoctonia solani</i>	29
4- Estratégia para o isolamento do cDNA de <i>tag</i> de tamanho completo.....	47
5- Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de α -1,3-glucanases de <i>T. asperellum</i>	52
6- Cinética de produção de α -1,3-glucanases de <i>T. asperellum</i>	54
7- Seqüência de nucleotídeos do gene de α -1,3-glucanase de <i>T. asperellum</i> e aminoácidos deduzidos.....	59
8- Confronto em placa de petri entre <i>T. asperellum</i> e <i>R. solani</i>	60
9- Confronto simulando micoparasitismo entre <i>T. asperellum</i> e <i>R. solani</i>	61

LISTA DE TABELAS

1- Enzimas α -1,3-Glucanases produzidas por fungos do gênero <i>Trichoderma</i> spp.....	27
2- Características de α -1,3-glucanases TAG83 e TAG19, produzidas por <i>T. asperellum</i> da linhagem T00.	32
3- Oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de PCR e RT-PCR.....	46
4- Oligonucleotídeos utilizados para caracterização do gene de $\text{exo-}\beta$ -1,3-glucanase de <i>T. asperellum</i>	46
5- Oligonucleotídeos usados no PCR quantitativo.....	50
6- Relação de genes que apresentaram identidade <i>T. asperellum</i>	55
7- Relação de proteínas α -1,3-glucanases com identidade com a $\text{exo-}\alpha$ -1,3-glucanase, de <i>T. asperellum</i>	56

RESUMO

Espécies do gênero *Trichoderma* têm sido encontrados atacando uma grande variedade de fungos patogênicos e usados como agente de biocontrole. A maioria das preparações a base de *Trichoderma*, utilizadas comercialmente para controle biológico, são de *Trichoderma atroviride* ou *Trichoderma harzianum*. Entretanto, *Trichoderma asperellum*, uma espécie pouco estudada, é um efetivo agente de controle biológico contra alguns fungos patogênicos. A interação de *T. asperellum* com *Rhizoctonia solani* é característica de micoparasitismo, envolvendo crescimento em direção ao hospedeiro, produção de estruturas semelhantes à apressórios e enrolamento das hifas. A maioria dos fungos fitopatogênicos possui parede celular contendo quitina, organizada em camadas regularmente ordenadas e β -1,3-glucanas arranjadas como um enchimento de maneira amorfa. Quitinases e β -1,3-glucanases tem sido diretamente envolvidas nas interações de micoparasitismo entre espécies de *Trichoderma* e seus hospedeiros. Neste trabalho nós apresentamos a análise da expressão de exo- β -1,3-glucanases produzidas por *T. asperellum* durante o crescimento em diferentes fontes de carbono. Também demonstramos que a expressão do gene *tag83* ocorre quando o *T. asperellum* cresce sob simulação de antagonismo contra *R. solani*. Estudamos a regulação do gene codante da exo- β -1,3-glucanase extracelular (*tag83*) produzida pelo micoparasita *T. asperellum*. Foi detectada atividade enzimática em todas as fontes de carbono avaliadas, com níveis elevados encontrados quando amido e parede celular de *R. solani* foram utilizados. Estes resultados são apoiados pela presença de uma forte banda com atividade enzimática em gel não-desnaturante (PAGE). Experimentos utilizando RT-PCR demonstrou que a indução da exo- β -1,3-glucanase em *T. asperellum* ocorrem em nível transcricional. Também utilizamos RT-PCR e PCR em tempo real para analisar a expressão do gene *tag83* durante ensaio *in vivo* do *T. asperellum* contra *R. solani*. Demonstramos ainda que a expressão de *tag83* está significativamente aumentada na presença de *R. solani*.

ABSTRACT

Species of the genus *Trichoderma* have been found to attack a wide range of plant-pathogenic fungi and have been used as biocontrol agents. The majority of *Trichoderma* preparations used commercially for biological control are *Trichoderma atroviride* or *Trichoderma harzianum*. However, *Trichoderma asperellum*, a less well studied species, is also an effective biological control agent against some phytopathogen fungi. The interaction of *T. asperellum* with *Rhizoctonia solani* is characteristically mycoparasitic, involving growth along the host hyphae, production of appressoria-like structures and coiling. Most phytopathogenic fungi have cell wall that contain chitin as a structural backbone arranged in regularly ordered layers and α -1,3-glucan as a filling material arranged in an amorphous manner. Chitinases and α -1,3-glucanases have been found to be directly involved in the mycoparasitism interaction between *Trichoderma* species and its hosts. In this study, we reported the analysis of expression of the exo- β -1,3-glucanase encoding gene *tag83* produced by *T. asperellum* during growth in different carbon sources. We also show that expression of *tag83* gene occurs when *T. asperellum* grows under simulated antagonism against *R. solani*. The regulation of the gene encoding the extracellular exo- α -1,3-glucanase (*tag83*) produced by the mycoparasite *Trichoderma asperellum* was studied. Enzyme activity was detected in all carbon sources, but highest levels were found when starch and purified cell walls from *Rhizoctonia solani* were used. These results are supported by the appearance of one strong band with enzyme activity in non-denaturing PAGE. Experiments using RT-PCR showed that exo- β -1,3-glucanase induction in *T. asperellum* occurred at the transcriptional level. We used RT-PCR and real-time PCR analysis to examine the expression of *tag83* gene during in vivo assay of *T. asperellum* against *R. solani*. We showed that the expression of *tag83* is significantly increased by the presence of *R. solani*.

I - INTRODUÇÃO

1.1 Fungos do gênero *Trichoderma*

Fungos são seres eucariontes, unicelulares ou pluricelulares, formados por hifas e com parede celular constituída basicamente por glucanas e quitina. São heterotróficos com reprodução sexuada e assexuada (Figura 1).

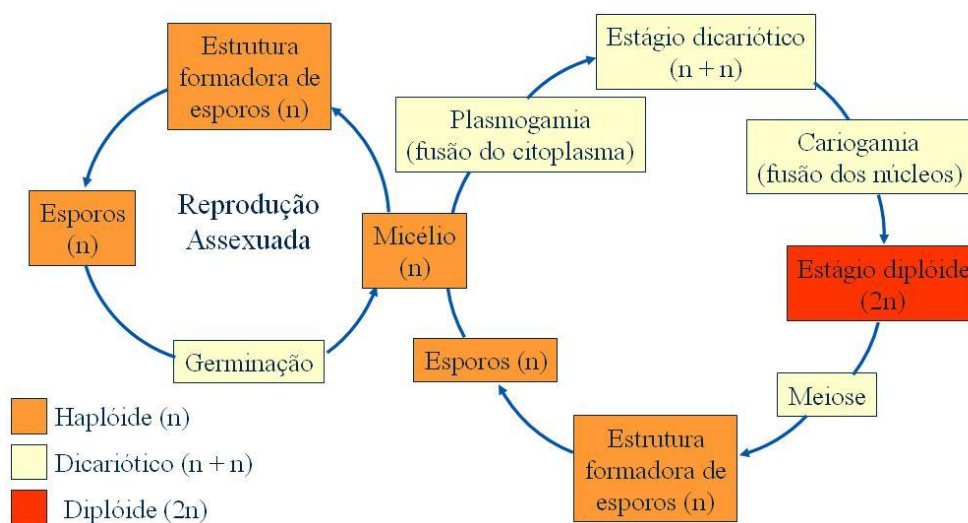


Figura 01 - Ciclo de vida geral de fungos.

O gênero *Trichoderma* vive tanto livremente quanto parasitando outros fungos, e pode ser encontrado em praticamente todo tipo de solo, na rizosfera de plantas e em matéria orgânica em decomposição, pois utilizam vários compostos como fonte de carbono e nitrogênio (VITERBO, HAREL E CHET, 2004; DRUZHININA E KUBICEK, 2005). Estes fungos fazem parte da classe mitospórica, subclasse hifomiceto, ordem moniliales (HAWKSWORTH *et al.* 1995).

As colônias podem apresentar-se dispersas e flocosas, ou compactadas em tufos. É observada a formação de clamidósporos, os quais são esporos de característica assexual, originados por modificações de segmentos das hifas. Em algumas espécies há dependência da luz para a esporulação (GRESSEL E HARTMANN, 1968; SAMUELS, 1996; LI *et. al.*,

2005). O fato das espécies deste gênero apresentarem crescimento em vários substratos torna este grupo de grande interesse biotecnológico.

Espécies do gênero *Trichoderma* têm sido investigadas como agentes de controle biológico durante cerca de 70 anos. Atualmente, acredita-se que este gênero compreende mais de 30 espécies agregadas. A partir do trabalho pioneiro de Weindling (1932), onde foi constatada a capacidade de *Trichoderma lignorum* (Tode) Harz. (= *Trichoderma viride* Pers.:Fr.) parasitar importantes patógenos de solo em cultura, vários trabalhos visando a utilização de espécies do gênero *Trichoderma* spp. para fins de controle biológico de fitopatógenos tem sido desenvolvidos (HADAR, CHET E HENIS, 1979; CHET E BAKER, 1980 e 1981; BEAGLE-RISTAINO E PAPAIVIZAS, 1985; KWOK *et al.*, 1987; CHET E INBAR, 1994; AGOSIN E AGUILERA, 1998; HARMAN *et al.*, 2004).

Diversos estudos avaliaram a utilização de espécies do gênero *Trichoderma* no controle biológico de fitopatógenos. A maioria dos trabalhos são relacionados com *T. harzianum* (KITAMOTO *et al.*, 1987; DE LA CRUZ *et al.*, 1995a; MELO E AZEVEDO, 1998; COHEN-KUPIEC *et al.*, 1999; KUBICEK *et al.*, 2001; NORONHA E ULHOA, 2000; BENÍTEZ *et al.*, 2004). Entretanto, estudos recentes de variabilidade genética indicam que nem todos os isolados descritos como *T. harzianum*, ou como outros *Trichoderma* spp., são de fato pertencentes a estas espécies (LIECKFELDT *et al.*, 1999). Dados obtidos através de análise molecular mostram que fungos descritos como *Trichoderma harzianum* ou *Trichoderma viride*, são pertencentes à espécie *Trichoderma asperellum* (SAMUELS, LIECKFELDT E NIRENBERG, 1999; DRUZHININA E KUBICEK, 2005).

Hermosa *et al.* (2000), realizaram análise de regiões espaçadoras internas do gene de rDNA (ITS) de 17 isolados utilizados em biocontrole e descritos como *T. harzianum*, verificando que consistem em pelo menos quatro espécies diferentes, *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. atroviride* e *T. longibrachiatum*. Em outro estudo, Kubicek *et al.* (2001) investigaram a identidade de oito isolados de *T. harzianum* que produziam endoquitinases de 42 kDa., eles analisaram regiões ITS 1 e 2 do rDNA e parte do gene *ech42*, observando forte evidencia que dentre os oito isolados havia pelo menos 3 diferentes espécies: *T. harzianum*, *T. atroviride* e *T. asperellum*.

Reforçando a elevada diversidade genética descrita na literatura (SAMUELS, 1996; KULLNIG, SZAKACS E KUBICEK, 2000), em outro estudo, Kubicek, *et al.* (2003) isolaram noventa e seis cepas de *Trichoderma* spp. no solo da região sudeste da Ásia, destes, setenta e oito foram classificados de acordo com características morfológicas, bioquímicas e através de análise das regiões ITS. As seguintes espécies foram descritas: *T. virens* (16 isolados), *T. spirale* (8 isolados), *T. koningii* (3 isolados), *T. atroviride* (3 isolados), *T. asperellum* (4 isolados), *T. viride* (2 isolados), *T. reesei* (2 isolados), *T. hamatum* (1 isolado), *T. ghanense* (1 isolado) e *T. harzianum/inhamatum* (37 isolados), sendo que 4 isolados apresentam tanto características de *T. harzianum* quanto de *T. longibrachiatum*.

No sul da China também foi encontrado um fungo deste gênero, denominado *T. aureoviride* (BURTSEVA *et al.*, 2003). Mais recentemente, a variabilidade genética foi verificada em análise filogenética por Hermosa *et al.* (2004) com 69 isolados de *Trichoderma* spp., obtidos de diferentes localizações geográficas e selecionados como agentes de biocontrole. Os dados foram obtidos através de análise das regiões ITS e do gene do fator de alongação (*tef1*). Mais de 50% foram agrupados como pertencentes à seção *Pachybasium*, destes, 81% *T. harzianum* e *T. inhamatum* e 16% como *T. virens*. Dentro da seção *Trichoderma* spp. foram incluídos 36% das 69 linhagens, sendo 56% agrupados com *T. asperellum*, 24% como *T. viride*, *T. atroviride* ou *T. koningii*. Somente 10% foram localizados na seção *Longibrachiatum*.

Estes dados evidenciam a grande diversidade genética em fungos do gênero *Trichoderma* spp., a qual deve ser explorada sob o ponto de vista biotecnológico, tanto para o desenvolvimento de agentes de controle biológico de patógenos de plantas como para produção de compostos biológicos, como enzimas e antibióticos.

Lima (2002), através de cultura monospórica, purificou quarenta e seis isolados de *Trichoderma* spp., provenientes de solo do cerrado brasileiro e os caracterizou com base em aspectos morfológicos e moleculares (análise da seqüência ITS 1 e 2). Em seu estudo, a espécie mais freqüentemente isolada foi *T. harzianum* (34 isolados), seguida por *T.*

asperellum (4 isolados, sendo 1 deles denominado linhagem T00), *T. koningii* (3 isolados) e *T. spirale* (2 isolados). Três isolados constituíram um grupo com características peculiares com conídios lisos e elipsóides e culturas com pronunciado odor de coco, podendo constituir uma espécie ainda não descrita, embora a digestão da região do rDNA desses isolados, com enzimas de restrição *Eco* RI, *Hha* I, *Bam* HI e *Msp* I, tenha mostrado o mesmo perfil apresentado por isolados de *T. koningii*, sugerindo ser esta espécie. Variação morfológica foi encontrada especialmente em isolados de *T. koningii* e *T. harzianum*. As enzimas de restrição foram capazes de produzir padrões distintos de digestão na população analisada, demonstrando elevada variabilidade genética entre estes isolados.

Lima (2002), utilizando microscopia eletrônica, analisou a morfologia do *T. asperellum* (T00) e observou zonas de intensa conidiação, com conidióforos apresentando fiálides pareadas e relativamente ampuliformes, típicas desta espécie. Descreveu também conídios de aspecto verrugoso de formato subgloboso a ovóide (Figura 2).

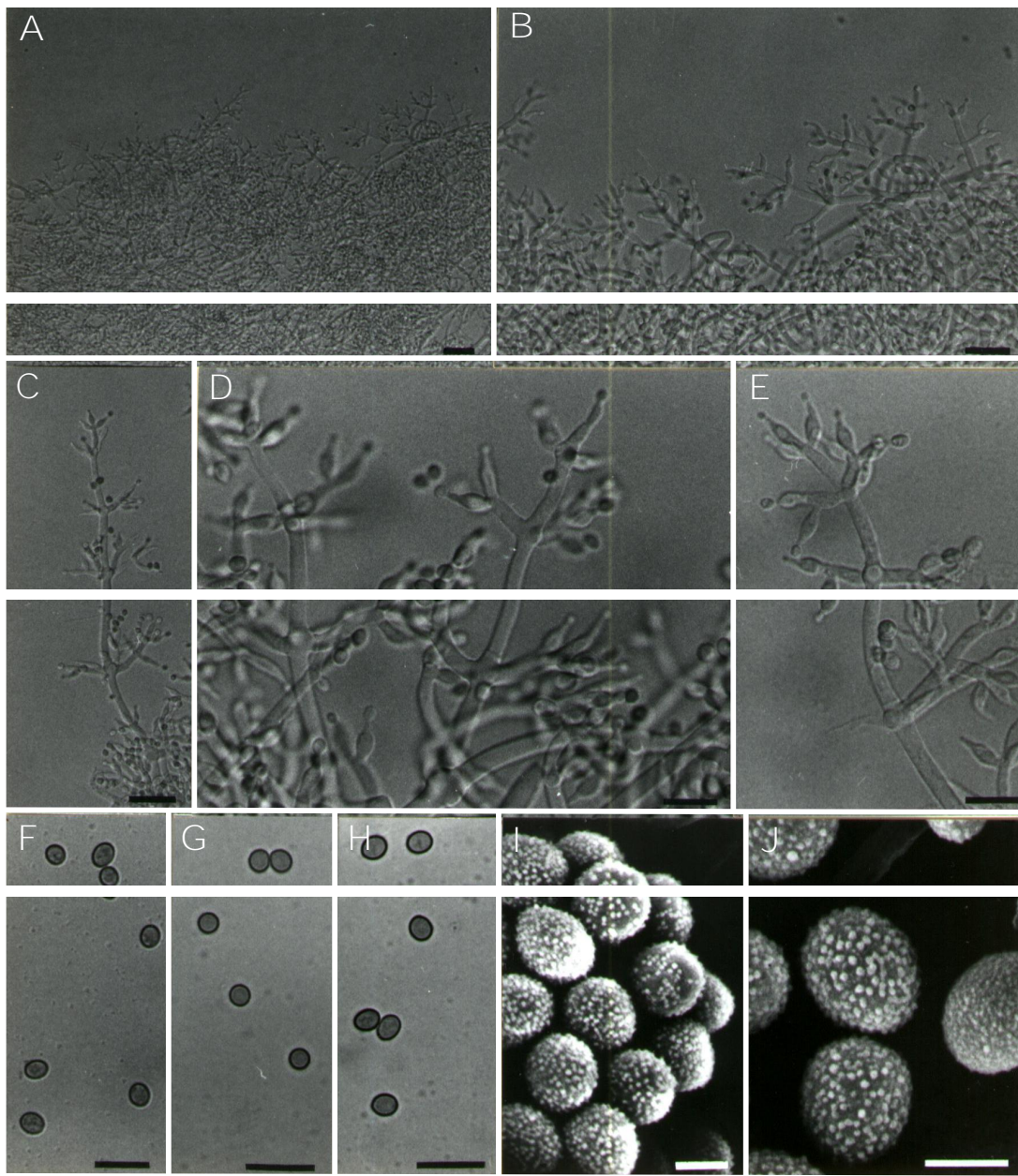


Figura 2 - Estrutura e ultraestrutura do *Trichoderma asperellum* (T00). A) Zona de intensa conidiação (pústulas). Bar = 30 μm ; B) Idem figura 2A, porém com maior aumento. Bar = 20 μm C) Porção do conidióforo mostrando as fiálides relativamente ampuliformes. Bar = 20 μm ; D) Parte apical do conidióforo mostrando fiálides pareadas, típicas da espécie. Bar = 10 μm E) Outra porção do conidióforo evidenciando as fiálides pareadas e em verticilo de 3. Bar = 10 μm . F, G e H) Conídios subglobosos a ovóides. Bar = 10 μm . I e J) Conídios a elevada magnificação (MEV), evidenciando o aspecto verrugoso. Bar = 5 μm e 0,5 μm , respectivamente (LIMA, 2002).

1.2 Micoparasitismo

Os fungos do gênero *Trichoderma* spp. são potentes antagonistas de outros fungos, inibindo o seu crescimento (LORITO, 1998; KUBICEK *et al.*, 2001; WITKOWSKA E MAJ, 2002), e por esta razão são considerados importantes no biocontrole de fitopatógenos como o *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani*, que causam prejuízos em culturas de maçã, rabanete, beterraba, milho, soja, tomate, morango, entre outras (INBAR *et al.*, 1994; LIMA, *et al.*, 1997; YEDIDIA, BENHAMOU E CHET, 1999; MELO E AZEVEDO, 1998; KUBICEK *et al.*, 2001; COTXARRERA *et al.*, 2001; GEORGAKOPOULOS *et al.*, 2002; BRUNNER *et al.* 2003; HERMOSA *et al.*, 2004; MONTEIRO E ULHOA, 2006). Por este motivo, o gênero possui elevado potencial de aplicação comercial.

O *T. asperellum* é uma espécie ainda pouca estudada, e tem se mostrado efetivo como agente de controle biológico em doenças germinativas de sementes de arroz (WATANABE *et al.*, 2006), desenvolvendo micoparasitismo contra fungos fitopatogênicos como *R. solani* (TRILLAS *et al.*, 2006), *Fusarium sporotrichioides* (GROMOVYKH *et al.*, 2002) e *F. oxysporum* (COTXARRERA *et al.*, 2001).

O micoparasitismo é um processo sequencial que envolve reconhecimento, contato, adesão, competição por nutrientes, expressão de genes específicos e secreção de metabólitos antifúngicos (HERRERA-ESTRELLA E CHET, 1998; HARAN, SCHINCKLER E CHET, 1996; BENÍTEZ *et al.*, 2004).

Inicialmente o *Trichoderma* spp. cresce em direção a hifa hospedeira, enrola-se e forma estruturas denominadas apressórios, que penetram na parede celular do hospedeiro, favorecendo a entrada e posterior crescimento dentro da hifa do hospedeiro (HERRERA-ESTRELLA E CHET, 1998). Benhamou e Chet (1993) descreveram que inicialmente o *Trichoderma* spp. promove uma desorganização na estrutura da parede celular do fitopatógeno e um conseqüente desequilíbrio osmótico interno levando a uma retração da membrana plasmática e agregação no citoplasma. Na interação do *Trichoderma* spp. com *S. rolfsii* foi observado

uma retração e agregação do citoplasma e quebra de vacúolos do fitopatígeno (BENHAMOU E CHET, 1996). Já o estudo realizado por Benhamou e Chet (1997), mostrou que na interação entre as hifas de *Trichoderma* spp. e *Pythium ultimum*, o micoparasita produz glucanases, celulasas e antibióticos propiciando a sua invasão nas células do hospedeiro.

A expressão de genes associados com o biocontrole parece ser regulada por uma cascata de transdução de sinal intracelular, ativada pela ligação a moléculas derivadas do hospedeiro e pode envolver a sinalização via proteína G, bem como via proteína quinase mitógeno ativada (MAPK) (ZEILINGER E OMANN, 2007). Estudos com o genoma de *T. reesei* e *T. atroviride* revelou 16 proteínas relacionadas com proteína G. Rocha-Ramirez *et al.* (2002) analisaram a subunidade alfa da proteína G em *T. atroviride*, denominada *Tga1* e mostraram seu envolvimento com o enrolamento e conidiação. A deleção do gene desta subunidade da proteína G reduz os níveis de AMPc e afeta o processo de crescimento vegetativo, a produção de metabolitos antifúngicos e a formação de quitinases (REITHNER *et al.* 2005), demonstrando o envolvimento da proteína G, pelo menos parcialmente, em biocontrole. Em ensaio de antagonismo utilizando o mutante que sofreu deleção de *Tga1*, demonstrou a incapacidade deste *Trichoderma* lisar a parede celular do hospedeiro (ZEILINGER E OMANN, 2007). Gustin e colaboradores (1998), analisaram genes MAPK em fungos filamentosos. Sabe-se que a MAPK esta envolvida com a fosforilação seqüencial de proteínas resultando em controle da expressão de genes relacionados com processos morfológicos e de resposta ao estresse. Em *T. virens*, a MAPK de classe I YERK1 foi descrita com resultados contraditórios em relação à produção de enzimas quitinases e proteases envolvidas com o processos de micoparasitismo (MENDOZA-MENDOZA *et al.* 2003; MUKHERJEE *et al.* 2003).

O mecanismo de ação em biocontrole do *Trichoderma* spp. pode ser explicado em termos de competição nas interações com o fungo hospedeiro. No processo de competição, as duas populações têm crescimento e sobrevivência prejudicados, o que representa uma relação negativa, já na produção de antibióticos, o fungo produz tanto antibióticos

voláteis quanto não-voláteis (HERRERA-ESTRELLA E CHET, 1998; MARTINS-CORDER E MELO, 1998; HARMAN, 2000; HERMOSA *et al.*, 2004; SHORESH *et al.*, 2006).

Um grupo de enzimas líticas, incluindo glucanases, quitinases e proteases, são produzidas durante ação micoparasítica (HARMAN, 2000). Estas enzimas agem de forma sinérgica na degradação da parede celular do hospedeiro e apresentam um importante papel no mecanismo de biocontrole (EL-KATATNY *et al.* 2001; LORITO *et al.* 1994a, 1994b; LORITO, 1998; VITERBO *et al.* 2002; MARTIN *et al.*, 2007). Estudos ultra-estruturais e histoquímicos mostram que estas enzimas causam lise localizada da parede celular dos fitopatógenos (HERRERA-ESTRELLA E CHET, 1998; LIMA, 2002). A presença de acúmulos de quitina e fibrilas de α -glucanas na parede celular indica que a lise de suas hifas durante o micoparasitismo é realizada por α -glucanases, quitinases e proteases (FELIX, 2006). Inúmeros trabalhos sobre a ação de enzimas na hidrólise da parede de fungos fitopatogênicos têm sido publicados (CHET, 1987; CHET E INBAR, 1994; DE LA CRUZ *et al.*, 1992, 1995; LIMA *et al.*, 1997; DE MARCO *et al.*, 2000; MARTIN *et al.*, 2007). Fungos do gênero *Trichoderma* spp. são grandes produtores destas enzimas, que degradam parede celular dos hospedeiros (BRUNNER *et al.*, 2003; AGOSIN E AGUILERA, 1998; KUBICEK *et al.*, 2001) e também antibióticos (SCHIRMBÖCK *et al.*, 1994; KUBICEK, *et al.*, 2007). O *T. asperellum* produz antibióticos peptídicos da superfamília das trichotoxinas (CHUTRAKUL E PEBERDY, 2005).

A parede celular serve de barreira às ações exercidas pelos microrganismos, sendo considerada como o ponto inicial das interações envolvidas no processo de antagonismo entre fungos. Os fungos têm parede celular constituída principalmente por quitina e β -1,3-glucanas, possuindo em menor quantidade proteínas, β -1,6-glucanas e outros polissacarídeos (BARTINICK-GARCIA, 1968). A quitina e β -glucanas estão embebidas na matriz de material amorfo, a quitina parece estar protegida pelas β -glucanas, dificultando o acesso das enzimas quitinases (CHÉRIF E BENHAMOU, 1990). Então, é provável que a atuação de quitinases seja precedida com a atuação de β -1,3-glucanases produzidas por *Trichoderma*

spp., por isso estas enzimas extracelulares têm sido consideradas das principais hidrolases envolvidas no processo de micoparasitismo (PEBERDY, 1994; KUBICEK *et al.*, 2001; MARTIN *et al.*, 2007; ZEILINGER E OMANN, 2007), além de celulases e proteases.

Os sistemas celulolíticos mais bem caracterizados em fungos são os que pertencem ao gênero *Trichoderma* spp. O sistema do *T. reesei* consiste em três classes gerais de enzimas: a) Exo-glucanase 1,4- β -D-glucana celobiohidrolase, que age sobre as extremidades não-redutoras da cadeia de celulose liberando unidades celobiosídicas; b) Endo-glucanase 1,4- β -D-glucana-4-glucanohidrolase, a qual cliva as ligações glicosídicas de forma aleatória, e; c) 1,4- β -D-glucosidase, que por sua vez cliva celooligossacarídeos para produção de glicose (KUBICEK, 1992).

As proteases, ainda pouco estudadas em *Trichoderma* spp., referem-se a todas as enzimas que clivam ligações peptídicas, podendo ser classificadas quanto às condições hidrogeniônicas ideais para sua ação (ácidas, neutras e alcalinas), quanto à especificidade ao substrato (colagenase, elastase, etc.), ou quanto à similaridade com proteases bem caracterizadas (pepsina, tripsina, catepsina, etc.) (KUBICEK, 1992). Muitos fungos produzem proteases capazes de hidrolisar suas próprias proteínas. Foi observada, em isolados de *T. harzianum*, a produção de proteases em meio de cultura líquida, apresentando propriedade de hidrolisar a parede celular de fungos fitopatogênicos (DE MARCO E FELIX, 2002; KREDICS *et al.*, 2005).

As quitinases são um conjunto de enzimas produzidas por fungos, incluindo do gênero *Trichoderma* spp., que tem sido envolvido em processos de modelagem da quitina, além de atuar na digestão das paredes celulares dos fungos hospedeiros (LORITO, 1998). Quitinases (E.C. 3.2.1.14, E.C. 3.2.1.30) são enzimas relacionadas com o micoparasitismo (KUBICEK *et al.*, 2001; VITERBO *et al.*, 2002; MARTIN *et al.*, 2007). Quando quitinases degradam paredes celulares de fungos, liberam oligômeros que induzem a expressão de outros genes de enzimas hidrolíticas, acentuando assim o ataque ao hospedeiro (VITERBO *et al.*, 2002). Desta forma, as hidrolases produzidas pelo *Trichoderma* durante o

micoparasitismo agem de forma sinérgica degradando a parede dos fungos hospedeiros.

1.3 Enzimas β -1,3-Glucanases

As β -glucanas, melhor denominadas β -glicanas, formam um grupo de polissacarídeos com unidades de β -D-glicose, abundantes na natureza. Algumas são moléculas relativamente simples constituídas de cadeias lineares de resíduos glicosil, outras são complexas e podem ser constituídas por cadeias lineares ou ramificadas. A sua principal função é como polímero estrutural, porém a natureza e localização das β -glicanas de parede celular indicam que elas também podem ser degradadas e usadas como fonte nutricional após a exaustão de nutrientes. Outra função importante é a de proteger as células contra a desidratação, por formação de uma mucilagem extracelular que encapsula a hifa (PITSON, SEVIOUR E MCDOUGALL, 1993; MARTIN *et al.*, 2007).

A produção de enzimas que degradam β -glucanas é uma característica atribuída a uma ampla variedade de organismos (PITSON, SEVIOUR E MCDOUGALL, 1993). As β -(1,3)-glucanases parecem estar presentes em uma grande diversidade de fungos (MOUYNA *et al.*, 2002). Muitas estão associadas com a parede celular, onde mostra importante papel em vários processos morfogénéticos (ADAMS, 2004). Os fungos do tipo *Trichoderma* spp. são importantes produtores de β -1,3-glucanases. Em *T. harzianum* as β -1,3-glucanases produzidas foram associadas à parede celular e também secretadas no meio de cultura (GOHL *et al.*, 1998). O mecanismo de secreção destas enzimas ainda não foi descrito, mas acredita-se que seja o mesmo das outras enzimas fúngicas, ou seja, após serem produzidas no citoplasma, são estocadas em vesículas do complexo de golgi, que migram para a membrana citoplasmática e fundem-se a esta, liberando seu conteúdo no espaço periplasmático. Em fungos filamentosos, essas vesículas localizam-se apicalmente ou em sítios adjacentes as

regiões de ramificações das hifas (PITSON, SEVIOUR E MCDOUGALL, 1993).

As β -1,3-glucanases podem ser classificadas de acordo com o mecanismo de hidrólise. As $\text{exo-}\beta$ -1,3-glucanases (E.C. 3.2.1.58) hidrolisam cadeia de β -1,3-glicanas pela clivagem seqüencial de resíduos de glicose a partir da extremidade não redutora, tendo conseqüentemente a glicose como produto da hidrólise. As $\text{endo-}\beta$ -1,3-glucanases (E.C. 3.2.1.39) clivam aleatoriamente a cadeia da β -1,3-glicana, liberando oligossacarídeos menores. Ações sinérgicas entre estas duas enzimas, com diferentes modos de ação, são comuns em fungos que degradam polímeros de β -1,3-glucanas (PITSON, SEVIOUR E MCDOUGALL, 1993).

Dentre as β -1,3-glucanases purificadas, as mais estudadas são aquelas produzidas por isolados de *T. harzianum*. Estas enzimas foram identificadas com massas moleculares que variam de 17 a 110 kDa, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1 – Enzimas α -1,3-Glucanases produzidas por fungos do gênero *Trichoderma* spp.

Ação α -1,3-Glucanase	Massa (kDa)	Espécie Avaliada	Referências Bibliográficas
Exo	40	<i>T. harzianum</i>	DUBOURDIEU <i>et al.</i> , 1985
Exo	31	<i>T. harzianum</i>	KITAMOTO <i>et al.</i> , 1987
Endo	76	<i>T. harzianum</i>	LORITO <i>et al.</i> , 1994 ^a
Endo	78	<i>T. harzianum</i>	DE LA CRUZ <i>et al.</i> , 1995 ^a
Endo	36	<i>T. harzianum</i>	NORONHA E ULHOA, 1996
Endo	17	<i>T. harzianum</i>	THRANE, TRONSMO E JENSEN, 1997
Exo	110	<i>T. harzianum</i>	COHEN-KUPEIC <i>et al.</i> , 1999
Exo	29	<i>T. harzianum</i>	NORONHA E ULHOA, 2000
Exo	75	<i>T. harzianum</i>	RAMOT, COHEN-KUPEIC E CHET, 2000
Endo	74	<i>T. harzianum</i>	EL-KATATNY <i>et al.</i> , 2001
Exo	83	<i>T. asperellum</i>	BARA, LIMA E ULHOA 2002
Endo	19	<i>T. asperellum</i>	SILVA, 2005
Endo	79	<i>T. koningii</i>	MONTEIRO E ULHOA, 2006

Trichoderma spp. produzem tanto β -1,3-glucanases de forma constitutiva, quanto controlada por mecanismos regulatórios, que incluem a indução e repressão catabólica. Porém, não se sabe se elas são produtos de genes diferentemente processados a partir de um mesmo gene ou de genes distintos (DE LA CRUZ *et al.*, 1995a).

Foram realizados estudos de caracterização e clonagem do gene *bgn* 13.1 que codifica uma endo- β -1,3-glucanase, a GLUC78 de *T. harzianum*. A expressão desta enzima foi induzida por parede celular ou micélio autoclavado, sendo reprimida por glicose (DE LA CRUZ *et al.*, 1995a). Cohen-Kupiec *et al.*, (1999) clonaram o gene *lam* 1.3 que codifica uma exo- β -1,3-glucanase, a GLUC110 de *T. harzianum*. Esta enzima apresenta uma região C-terminal, rica em cisteína, que pode se ligar a componentes de membrana ou de parede celular.

Alguns genes de α -glucanases de *Trichoderma* spp. relacionados ao micoparasitismo foram clonados (SHORESH *et al.*, 2006; MONTERO *et al.*, 2007). O primeiro gene de α -glucanase fúngica, clonado e seqüenciado foi de uma α -1,6-glucanase (*bgn*16.2) de *T. harzianum* (LORA *et al.*, 1995). Em seguida, o gene de endo- α -1,3-glucanase (*bgn*13.1) do mesmo organismo foi clonado e seqüenciado (DE LA CRUZ *et al.*, 1995b). Um

experimento aproximadamente similar foi realizado com sucesso para isolar genes codificadores de exo- β -1,3-glucanases de *Cochliobolus carbonum* (*exg1*) (NIKOLSKAYA *et al.*, 1998), *T. harzianum* (*lam1.3*) (COHEN-KUPIEC *et al.*, 1999), *T. atroviride* (*gluc78*) (DONZELLI *et al.*, 2001), *Acremonium blochii* (*bgn3.2*) (MARTIN *et al.*, 2006) e *Aspergillus saitoi* (*exgS*) (ODA *et al.*, 2002). Os genes codificadores de endo- α -1,6-glucanase de *A. blochii* (*bgn6.2*) (MARTIN *et al.*, 2007) e o endo- α -(1,3-1,6)-glucanase de *T. viride* (*lamA1*) (NOBE *et al.*, 2004) foram também isolados e identificados. Até a realização deste trabalho, as β -1,3-glucanase de *T. asperellum* não tinham sido clonadas. Recentemente, em trabalho de Gao, Wu e Yang (2008), o gene de uma α -1,3-glucanase de *T. viride* foi clonado e posteriormente expresso em *Pichia pastoris*.

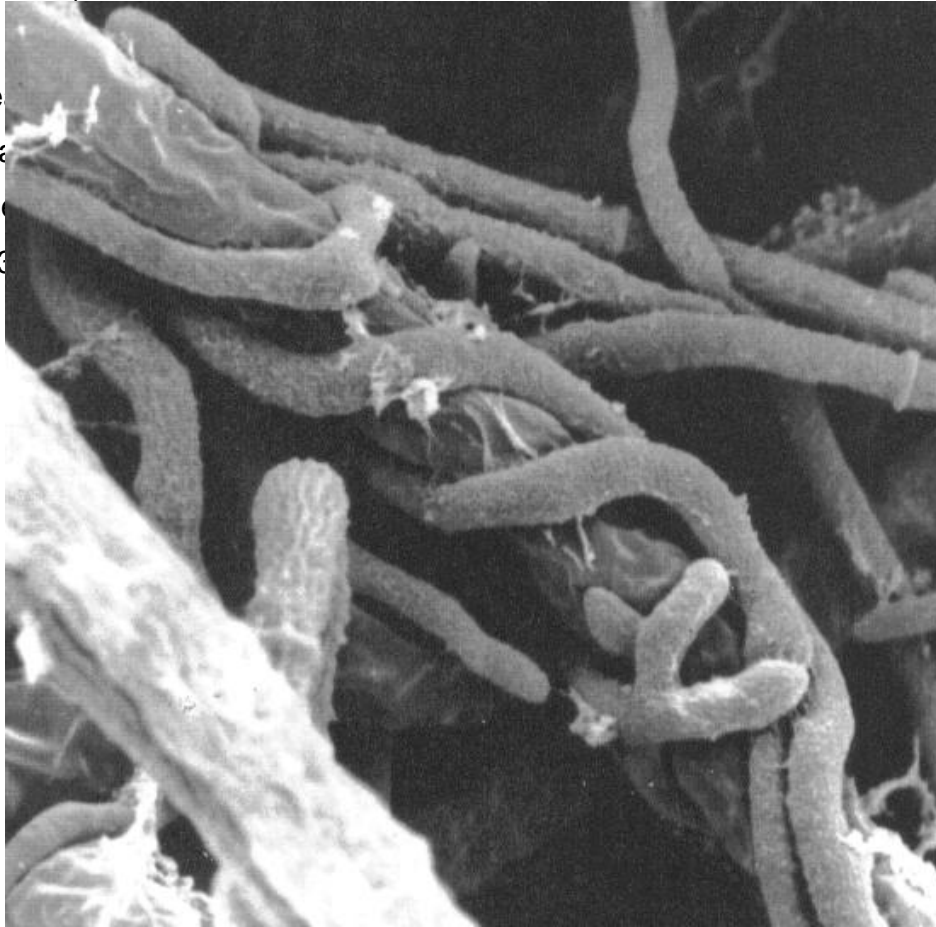
Todos os genes de exo- α -1,3-glucanases descritos em fungos parecem possuir similaridades em sua seqüência. Um fragmento obtido por enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* do cDNA do gene *exg1* foi usado na hibridização para isolar um gene similar de uma livreria genômica, codificador de uma exo- α -1,3-glucanase, a *exgA* de *Ampelomyces quisqualis* (ROTEM; YARDEN E SZTENJNBERG, 1999). Um alinhamento destes produtos deduzidos de genes *lam1.3*, *exg1* e *exgA* permitiu o desenho de oligonucleotídeos degenerados para PCR, e o isolamento de um gene codificador de uma exo- β -1,3-glucanase de *Coniothyrium minitans* (*cmg1*) (GICZEY *et al.*, 2001). Regiões conservadas de exo- α -1,3-glucanases também foram exploradas para desenhar oligonucleotídeos para PCR. Esta mesma região serviu como base para desenhar sondas para a triagem de uma biblioteca genômica de *T. virens*, a estratégia resultou em dois supostos genes de endo- α -(1,3)-glucanases, a *bgn1* e *bgn2* (KIM *et al.*, 2002).

1.4 *Trichoderma asperellum* e micoparasitismo

O potencial do fungo *T. asperellum* em micoparasitismo foi avaliado inicialmente na supressão do *Fusarium* em culturas de tomate

(COTXARRERA *et al.*, 2001) e com parede celular de *Rhizoctonia solani* (BARA, 2002).

em pare
verificar
enrolam
(Figura 3



do
ue
m
ão

Figura 3 – Micrografia da zona de interação entre culturas de *Trichoderma asperellum* (T00) e *Rhizoctonia solani*, crescidos em meio BDA por 48 h., demonstrando o enrolamento do *T. asperellum* sobre a *R. solani* (BARA, 2002).

Bara (2002), demonstrou que o *T. asperellum* (T00), quando cultivado na presença de parede celular de *R. solani*, produz atividade de α -1,3-glucanase, demonstrando que dentre as enzimas envolvidas no processo de degradação da parede celular, as α -1,3-glucanases figuram entre as possíveis candidatas.

Estudos recentes avaliaram a expressão de genes relacionados ao mecanismo de micoparasitismo em quatro espécies de *Trichoderma* spp, incluindo o *T. asperellum*. Eles examinaram 8.160 EST's (*expressed sequence tags*) de genes altamente expressos em condições relacionadas ao biocontrole (VIZCAÍNO *et al.*, 2007).

Duas proteases denominadas PAP A e PAP B foram secretadas durante a colonização de *T. asperellum* em cultura de pepino. A PAP A mostrou-se constitutiva e a PAP B demonstrou sofrer indução da transcrição durante confronto com *R. solani*. Estes dados indicam que estas proteínas são ativamente secretadas pelo *T. asperellum* durante colonização de culturas de pepino e que a protease PAP B se relaciona com o micoparasitismo de *T. asperellum* contra *R. solani* (VITERBO, HAREL E CHET, 2004).

Chutrakul e Peberdy (2005), descreveram o gene *pes* que codifica a enzima peptídeo sintetase relacionada com a proteína TEX1. Esta proteína é reconhecida pela função *peptaibol* sintetase e produz antibióticos que podem estar envolvidos com o mecanismo de micoparasitismo de *T. asperellum*.

Viterbo e Chet (2006), estudaram a expressão de hidrofobinas em *T. asperellum* e discutiram o envolvimento destas com o micoparasitismo. Eles observaram que a hidrofobina TASHYD1 é diferencialmente expressa durante interação do fungo com a planta. Esta hidrofobina apresentou homologia com a hidrofobina de classe I PBHYD1 do fungo dimórfico e patogênico do homem *Paracoccidioides brasiliensis*. Recentemente foi verificado hidrofobinas em 29 espécies de *Trichoderma* spp. (NEUHOF *et al.*, 2007). De maneira característica, hidrofobinas apresentam regiões hidrofílicas e hidrofóbicas com oito resíduos de cisteína arranjados em um padrão de espaçamento bastante conservados. Elas encontram-se ubiquitinizadas e localizadas na superfície externa da parede das hifas, sendo envolvidas geralmente em mecanismos de biossinalização entre o fungo e o ambiente, além de adesão com o hospedeiro (WESSELS, 1997).

Viterbo *et al.*, (2002) descreveram a clonagem e estudos de expressão de uma quitinase, a *chit36* de *T. asperellum*. Este gene foi clonado por técnicas de PCR utilizando oligonucleotídeos baseados em seqüências de quitinases de *T. harzianum*. Eles mostraram que a produção desta enzima é regulada por fontes de carbono, nitrogênio, quitina e N-acetilglucosamina.

Foi reportada a purificação, caracterização e clonagem da AGN 13.2, uma *exo- α -1,3-glucanase* de *T. asperellum*, sua expressão foi

avaliada durante processo de micoparasitismo simulado em placa (SANZ *et al.*, 2004). Os autores encontraram que este gene é altamente expresso durante confronto entre *T. asperellum* e *Botrytis cinerea*.

Duas proteínas, a EXC1Y e a EXC2Y, com atividade N-acetilglucosaminidase, foram purificadas de *T. asperellum* após crescimento em meio contendo N-acetilglicosamina como fonte de carbono e nitrogênio. Ambas apresentaram-se reguladas por pequenas moléculas solúveis produzidas durante a interação com o patógeno, visto que a expressão aconteceu antes do contato, sugerem ainda que estas moléculas possam ser a N-acetilglicosamina ou glicosamina, geradas pela ação de N-acetilglucosaminidases constitutivas (RAMOT *et al.*, 2004).

Estudos do grupo de pesquisa do Laboratório de Enzimologia, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Goiás (UFG), demonstraram que o *T. asperellum* (T00), isolado e caracterizado por Lima (2002), produz pelo menos duas isoformas de β -1,3-glucanases, uma de 83,1 kDa (TAG 83) e a outra com 19 kDa (TAG19). Estas enzimas foram identificadas através de atividade em gel, e posteriormente purificadas e caracterizadas (BARA, 2002; SILVA, 2005). O resumo das principais características destas enzimas é apresentado na Tabela 2.

Estas enzimas com atividade de β -1,3-glucanase foram produzidas quando o fungo *T. asperellum* (T00) foi crescido em meio suplementado com parede celular de *R. solani*. A isoforma com atividade de exo- β -1,3-glucanase, com massa molecular de 83,1 kDa (TAG83), foi purificada, caracterizada e apresentada por Bara (2002). Esta enzima corresponde à atividade enzimática de maior intensidade secretada no sobrenadante da cultura de *T. asperellum* (T00). A outra enzima, com atividade endo- β -1,3-glucanase, com massa molecular de 19 kDa (TAG19) foi caracterizada por Silva (2005) em *T. asperellum* (T00) e apresentada em sua dissertação de mestrado.

Tabela 2 – Características de β -1,3-glucanases TAG83 e TAG19, produzidas por *T. asperellum* da linhagem T00.

Características	TAG83	TAG19
Massa Molecular em gel SDS-PAGE (kDa)	83,1	19
pH ótimo	5,1	3,6
Temperatura ótima (°C)	55	45
Mecanismo de ação	Exo*	Endo*
Referência bibliográfica	BARA, 2002.	SILVA , 2005.

* Atividade avaliada com laminarina como substrato.

Conforme demonstrado em ensaios *in vivo* durante testes de confronto em placa, o isolado de *T. asperellum* utiliza-se de mecanismo de micoparasitismo. No entanto, vários fatores devem ser considerados até a utilização em campo deste fungo no controle biológico. Dados observaram que a eficiência varia de acordo com a linhagem de *Trichoderma* spp. utilizada (HERRERA-ESTRELLA E CHET, 1998). Alternativas como enriquecimento do solo com nutrientes metabolizados preferencialmente pelo micoparasita, e combinação de tratamento micoparasita e fungicida, também devem ser avaliadas.

Trabalhos de pesquisa vêm sendo desenvolvidos no laboratório de enzimologia ICB/UFG, no sentido de estudar a expressão de genes envolvidos no processo de micoparasitismo, dentre eles, aqueles que se relacionam com as enzimas β -1,3-glucanases descritas por Bara, (2002) e por Silva (2005).

1.5 Justificativa

Infecções causadas por fungos fitopatogênicos, entre eles *R. solani*, causam perdas de até 100% na produção de culturas suscetíveis, que resultam na ocorrência e severidade de doenças como as podridões radiculares (*F. solani* e *R. solani*), mofo branco (*S. sclerotiorum*), podridão

cinzenta da haste (*Macrophomina phaseolina*) e murcha de fusário (*F. oxysporum*), isoladas ou simultâneas em áreas cultivadas. As perdas também podem ser indiretas, como o aumento do custo de produção com controle químico e a condenação de áreas destinadas à produção de sementes (MESTRIES *et al.*, 1998; GORODECKI E HADAR, 1990; WITKOWSKA E MAJ, 2002).

Diversos trabalhos visando à utilização de espécies de fungos filamentosos, dentre eles do gênero *Trichoderma* spp. para fins de controle biológico de patógenos de planta tem sido descritos (KITAMOTO *et al.*, 1987; DE LA CRUZ *et al.*, 1995a; MELO E AZEVEDO, 1998; COHEN-KUPIEC *et al.*, 1999; KUBICEK *et al.*, 2001; NORONHA E ULHOA, 2000; BENÍTEZ *et al.*, 2004; INBAR *et al.*, 1994; LIMA, *et al.*, 1997; YEDIDIA, BENHAMOU E CHET, 1999; MELO E AZEVEDO, 1998; KUBICEK *et al.*, 2001; COTXARRERA *et al.*, 2001; GEORGAKOPOULOS *et al.*, 2002; BRUNNER *et al.*, 2003; HERMOSA *et al.*, 2004; MONTEIRO E ULHOA, 2006). Este fato, deve-se, principalmente, ao aumento da conscientização da opinião pública sobre os danos causados por pesticidas químicos ao ambiente, bem como sobre a possibilidade da presença de resíduos carcinogênicos nos alimentos (RAGSDALE E SISLER, 1994; GULLINO E KUIJPERS, 1994), além da constante preocupação quanto ao surgimento de patógenos resistentes aos fungicidas disponíveis no mercado (HJELJORD E TRONSMO, 1998). O controle biológico é altamente desejável, mesmo quando associado a outros métodos, por promover menor impacto ambiental e, conseqüentemente, menor desequilíbrio ecológico (BETTIOL, 1991). Uma das alternativas à redução da aplicação de fungicidas químicos para o controle de doenças de plantas é a utilização de fungicidas a base de produtos naturais originados de organismos como o *Trichoderma* spp. Nesse sentido, as inúmeras estratégias de sobrevivência e proliferação de espécies de *Trichoderma* spp., como o rápido crescimento, capacidade de produzir antibióticos e atacar outros fungos, bem como sua elevada capacidade de degradar a parede celular de fungos fitopatogênicos, o tornam de elevado interesse para fins de controle biológico (HJELJORD E TRONSMO, 1998).

Por outro lado, é de conhecimento corrente entre pesquisadores que trabalham com controle biológico, que candidatos de elevado potencial para controle de patógenos em condições experimentais restritas, podem ser incapazes de produzir os mesmos resultados em condições de campo. Isto se deve ao fato de que as condições de armazenamento e aplicação são mais críticas para organismos biológicos, uma vez que estes estão mais sujeitos a reações diferenciais do hospedeiro e ambiente, fazendo com que se tenha uma eficácia de controle mais variável do que a obtida com fungicidas químicos (CALLAN *et al.*, 1997). Essa característica (reação diferencial a fatores bióticos e abióticos) faz com que um passo fundamental no desenvolvimento de agentes de biocontrole seja o desenvolvimento de uma formulação apropriada, a qual vise superar limitações ambientais e proporcionar ao antagonista uma vantagem competitiva em relação ao patógeno (s) e organismos da microflora nativa (HJELJORD E TRONSMO, 1998; FRAVEL, 2005). Felizmente, o acúmulo de informações quanto à capacidade antagônica e habilidade de colonização e proliferação em diferentes habitats, associado a sistemas de produção massal, formulação e aplicação eficientes, tem levado ao desenvolvimento de produtos estáveis a base de *Trichoderma* spp. (principalmente *T. harzianum*). Tais produtos, como RootShield™, T-22 Planter Box™ e Trichodex™, já se encontram em comercialização nos Estados Unidos, Europa e Israel (HARMAN, 2000).

Tendo em vista que o gênero *Trichoderma* spp. apresenta espécies de elevado potencial para utilização como agentes de controle biológico de doenças de plantas, especialmente se considerarmos a crescente demanda por produtos orgânicos (GULLINO E KUIJPERS, 1994) e, a contínua elevação dos custos e restrições à utilização de fungicidas químicos (RAGSDALE E SISLER, 1994), trabalhos como este, que busquem avaliar o mecanismo de micoparasitismo para utilização em programas de controle biológico devem ser estimulados. Além disso, o entendimento do modo de ação das hidrolases, principalmente quitinases, N-acetilglucosaminidases e α -1,3-glucanases, na degradação da parede celular do fitopatógeno, são mecanismos que se elucidados permitirão a utilização destas espécies.

A escassez de trabalhos avaliando o micoparasitismo do *T. asperellum* e o fato de estar sendo confundido por algum tempo com outros

fungos do gênero *Trichoderma* spp. (COTXARRERA *et al.*, 2001; LIECKFELDT *et al.*, 1999; SAMUELS, LIECKFELDT E NIRENBERG, 1999; DRUZHININA E KUBICEK, 2005) abre caminho para novos estudos com esta espécie.

Estimulado pelos estudos preliminares com *T. asperellum* (T00) isolada do solo do Distrito Federal e a observação do seu rápido crescimento (LIMA, 2002), seguida pela demonstração do potencial micoparasita em ação contra *R. solani* (BARA, LIMA, E ULHOA, 2003), e a verificação de rápida produção de pelo menos duas isoformas de α -1,3-glucanases quando crescido com parede celular de *R. solani* (BARA, 2002; SILVA, 2005), nos propusemos analisar o gene de α -1,3-glucanase de *T. asperellum* (T00) e seu envolvimento com o micoparasitismo.

II. OBJETIVOS

Visando contribuir para o estudo do *Trichoderma asperellum* como agente de controle biológico, avaliou-se a expressão do gene de α -1,3-glucanase e sua contribuição para a ação micoparasita contra o fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani*. Para tanto, foi proposto os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a produção de α -1,3-glucanases por *T. asperellum* (T00), após crescimento em diferentes fontes de carbono;
- Avaliar a produção de α -1,3-glucanases por *T. asperellum* (T00), durante o crescimento na presença de parede celular de *R. solani*;
- Caracterizar o gene de uma α -1,3-glucanase, a TAG83 de *Trichoderma asperellum* (T00);
- Avaliar a expressão do gene de α -1,3-glucanase em situações de confronto *in vivo* em modelo de simulação do micoparasitismo entre *T. asperellum* (T00) e *R. solani*.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Meios de Cultura, tampões e soluções utilizadas

Meio BDA

Glicose	2,00 % (p/v)
Ágar	1,50 % (p/v)
Caldo de Batata	20,0 % (v/v)

Meio TLE

Peptona	0,10 % (p/v)
Uréia	0,03 % (p/v)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,14 % (p/v)
KH ₂ PO ₄	0,20 % (p/v)
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,03 % (p/v)
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,02 % (p/v)
Glicose	0,5 % (p/v)
Elementos traços (CuSO ₄ , FeSO ₄ , ZnSO ₄ , MnSO ₄)	

Os meios foram autoclavados a 120°C por 20 min.

Meio Lúria-Broth (LB)

Peptona de caseína	1,0 % (p/v)
Extrato de levedura	0,5 % (p/v)
NaCl	1,0 % (p/v)

O pH ajustado para 7,2 com NaOH 5M.

Meio Luria-ágar (L)

Ágar	1,5 %
Meio Lúria (qsp)	1000 mL

Os meios foram autoclavados a 120°C por 20 min.

Meio MYG

Extrato de malte	0,5 % (p/v)
Extrato de levedura	0,25 % (p/v)
Glicose	1,0 % (p/v)
Ágar	2,0 % (p/v)

Tampão de Ligação 10X (New England Biolabs®)

Tris-HCl pH 7,4	0,50 M
MgCl ₂	0,10 M
DTT	0,10 M
Espermidina	0,01 M
ATP	0,01 M

Tampão da *Taq* DNA Polimerase 10X

Tris-HCl pH 8,3	0,1 M
KCl	0,5 M
BSA	0,1 % (p/v)
MgCl ₂	15 mM

Tampão TE

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

Solução de equilíbrio

Tris-HCl pH8,0	100 mM
NaCl	100 mM

Glicerol 70%

Glicerol	70 % (v/v)
----------	------------

Tampão de Corrida para Gel de Agarose - TEB (10X)

Trizma base	0,89 M
Ácido bórico	0,89 M
EDTA	0,02 M

O pH é ajustado para 8,0 com ácido bórico.

Tampão de Amostra para Gel de Agarose (10X)

Glicerol	50 % (v/v)
Azul de bromofenol	0,1 % (p/v)
Xileno cianol	0,1 % (p/v)

Solução de Brometo de Etídio

Brometo de Etídio	30 mM
-------------------	-------

Tampão de Corrida para SDS-PAGE

Trizma base	125 mM
Glicina	960 mM
SDS	0,5 % (p/v)

O pH é ajustado para 8,3.

Tampão de Amostra 2X para SDS-PAGE

Tris-HCl pH 6,8	62,5 mM
SDS	5,0 % (p/v)
glicerol	25,0 % (v/v)
β -mercaptoetanol	5,0 % (v/v)
azul de bromofenol	0,01% (p/v)

Gel Concentrador SDS-PAGE

Solução de Acrilamida/Bis (29:1)	8,0% (v/v)
Tris-HCl pH 6,8	125 mM
SDS	0,1 % (p/v)

Gel Separador SDS-PAGE

Solução de Acrilamida/Bis-acrilamida 30 % (29:1)	12 % (v/v)
Tris-HCl pH 8,8	400 mM
SDS	0,1 % (p/v)

Solução Descorante para Gel de SDS-PAGE

Metanol	40 % (v/v)
Ácido Acético	10 % (v/v)

DEPC 0,1%

DEPC 0,1% (v/v) em água milliQ

Após tratamento o DEPC era eliminado por volatilização

Ampicilina

Solução estoque: 50 mg/mL em água estéril.

Estocar protegida da luz, a -20°C.

3.2 Plasmídeo, linhagem bacteriana e marcadores utilizados

Bactéria *E. coli* XL1-Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F'**proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)*]

Plasmídeo pGEM-T Easy: 2975 pb, ori f1, amp^r, promotores T7 e SP6, lacZ, múltiplos sítios de clonagem (Promega[®], Madison, Wisconsin).

Foram ainda utilizados marcadores de massa molecular com a intenção de predizer o tamanho dos fragmentos nucleotídicos obtidos através de PCR e em géis de eletroforese de proteínas. Os seguintes marcadores foram usados:

- “100 bp Ladder” (Invitrogen) - Fragmentos de DNA de 100-1500 pb.
- “250 bp Ladder” (Invitrogen) - Fragmentos de DNA de 250-3500 pb.
- “1kb Ladder” (Invitrogen) - Fragmentos de DNA de 1000-12000 pb.
- “BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder” (Invitrogen) – Marcador de massa molecular pré-corado para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Contém 10 proteínas

modificadas cuja massa molecular varia de aproximadamente 10 a 190 kDa.

3.3 Origem e Manutenção dos fungos

Os isolados de *Trichoderma asperellum* e *Rizoctonia solani* foram provenientes da coleção do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (LE/ICB/UFG). O *T. asperellum* foi isolado de amostras do solo do cerrado (Plano de assentamento distrital – Brasília/DF), caracterizado por Lima (2002) e denominado linhagem T00. Os fungos foram mantidos separadamente em meio ágar BDA e crescidos por sete dias em temperatura ambiente e armazenados a 4° C com repiques mensais para manter as culturas.

3.4 Teste de confronto em placa entre *T. asperellum* (T00) e *R. solani*

Teste de pareamento, ou confronto entre culturas, foi realizado entre *T. asperellum* (T00) e o fungo fitopatogênico *R. solani*. Neste ensaio, foram crescidos isolados de *T. asperellum* (T00) e *R. solani* em placas de petri contendo meio de cultura MYG. Após 48 h. de crescimento a 28°C, um disco de 5 mm de cada isolado foi transferido para uma placa de 14 cm de diâmetro contendo meio MYG e uma camada de celofane para a retirada eficiente do micélio. Os discos de cultura foram colocados na mesma placa, a uma distancia de 10 cm entre eles para análise do crescimento durante confronto. Foi elaborada ainda uma placa controle onde foi utilizado dois discos isolados de *T. asperellum* (T00). Faixas de 5 mm foram coletadas para extração de RNA e análise dos transcritos, que foi procedida antes e após a interação entre ambos os fungos (Figura 9).

3.5 Cultivo de *R. solani* e purificação da parede celular

Para a produção de parede celular de *R. solani*, 10 discos de micélio crescidos em meio sólido BDA foram inoculados em frascos

erlenmeyer de 1.000 mL contendo 250 mL de meio líquido BDA. Estes frascos foram incubados à temperatura de 28° C sob agitação constante por 7 dias. Após este tempo o meio de cultura foi filtrado e o micélio coletado em papel de filtro, congelado, liofilizado e triturado com gral e pistilo. A amostra foi ressuspensa em solução de uréia 8 M (p/v), sonicada durante 30 segundos por 5 vezes. Em seguida o extrato de parede celular foi centrifugado por 15 min. sob rotação de 10.000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5417R®), o sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido, lavado com água destilada, e então ressuspensa em solução de hidróxido de amônio 1 M (v/v). Novamente o material foi sonicado durante 30 segundos por 3 vezes, centrifugado e lavado com água destilada como citado anteriormente. O precipitado de parede celular (PCRS) teve o pH ajustado em 6,0 e submetido à secagem por liofilização para ser usado como fonte de carbono para o crescimento de *T. asperellum* (MITCHEL E TAYLOR, 1969).

3.6 Cultivo de *T. asperellum* e produção de β -1,3 glucanases

A indução de β -1,3 glucanases de *T. asperellum* (T00) foi realizada *in vitro* com os esporos de *T. asperellum* sendo coletados em salina estéril e centrifugados a 2000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5417R®), lavados três vezes e usados como inóculo ($1,0 \times 10^7$ esporos/mL) que foi realizado em meio líquido TLE (25 mL em frascos de 125 mL), em pH 5,0 (ULHOA E PEBERDY, 1992). A cultura desenvolveu-se em frascos a 28°C sob constante agitação durante 24 h. O micélio foi isolado por filtração em papel filtro, lavados com 100 mL de salina estéril no intuito de eliminar qualquer resíduo do meio rico em glicose e transferidos para frascos estéreis com 25 mL de meio TLE sem glicose e adicionados com 0,5% de PCRS para avaliação do *T. asperellum* (T00) em situação de micoparasitismo *in vitro*. Amostras de micélio e do sobrenadante do meio TLE foram coletadas no tempo 4, 8, 12, 16, 20 e 24 h. Também foram coletadas amostras e avaliadas nos tempos 36, 48, 72 e 96 h. (dados não apresentados).

Para avaliar a produção de β -1,3-glucanases com diferentes fontes de carbono, o mesmo procedimento descrito acima foi utilizado, com meio TLE adicionado com glicose, amido, quitina, quitosana, celulose e PCRS, todos na concentração final do meio de cultura de 0,5%, crescidos sob constante agitação e coletados no tempo 24 h.

Todo o micélio, para ambos os experimentos (cinética e fontes de carbono), foi coletado, lavado 2 vezes com salina estéril, armazenado imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente utilizado para a extração de ácidos nucleicos e experimentos moleculares. O sobrenadante contendo enzimas secretadas foi utilizado para caracterização de proteínas e avaliação da atividade enzimática de β -1,3-glucanases.

3.7 Determinação da atividade enzimática de β -1,3 glucanase

A atividade β -1,3 glucanases foi determinada pela quantificação de açúcares redutores liberados pela mistura de 50 μ L da amostra enzimática do sobrenadante da cultura, com 100 μ L de laminarina 0,25% (Sigma), diluída em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 (SANTOS *et al.*, 1977), incubados em banho-maria a 40° C por 1 hora e interrompida a reação pela adição de 1 mL de Ácido Dinitro Salicílico (ADNS). Açúcares redutores produzidos neste período foram determinados pelo método descrito por Miller (1959). A concentração de açúcares redutores foi estimada após a quantificação espectrofotométrica a 550 nm. Uma unidade (U) de atividade de β -1,3 glucanases foi definida como a quantidade da enzima necessária para produzir 1 μ mol de açúcar redutor por minuto.

3.8 Dosagem de proteínas

O método de Bradford (1976) foi desenvolvido para dosagem de proteínas secretadas no sobrenadante do meio de cultura. Como padrão foi utilizada albumina sérica bovina (BSA-Sigma). A amostra liofilizada foi ressuspendida em solução de cloreto de sódio 0,9% e 1 mL da solução de

Bradford foi adicionado a 100 μ L desta amostra recomposta. A leitura foi realizada a 595 nanômetros após 10 min. a temperatura ambiente.

3.9 Determinação da atividade enzimática em gel

Para determinação da atividade de β -1,3 glucanases em gel de poliacrilamida não-desnaturante foi utilizado géis SDS-PAGE concentrador a 8% e separador a 12%, seguido de corrida eletroforética em temperatura de 4° C, sob voltagem constante de 70 V, conforme descrito por Noronha e Ulhoa (1996). O tampão de amostra não continha β -mercaptoetanol e as amostras não foram fervidas. Após a corrida o gel foi lavado com água destilada e incubado com tampão acetato de sódio (50 mM pH 5,0) por 15 min. sob agitação em temperatura ambiente (T.A.). Após este tempo, o gel foi transferido para uma solução contendo 0,5% de laminarina dissolvida em tampão acetato de sódio 25 mM (pH 5,0) a 40° C por 60 min. Após este período de incubação o gel foi lavado com solução contendo metanol, água e ácido acético (5:5:2) por 5 min, seguido de água destilada. Posteriormente foi transferido para solução reveladora (2,3,5-cloridrato de trifeniltetrazolium 0,15% em solução alcalina) e incubados em banho-maria a 100° C até o aparecimento das bandas. As regiões do gel contendo β -1,3 glucanases aparecem como bandas de coloração avermelhada (PAN, YE E KUE, 1989).

3.10 Extração de DNA e RNA de *T. asperellum* (T00)

O isolado do fungo *T. asperellum* (T00) foi crescido como descrito anteriormente. Amostra de micélio foi coletada a 12 h. após a inoculação. O micélio foi isolado por filtração em papel filtro e lavado com 100 mL de salina estéril. O micélio coletado foi armazenado imediatamente em nitrogênio líquido e utilizado para a extração de ácidos nucleicos. O DNA genômico e o RNA total do micélio foram extraídos com o reagente Trizol® (Gibco/BRL), de acordo com as instruções do fabricante. O micélio foi

pulverizado em nitrogênio líquido e transferido para tubos eppendorf's com 1,0 mL de reagente Trizol, agitado vigorosamente por 3 min. e incubado por 5 min. a T.A., adicionado 200 µL de clorofórmio, agitado e incubado por 3 min., centrifugado a 12.000 rpm por 15 min. a 4° C, transferido a fase aquosa para outro tubo para a extração de RNA e a interfase e fase fenólica utilizado para isolamento do DNA genômico. Ao sobrenadante foram adicionados 500 µL de isopropanol e incubado 10 min. a T.A., centrifugado a 12.000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5417R®) por 10 min. a 4° C, removido o sobrenadante e lavado o pellet com 1 mL de etanol 75%, centrifugado na mesma centrífuga a 7.500 rpm por 5 min. a 4° C, retirado o sobrenadante e seco a T.A. por 10 min. e ressuspensionado em 50 µL de água RNase *free*.

3.11 Síntese de oligonucleotídeos e seqüenciamento

Os oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de PCR genômica e de RT-PCR, para obtenção do cDNA de *exo-β-1,3-glucanase* de *T. asperellum* (*tag*) de tamanho completo, encontram-se descritos na tabela 3 e 4. Inicialmente foram sintetizados 2 pares de oligonucleotídeos degenerados, baseados em regiões conservadas de 2 genes *exo-β-1,3-glucanases*, a *exo* de *T. harzianum* (Nº de acesso AJ002397) (COHEN-KUPIEC *et al.*, 1999) e a *bgn* de *Hypocrea lixii* (Nº de acesso X84085) (DE LA CRUZ *et al.*, 1995a). Para o oligonucleotídeo EXO, foi utilizada as regiões conservadas do gene *exo*, codante para os aminoácidos YTVFRN, iniciando no códon 57 (bases 168 a 186) e GIHWPTA, a partir do códon 191 (base 573 a 594), com fragmento esperado de 426 bases. Para os oligonucleotídeos BGN foi utilizada a região conservada VVYIPPG, iniciando no códon 98 (base 295 a 316) e AYFPFG, a partir do códon 450 (base 1351 a 1369), com fragmento esperado de 1056 bases. O par de oligonucleotídeos EXO foi escolhido por apresentar melhor eficiência nos experimentos de amplificação do DNA genômico através de PCR. O produto obtido por reação de amplificação PCR foi confirmado ser *exo-β-1,3-glucanase* através de seqüenciamento do fragmento. Este produto foi

utilizado como molde para desenho de oligonucleotídeos específicos, o Taglu1 e 2, utilizado nos experimentos de RT-PCR e PCR.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de PCR e RT-PCR.

Nome	Seqüência (5' à 3')	Tamanho (mer)	GC (%)	Tm (°C)
EXO1	TACACMgTSTTCCgCAAC	18	39	54
EXO2	ggCTgTCggCCAgTggATACC	21	62	60
BGN1	gTYgTYTACATYCCCCggg	20	55	65
BGN2	gC AAAAgg AAAATAAgc	18	39	50
Taglu1	CACGGCAGCAATTAACAATG	20	45	53
Taglu2	GGGGTCGTTCCGGTTATTAT	20	50	54

Para seqüenciamento do gene completo, à medida que fomos obtendo seqüências de boa qualidade, novos oligonucleotídeos baseados nas seqüências dos fragmentos e no gene *exo*, serviam de molde para outros oligonucleotídeos, e assim sucessivamente, até se obter a seqüência completa do gene em um fragmento (*contig*) único. Todos os oligonucleotídeos utilizados neste experimento, tamanho, porcentagem de GC e Tm, são apresentados na Tabela 04.

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados para caracterização do gene de *exo-β-1,3-glucanase* de *T. asperellum* (T00).

Nome	Seqüência (5' à 3')	Tamanho (mer)	GC (%)	Tm (°C)
1F	TTGCATATAAGTAGGCCACT	20	40	50,9
2F	GGGGTTTMTACGCTCCGCCG	20	65	61,9
2R	CGGCGGAGCGTAKAAACCCC	20	65	61,9
3F	CCAACCATCAAGGCGACCGC	20	65	61,7
3R	GCCTGCGGTTCGCTTGATGG	20	70	64
4F	TGGGAGTGGGTTTACCAGGG	20	60	59,1
4R	CCCTGGTAAACCCACTCCC	19	63	57,7
5F	TTGTTGGAGAGGAATACCCATC	23	48	56,4
5R	GATGGGGTATTCTCTCCAACAA	23	48	56,4
6F	CTGCCAGMTACTACCAGCC	20	60	58,7
6R	GGCTGGTAGTAKCTGGGCAG	20	60	58,7
7F	TGGTGGTGCTAGARGGAGGAGT	25	56	67,7
7R	GCGTGACTCCTCCTCCYTCTAGCACC	26	61	67,7
8R	CACAAGGCCCGCAAGAGTGTAGCCC	25	64	65,7
9R	GAATGGCATCAATGCCAAGG	20	50	54,8

Em seguida, através de RT-PCR, e com os oligonucleotídeos desenhados para os flancos do gene (1R e 9R), obtivemos o produto cDNA do gene *tag* que foi utilizado para clonagem. Um esquema da estratégia geral para obtenção da seqüência completa deste gene é apresentado na Figura 4.

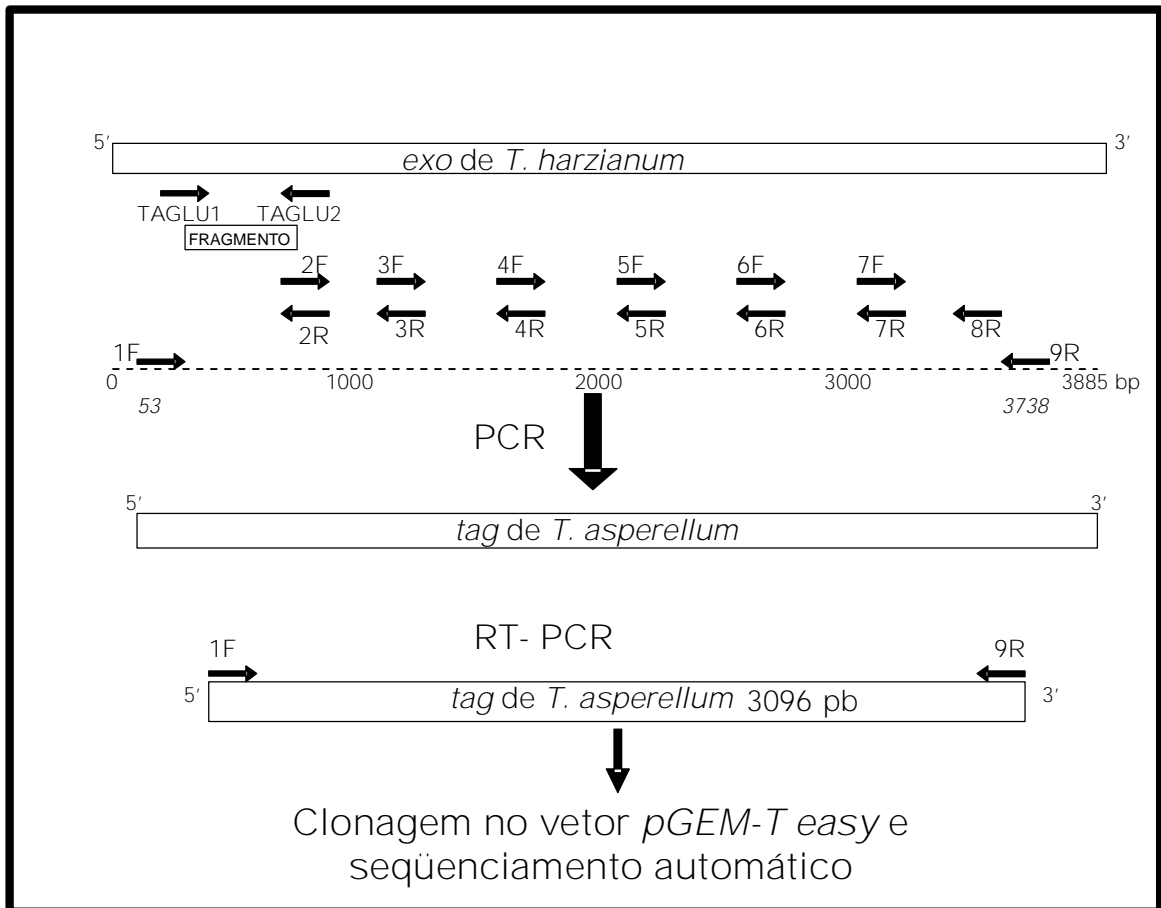


Figura 4 – Estratégia para o isolamento do cDNA do gene *tag* de tamanho completo. Os oligonucleotídeos utilizados encontram-se posicionados por setas e foram sintetizados de acordo com as seqüências nucleotídicas conservadas dos fragmentos obtidos e do gDNA da β -1,3 glucanase *exo* de *Trichoderma harzianum* de Cohen-Kupiec (1999) (*GenBank* AJ002397).

3.12 Clonagem do gene *tag* de *T. asperellum*

Os fragmentos do gene *tag*, obtidos nas reações de RT-PCR e de PCR genômica, após serem analisados através de eletroforese em gel de agarose 1%, foram purificados e clonados no vetor pGEM[®]-T Easy (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Os sistemas de ligação foram utilizados para transformar células competentes da linhagem XL-1 Blue de *Escherichia coli*, de acordo com o método de Inoue (1990). Procedeu-se um pré-inóculo das células de *E. coli* a serem transformadas com um clone isolado e incubou-se por 16 h. a 37°C. Deste pré-inóculo, 500 µL foi adicionado em 250 mL de meio LB, incubado por 3 h. a 37°C sob agitação, até atingir 0,5 D.O. a 600 nm. As células foram incubadas a 0°C por 10 min. e então foram coletadas por centrifugação a 5.000 g e ressuspendidas em 80 mL e incubados a 0°C por 10 min. Alíquotas de 1 mL foram processadas e mantidas a -80°C. No momento da transformação foi utilizado 200 µL de suspensão de células competentes e 10 µL do sistema de ligação, homogeneizados e incubados a 0°C por 30 min. Após choque térmico a 42°C por 2 min., foi adicionado 1,0 mL do meio Luria Broth que permaneceu sob agitação por 1 hora a 37°C. Uma alíquota deste sistema (cerca de 100 µL) foi utilizada para plaquear em meio Luria Broth-ágar, suplementado com ampicilina (100 µg/mL), IPTG (0,05 mM) e X-gal 0,05% (p/v), incubados por 16 h. a 37°C

As placas foram incubadas a 37 °C durante a noite e os clones brancos, não produtores de β-galactosidase, provavelmente correspondentes aos clones recombinantes, foram selecionados para extração dos plasmídeos e seqüenciamento automático.

3.13 RT-PCR E PCR

Foram coletadas amostras durante experimentos *in vitro* de cinética e fontes de carbono e *in vivo* no confronto em placa de petri. O RNA total foi extraído como descrito anteriormente para ácidos nucléicos e tratado com DNase I (livre de RNase, Promega), através da metodologia de RT-PCR (invitrogen® - SuperScript™) para gerar o cDNA de *T. asperellum* (T00) e também de *R. solani*. Os sistemas foram incubados em banho-maria a 37° C por 1 hora, e a seguir empregados nas reações de PCR.

Os controles empregados para as reações de RT-PCR foram um sistema contendo RNA com a omissão da enzima transcriptase reversa e um sistema sem RNA para controle das soluções e reagentes utilizados.

Análise quantitativa dos transcritos do gene β -1,3-glucanase de *T. asperellum* (T00) foi realizada por meio de PCR quantitativo em tempo real (PCR quantitativo em tempo real) (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001). Foram necessários novos oligonucleotídeos pois a metodologia disponível requeria fragmentos de 90-120 bp. Foi realizada análise de seqüências de genes constitutivos de *T. asperellum* no intuito de obter um controle interno. Foram então elaborados os oligonucleotídeos TEF, baseados em seqüências depositadas no *GenBank* para o gene do fator de alongação traducional (*tef*), descritos por Dodd, Lieckfeldt e Samuels (2001) e por Holmes (2003) (Nº de acesso AF456907 e AY376058) e os oligonucleotídeos ACT, baseados no gene da actina (*act*) de *T. asperellum* tendo como referencia o trabalho de Samuels *et al.* (2006) (Nº de acesso DQ111971). O par de oligonucleotídeos ACT demonstrou melhor eficiência em testes por PCR e assim foram usados para a PCR em tempo real. Também foram alinhadas as seqüências de *exo*- β -1,3-glucanases descritas anteriormente, a *exo* de *T. harzianum* (COHEN-KUPIEC, 1999) e a *bgn* de *T. hamatum* (DE LA CRUZ, 1995a) com o gene *tag* de *T. asperellum* (T00) caracterizada neste trabalho. A região de menor homologia, entre os códons 621 a 681 da proteína TAG de *T. asperellum* foi a escolhida como molde para os oligonucleotídeos específicos Tag. O tamanho dos fragmentos amplificados

na PCR apresentaram o tamanho esperado, 99 bp para Tag e 106 bp para ACT. A temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos foi 60°C. A especificidade dos oligonucleotídeos para os genes foi testada através da análise da curva de dissociação da reação de PCR (protocolo padrão do equipamento PCR tempo real) e seqüenciamento do produto. As seqüências dos oligonucleotídeos estão descritas na Tabela 05.

Tabela 05 – Oligonucleotídeos usados no PCR quantitativo em tempo real.

Nome	Seqüência (5' à 3')	Referência
Tag1	CACCCTACTACCAGCCAAATCC	MARCELLO <i>et al.</i> (2007)
Tag2	CAGAACTGCCGGAACAGGAG	(Nº de acesso EU314718)
ACT1	CGCCATTGCTCGTGTTGACATG	SAMUELS <i>et al.</i> (2006)
ACT2	AATTTCTCGCTCGGCGGTGGTG	(Nº de acesso DQ111971)

IV. RESULTADOS

4.1 Avaliação da produção de α -1,3-glucanases em diferentes fontes de carbono

A avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono na produção de α -1,3-glucanases de *T. asperellum* (T00) foi realizado em meio TLE suplementado com uma das seguintes fontes: glicose, amido, quitina, quitosana, celulose e parede celular de *R. solani* (PCRS), todos na concentração final do meio de cultura de 0,5%. Foi observado que a atividade específica de α -1,3-glucanase foi dependente do polissacarídeo utilizado como fonte de carbono (Figura 5A). A maior atividade enzimática específica foi encontrada com amido (0,020 U.mg⁻¹) e parede celular de *R. solani* (0,013 U.mg⁻¹). A atividade de α -1,3-glucanase também foi detectada em meios suplementados com glicose (0,008 U.mg⁻¹), quitina (0,004 U.mg⁻¹) quitosana (0,006 U.mg⁻¹) e celulose (0,005 U.mg⁻¹).

Com o objetivo de avaliar α -1,3-glucanases produzidas no meio de cultura, amostras (1 mL) do sobrenadante dos frascos com diferentes fontes de carbono foram coletadas, dialisadas, concentradas por liofilização e a atividade enzimática determinada em gel de poliacrilamida (8%) não desnaturante. Uma banda de atividade, correspondente a α -1,3-glucanase de *T. asperellum* TAG83, foi detectada nos meios contendo amido e parede celular de *R. solani* (Figura 5B).

Análise através de RT-PCR foi realizada no intuito de obter dados moleculares da expressão de α -1,3-glucanases em *T. asperellum* (T00). Para tanto, o mRNA foi extraído do micélio coletado nas diferentes condições de crescimento, em seguida foi realizada RT-PCR (Figura 5C), utilizando os oligonucleotídeos (Taglu) específicos para α -1,3-glucanase (Tabela 3). Foi observado a presença do mRNA do gene de α -1,3-glucanase em todas as fontes de carbono utilizadas. Os níveis mais baixos foram observados em presença de glicose e quitosana. A maior produção de mRNA foi observado na presença de parede celular de *R. solani* (Linha 6). Entretanto, significativos níveis de mRNA foram encontrados em amido,

quitina e celulose (Linhas 2, 3 e 5; respectivamente). Como controle neste experimento foi utilizado o gene do rDNA 18S, mostrando que os níveis de mRNA foram os mesmos em todas as condições utilizadas.

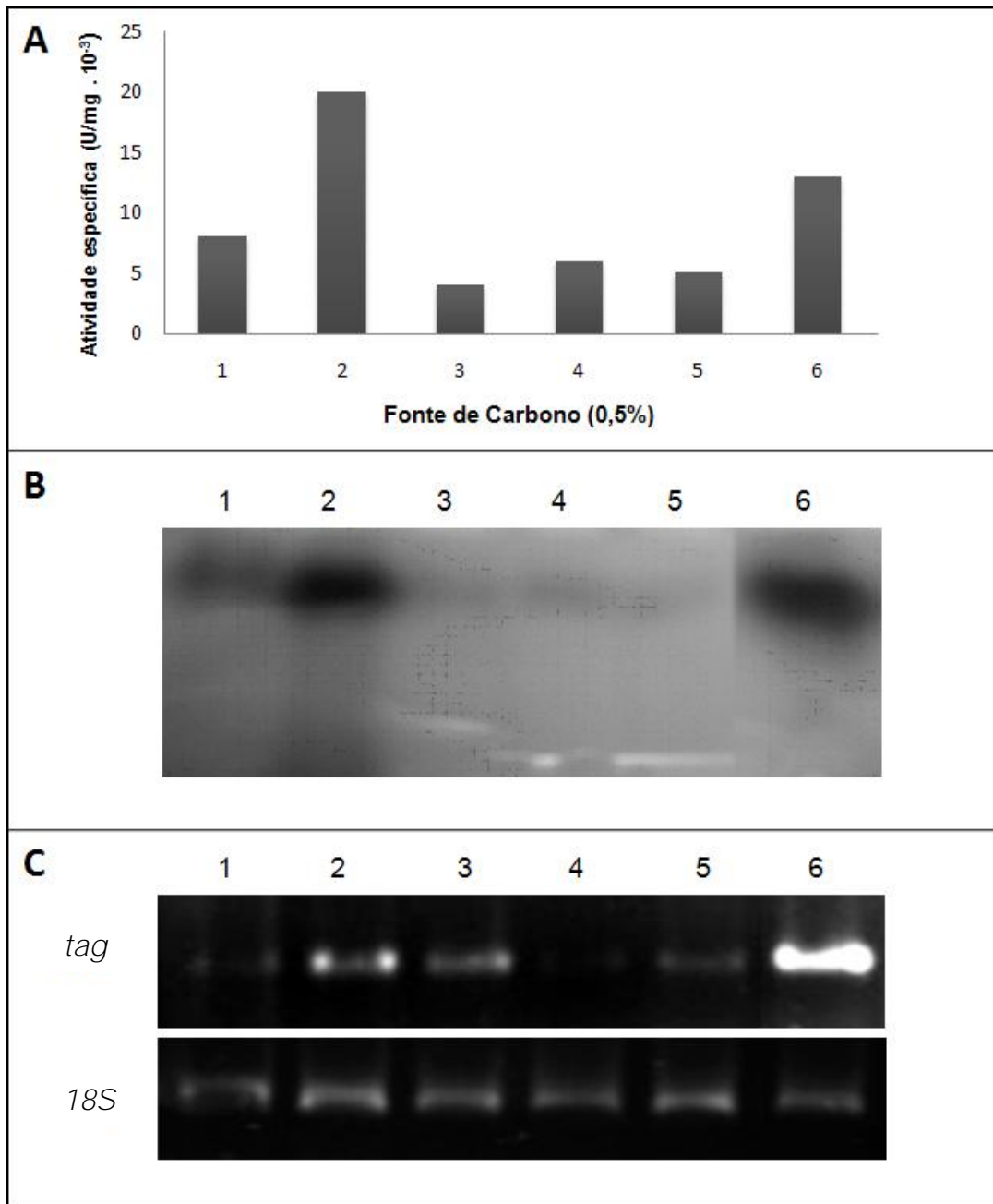


Figura 5 – Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de α -1,3-glucanases de *T. asperellum* (T00) após 24 h. de crescimento em meio TLE suplementado com glicose, amido, quitina, quitosana, celulose e parede celular de *R. solani* (Linhas 1, 2, 3, 4, 5 e 6). A) Padrão de atividade enzimática específica do sobrenadante das culturas. B) Atividade em gel de poliacrilamida não desnaturante. C) RT-PCR utilizando os oligonucleotídeos específicos para o gene de α -1,3-glucanase (*tag*) e rDNA 18S como controle (*18S*).

4.2 Cinética de produção de α -1,3-glucanase

A cinética de produção das α -1,3-glucanases foi avaliada em diferentes tempos de incubação em meio TLE suplementado com 0,5% de parede celular de *R. solani* (Figura 6). A atividade enzimática específica foi detectada a partir de 4 h. de incubação e a partir deste ponto a atividade se elevou consideravelmente, atingindo o máximo em 24 h. de incubação, demonstrando indução na presença deste substrato. O maior valor de atividade específica foi encontrado após 24 h. de crescimento ($0,016 \text{ U.mg}^{-1}$) (Figura 6A).

A atividade enzimática foi determinada também em gel de poliacrilamida, conforme descrito anteriormente. A partir de 4h observou-se a presença de uma banda de atividade correspondente a maior α -1,3-glucanase de *T. asperellum* (T00). A intensidade desta banda aumenta, e uma forte banda é visualizada a partir de 16 h, permanecendo constante até 24 h. A segunda banda de atividade, correspondendo a α -1,3-glucanase de menor massa molecular, surge após 8 h e permanece constante até 24 h (Figura 6B).

A presença do mRNA do gene *tag* foi detectado a partir de 8 h. de incubação, com um número maior de mRNA a partir de 20 h. Como controle neste experimento foi utilizado o gene do rDNA 18S (Figura 6C).

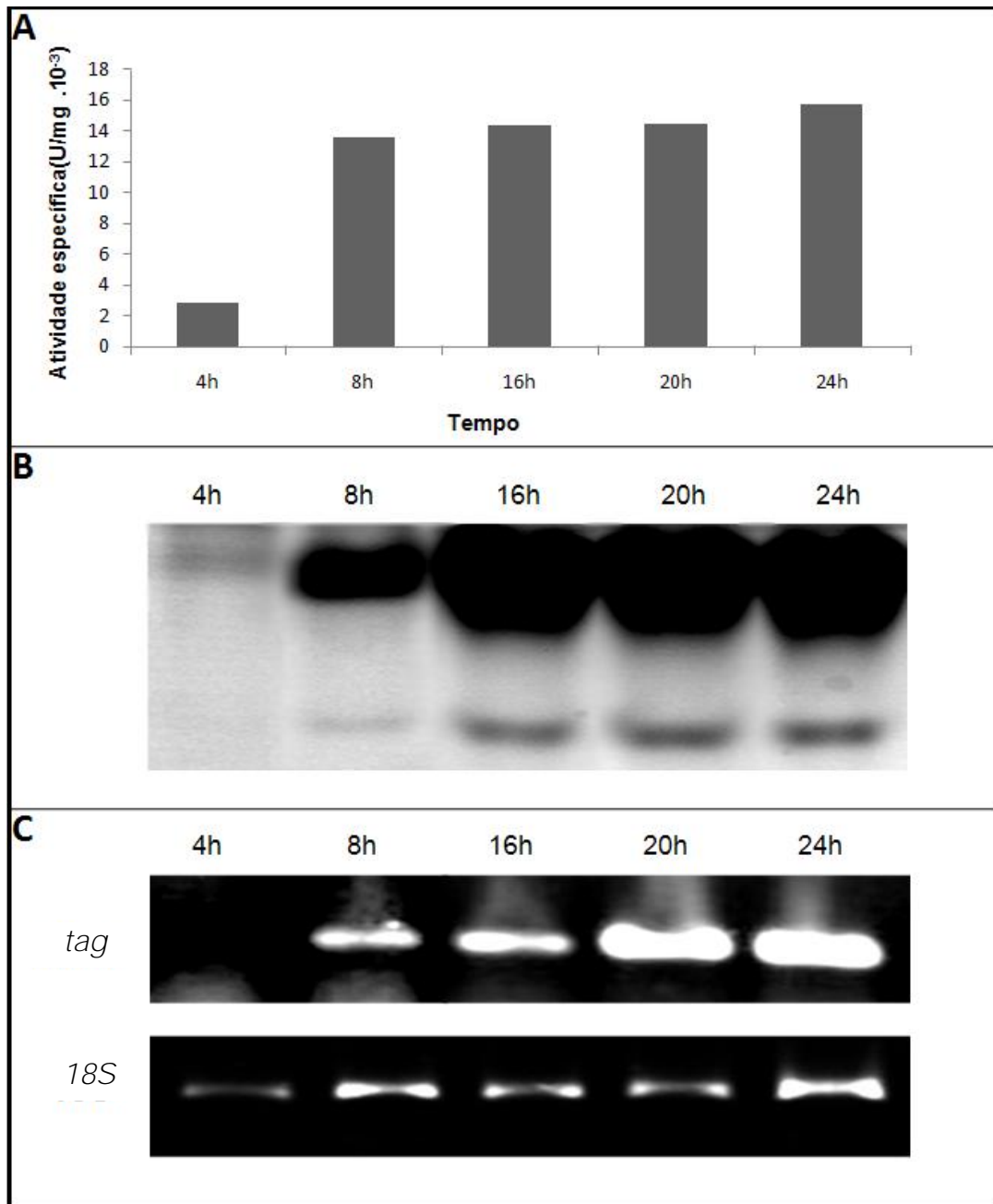


Figura 6 – Cinética de produção de α -1,3-glucanases de *T. asperellum* (T00) após crescimento em meio TLE suplementado com parede celular de *R. solani* nos tempos 4, 8, 16, 20 e 24 h. (Linhas verticais). A) Padrão de atividade enzimática específica do sobrenadante das culturas; B) Atividade de α -1,3-glucanases em gel de poli-acrilamida não-desnaturante. C) RT-PCR utilizando oligonucleotídeos Taglu, específicos para o gene α -1,3-glucanase (*tag*) e rDNA 18S como controle (*18S*).

4.3 Caracterização do gene

O seqüenciamento do gene completo foi realizado utilizando os produtos de PCR obtidos, os quais foram previamente purificados. As seqüências obtidas foram analisadas utilizando o programa PHRED (EWING *et al.*, 1998), disponível no site do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB), e o programa CAP3 (HUANG E MADAN, 1999), até obtenção da seqüência codante completa da α -1,3-glucanase de *T. asperellum* (T00), denominada *tag*. A qualidade das bases apresentou qualidade superior a PHRED20 e o *contig* único 3096 bp, sendo posteriormente depositado no *GeneBank* (N° de acesso EU314718).

Utilizando o programa BLASTN (ALTSCHUL *et al.*, 1997), foi avaliado o nível de identidade frente a outras seqüências de α -1,3-glucanases de *Trichoderma spp.*, depositadas no *GeneBank*. Foi observado identidade com apenas 2 outros genes de α -1,3-glucanases. A α -1,3-glucanase (*exo*) de *T. harzianum* (COHEN-KUPIEC, *et al.* 1999), com 99% de identidade (N° de acesso AJ002397), e a α -1,3-glucanase (*xbg1.3*) de *T. hamatum* (STEYAERT, STEWART E RIDGWAY, 2004), com 89% de identidade (N° de acesso AY269826.1), conforme Tabela 06.

Tabela 06 – Relação de genes analisados e que apresentaram identidade com produtos da amplificação do DNA genômico de *T. asperellum*.

Fonte	Escore Máximo	Escore Total	Identidade Máxima
Exo- α -1,3-glucanase <i>exo</i> de <i>T. harzianum</i> (COHEN-KUPIEC, <i>et al.</i> 1999)	1024	5621	99%
Exo- α -1,3-glucanase <i>xbg1.3</i> de <i>T. hamatum</i> (STEYAERT, STEWART E RIDGWAY, 2004)	688	2006	89%

Para análise preditiva da proteína, utilizando a seqüência de aminoácidos deduzida a partir da seqüência nucleotídica do gene *tag*, através do programa FASTA (PEARSON E LIPMAN, 1988), foi comparado com outras proteínas depositadas no *GenBank* e observado resultados semelhantes aos obtidos na análise BLASTN para as α -1,3-glucanases

de Cohen-Kupiec e colaboradores (1999) e de Steyaert, Stewart e Ridgway (2004), apresentados na Tabela 06. Várias seqüências de proteínas, caracterizadas como exo- β -1,3-glucanases e depositadas no *GeneBank* apresentaram elevado nível de similaridade (superior a 80%). Na tabela 7 estão descritas todas as proteínas que apresentaram identidade superior a 50%.

Tabela 07 – Relação de proteínas α -1,3-glucanases que apresentaram identidade superior a 50% com a exo- α -1,3-glucanase TAG, de *T. asperellum* (T00).

Fonte	Tamanho	Identidade	Similaridade
Exo- α -1,3-glucanase de <i>T. harzianum</i> (COHEN-KUPIEC <i>et al.</i> , 1999)	1031	97,9%	98,6%
Exo- α -1,3-glucanase de <i>T. hamatum</i> (STEYAERT, STEWART E RIDGWAY, 2004)	814	90,8%	98,4%
Exo- α -1,3-glucanase de <i>Aspergillus fumigatus</i> (FEDOROVA <i>et al.</i> , 2008)	804	56,3%	81,2%
Exo- α -1,3-glucanase de <i>Aspergillus fumigatus</i> (FEDOROVA <i>et al.</i> , 2008)	804	56,0%	81,3%
Exo- α -1,3-glucanase de <i>Aspergillus clavatus</i> (FEDOROVA <i>et al.</i> , 2008)	806	54,3%	80,8%
Exo- α -1,3-glucanase de <i>Aspergillus fumigatus</i> (NIERMAN <i>et al.</i> 2005)	822	55,2%	80,8%
Exo- α -1,3-glucanase de <i>Aspergillus fumigatus</i> (FEDOROVA <i>et al.</i> , 2008)	793	55,2%	80,7%

A predição da massa molecular da proteína e o ponto isoelétrico (pI) foram determinados através do programa ProtParam (GASTEIGER *et al.*, 2005), sendo encontrados valores de 107,9 kDa e com pI teórico de 4,56.

A figura 7 apresenta a seqüência de nucleotídeos de α -1,3-glucanase de *T. asperellum*, linhagem T00 (*tag*) e os aminoácidos deduzidos desta seqüência. Os possíveis motivos funcionais encontrados foram destacados na seqüência protéica. Utilizando o programa SIGNAL IP (COMBET, *et al.*, 2000) foi predito a existência de um peptídeo sinal do

aminoácido 1 ao 22, com sítio de clivagem entre uma alanina e uma treonina (sublinhado). Através do programa InterProScan (ZDOBNOV E APWEILER, 2001), foram detectados dois possíveis domínios WSC próximos ao C-terminal (duplo sublinhado). Utilizando o programa NetNGlyc 1.0 (GUPTA, JUNG E BRUNAK, 2004), foram sugeridos 3 possíveis locais de N-glicosilação presentes na proteína, resíduos NYTV (aminoácidos 56-60), NGSA (aminoácidos 225-229) e NLSL (aminoácidos 328-332) (circulados). Esta seqüência foi depositada no *GeneBank* com número de acesso EU314718.

1	ATGGGGTTTATACGCTCCGCCGTGCTTTTCGGCCCTCACATTTGCCGCGGCATGTCGAGGC
1	<u>M G F I R S A V L S A L T F A A A C R G</u>
61	CTGGCCACGCCTGGGTCCGAGGCTGAACCTTCTGTGGAAAAGCGTGCTTCAAGTTATTGG
21	<u>L A T P G S E A E P S V E K R A S S Y W</u>
121	TATGAGAACATTGCCCATCAAGGAATTGCACCATTCGCCCCAGCAACTACACAGTGTTC
41	Y E N I A H Q G I A P F A P S <u>N Y T V</u> F
181	CGCAACGTAAAGGACTATGGCGCAAAGGGTGATGGTGTTACCGACGACACGGCAGCAATT
61	R N V K D Y G A K G D G V T D D T A A I
241	AACAATGCCATTCTGTCCGGAGGTCCGATGTGGCAGACTCTGCACATCGAGCACTCTGACT
81	N N A I L S G G R C G R L C T S S T L T
301	CCAGCTGTGGTATACTTTCCGGCTGGAACGTACGTGATCTCAACGCCCATCATTGATCAG
101	P A V V Y F P A G T Y V I S T P I I D Q
361	TACTACACCAACATCATTGGAGATCCAACCAACCTGCCAACCATCAAGGCGACCGCAGGC
121	Y Y T N I I G D P T N L P T I K A T A G
421	TTCAGCGGCATTGCCCTCATCGATGGTGATACTTACTATGGCGATAATAACCCGAACGAC
141	F S G I A L I D G D T Y Y G D N N P N D
481	CCCAATTGGATTTCAACCAACGTCTTCTACCGCAAGTACGCAACTTTAAGCTTGACATG
161	P N W I S T N V F Y R Q V R N F K L D M
541	ACGTCTATTCCTACTTCTGCGCCAAAATCTATGGTATCCACTGGCCGACAGCCAGGCA
181	T S I P T S A P K I Y G I H W P T A Q A
601	ACAAGCTTGCAAAACATCCAGATTACTATGAGCACAGCGTCTGGAAATAGCCAAGTCGGT
201	T S L Q N I Q I T M S T A S G N S Q V G
661	CTTTTCATCGAGAACCGATCCGCTGGATTCTCACCGATATGACCTTCAACGGTGGCTTG
221	L F I E <u>N G S A</u> G F L T D M T F N G G L
721	ATTGGTGCTGCCATTGGCAATCAACAGTACACGATGCGCAACTTGGTATTCAACAACCTGC
241	I G A A I G N Q Q Y T M R N L V F N N C
781	GGCACAGCCATTGTGTCAGCGGCTTCGATTGGGAGTGGGTTTACCAGGGCATCAGCATCAAC
261	G T A I V S G F D W E W V Y Q G I S I N

841	AACTGTGGATTGGGAATTGACATGACGGCCGCGAGTCCATCACGCTGATCGACAGTTCC
281	N C G L G I D M T A A E S I T L I D S S
901	ATCAGCGGGACGCCAGTTGGAATCAAGACCAGCTTCAGCGCAAACCAGTCGCCCCCAGC
301	I S G T P V G I K T S F S A N Q S P A T
961	TCCAACAGTCTCATCGTTGAGAACCCTTCTCTCAACAATGTCCCAGTGGCCATTGAGTCC
321	S N S L I V E N L S L N N V P V A I Q S
1021	TCGAGTGGGAAGCACCATTCTGGCCGGAGGAACCACAACAATTGCTGCGTGGGGCCAGGGT
341	S S G S T I L A G G T T T I A A W G Q G
1081	CACCAGTATACGCCGAATGGACCGACGACATTCCAAGGCAGCATTACGCCAAACTCTCGT
361	H Q Y T P N G P T T F Q G S I T P N S R
1141	CCCTCGTCCCTTTTGAGCGGATCCAACACTATTACACGCGCTCAAAGCCCAGTATGAAACT
381	P S S L L S G S N Y Y T R S K P Q Y E T
1201	CTGCCAGTTTCTTCAATTCAGGAGCGTCCGATCTGCTGGTGCCACCGGTAACGCGGTCACC
401	L P V S S F R S V R S A G A T G N A V T
1261	GATGACACGGCCGCTCTGCAAAGTGTCAACAGTGCCACTGCTGCAGGCCAAATCGTG
421	D D T A A L Q S V I N S A T A A G Q I V
1321	TACTTTGATGCCGGTATCTACCGCATCACCAGCACGCTCAGTATCCCCCTGGCGGAAG
441	Y F D A G I Y R I T S T L S I P P G A K
1381	ATTGTTGGAGAGGAATACCCCATCATTATGTCTTCCGGAAGCTTCTTCAATGACCAAAGC
461	I V G E E Y P I I M S S G S F F N D Q S
1441	AACCCGAAGCCCGTGGTTCAAGTTGGCACACCGGCCAGACTGGACAGGTGGAGTGGTCG
481	N P K P V V Q V G T P G Q T G Q V E W S
1501	GACATGATTGTGCCACGCAGGGCACCCAAGCTGGAGCTGTTCTCATTGAGTGGAACTTG
501	D M I V S T Q G T Q A G A V L I E W N L
1561	GCCACCTCTGGAACGCCAGCGGCATGTGGGATGTGCACACGAGAATCGGTGGCTTCAAG
521	A T S G T P S G M W D V H T R I G G F K
1621	GGATCGAACCTCCAAGTTGCGCAATGCCCTGTAAGTGCAGCAGCAGACTGTTAACACG
541	G S N L Q V A Q C P V T A S S T T V N T
1681	GCTTGCATTGGAGCTTACATGTCCATGCATATCACTGCTAGCGCAAGCAACCTTTACATG
561	A C I G A Y M S M H I T A S A S N L Y M
1741	GAGAATAACTGGCTCTGGACCGCAGACCACGATATTGACGACTCGAGCAACACGCAAATC
581	E N N W L W T A D H D I D D S S N T Q I
1801	ACCATTTTCAGCGGCAGAGGTCTGTACGTTGAAAGCACAGCAGGAACGTTCTGGTTTGT
601	T I F S G R G L Y V E S T A G T F W F V
1861	GGGACAGCGGTTGAGCATCATAACCCTCTACCAGTATCAATTTGCCAACACGCAGAATATC
621	G T A V E H H T L Y Q Y Q F A N T Q N I
1921	TATGCCGGAGTTATCCAGACAGAGACACCCTACTACCAGCCAAATCCCGATGCCCAACG
641	Y A G V I Q T E T P Y Y Q P N P D A P T
1981	CCCTTCAATATCAACACTGCTCTCAACGATCCCAACTTTGCCACCTCCTGTTCCGGCAGT
661	P F N I N T A L N D P N F A T S C S G S
2041	TCTGGCCGCTGTGCCGAGGCTTGGGGCTTGCGAATCGTTAGCTCTCAGAACATTCTCATT
681	S G R C A E A W G L R I V S S Q N I L I
2101	TATGCAGCCGGCTTGTATTCTGTTCTTCGAGAACAACGATGGAAACACTGGTTGTGACGTG
701	Y A A G L Y S F F E N N D G N T G C D V
2161	GCTCTTGGGCCGAAAATTGCCAGAACAACATTTTCGACCTTGAAGGCACGCTGACCAAC
721	A L G P E N C Q N N I F D L E G T L T N

2221	ATTAACGTCTACAACCTGGGAACCGTGGGCGTCGTCAACCAGATCACGCAGAACGGAAAC
741	I N V Y N L G T V G V V N Q I T Q N G N
2281	GTGCTTGGGACCTCTTCTTCCAACGTCAATGCCTTTGCTGATGTTATTGCTCTCTTTTGA
761	V L A T S S S N V N A F A D V I A L F R
2341	CTCGCTTCCGGAAGCGGAGGCGTACTCCTCCTCCTTCTAGCACCACCAAAGCACAGTCC
781	L A S G S G G V T P P P S S T T K A Q S
2401	ACAACATTTTCCACAATCATCACCAGCTCGCCGCGGAAGCAAACCTGGATGGAATTTCTTG
801	T T F S T I I T S S P P K Q T G W N F L
2461	GGATGCTACTCCGATAACGTCAACGGTCAACTTTGGCCAACCAGGTCCAGGTCCGAGGA
821	<u>G C Y S D N V N G R T L A N Q V Q V A G</u>
2521	GGTGCATCTGCCATGTTCGATCGAGGCTTGTGAAACTGCTTGCGAATCCGCCGGATACACC
841	<u>G A S A M S I E A C E T A C E S A G Y T</u>
2581	ATTGCTGGGCGTGAATACTCTGGAGAATGCTGGTGTGATACCAAGTTCAGAACGGCGGC
861	<u>I A G V E Y S G E C W C D T K F Q N G G</u>
2641	GGCCAGCCTCTGATGGAAGTGCTCAATGCACCATGACTTGCAGCGGTGCGCCACAGGAA
881	<u>G P A S D G S A Q C T M T C S G A P Q E</u>
2701	ACCTGCGGAGGCCCGAACCAGCCTCGATGTTTACAGCTTGGCGACCGCAAACCTGGGAGCGCC
901	<u>T C G G P N R L D V Y S L A T A T G S A</u>
2761	TCGCCTCCCGCGGCCACCGGATGGAACCTTTAGAGGATGCTACACCGACAGTGTCAATGCT
921	S P P A A T G W N F <u>R G C Y T D S V N A</u>
2821	CGAGCGTTGATTGCCGAGTCGGTCCCAACGGCCCTCGTTCGATGACTATAGAGGCGTGT
941	<u>R A L I A E S V P N G P S S M T I E A C</u>
2881	CAAAGTGTGTGCAAGGGCCTGGGCTACACTCTTGCGGGCCTTGAGTATGCCGACGAATGC
961	<u>Q S V C K G L G Y T L A G L E Y A D E C</u>
2941	TACTGTGGTAACAGCCTCGCCAATGGCGCAACCATTGCCCCAGATGGAATGCCGTTGC
981	<u>Y C G N S L A N G A T I A P D G N A G C</u>
3001	AACATGAATTGCGGGCAACGCTGCTGAAACATGCGGGCGCCCTAACAGGTTGGACATT
1001	<u>N M N C A G N A A E T C G G P N R L D I</u>
3061	TACAGTTACGGACAGGCCAAGGGCACCCAACCATAG
1021	Y S Y G Q A K G T Q P *

Figura 7 – Sequência de nucleotídeos do gene de α -1,3-glucanase de *T. asperellum*, linhagem T00 (*tag*) e aminoácidos deduzidos desta sequência. O peptídeo sinal encontra-se sublinhado, os pontos de N-glicosilação próximos aos resíduos de asparagina 56, 225 e 328 estão circulados, e com duplo sublinhado destaca-se os dois domínios de ligação a carboidratos WSC. Esta sequência foi depositada no *GeneBank* com número de acesso EU314718.

4.4 Estudos moleculares da interação *in vivo* entre *T. asperellum* (T00) e *R. solani*.

O potencial para uso do isolado de *T. asperellum* (T00) como agente de controle biológico foi avaliado *in vivo* pelo teste de pareamento com o fungo fitopatogênico *R. solani* (Figura 8). As colônias foram inoculadas em placas com meio MYG e após 48 h. de incubação as hifas das culturas estabelecem interação (Figura 8A), que se intensifica após 72 h. de crescimento, com intensa esporulação do *T. asperellum* (Figura 8B).

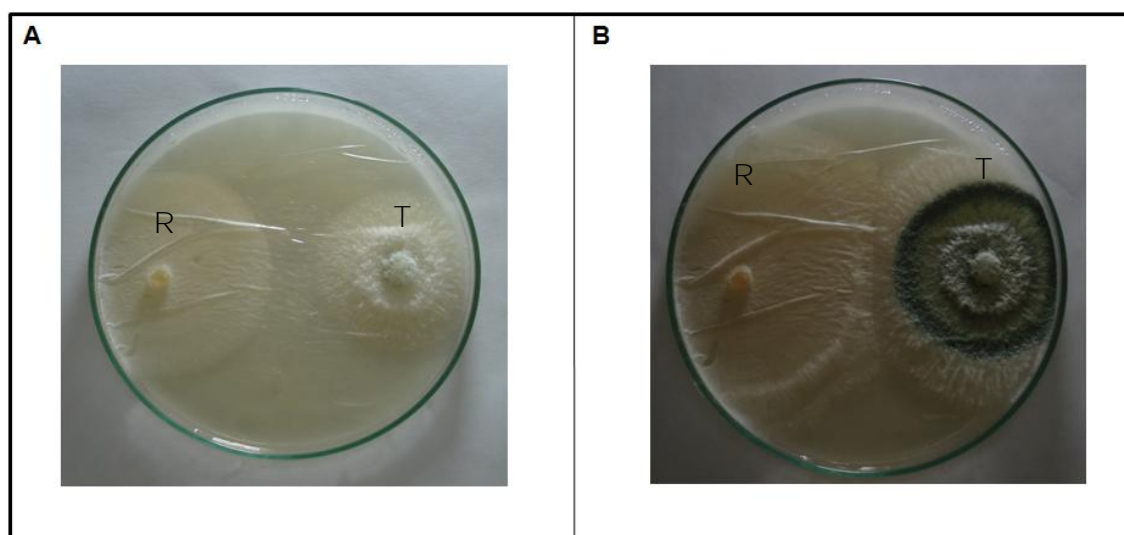


Figura 8 – A: Confronto *in vivo* após 48 h. de inoculação em placa de petri de 14 cm em meio MYG. B: Mesma placa da figura A após 72 h. Esta placa foi utilizada nos experimentos de RT-PCR. (R) *R. solani* e (T) *T. asperellum* (T00).

Para avaliar o possível papel do gene *tag* no micoparasitismo, foi analisada a expressão durante confronto de *T. asperellum* (T00) contra *R. solani* (Figura 8). Amostras isoladas das culturas representadas acima (Figura 8B) foram utilizadas para extração de RNA e a análise dos transcritos por RT-PCR e PCR em tempo real (Figura 9B e 9C, respectivamente). Este mRNA extraído, serviu como molde para síntese do cDNA. Foi utilizado no ensaio RT-PCR os oligonucleotídeos específicos para α -1,3-glucanases Taglu 1 e 2 (Tabela 3), na PCR quantitativa em tempo real foi utilizado os oligonucleotídeos Tag 1 e 2 (Tabela 5).

O nível de expressão do gene *tag* de *T. asperellum* (T00), crescido em meio MYG, na ausência do hospedeiro foi usado como controle (Figura 9B e 9C, linha 4). Não foram detectados transcritos nas amostras contendo RNA de *R. solani* (Figura 9B e 9C, linha 1), demonstrando que os oligonucleotídeos usados na RT-PCR e PCR *real-time* foram específicos para o gene *tag* de *T. asperellum* (T00). A análise por PCR em tempo real revelou um nível basal do transcrito do gene *tag*, que pode ser detectado antes mesmo do contato entre os dois fungos (Figura 9C, linha 3). Na interação entre o *T. asperellum* e *R. solani*, foi detectado um aumento significativo no número de transcritos do gene *tag*, da ordem de 4,8 vezes (Figura 9B e 9C, linha 2).

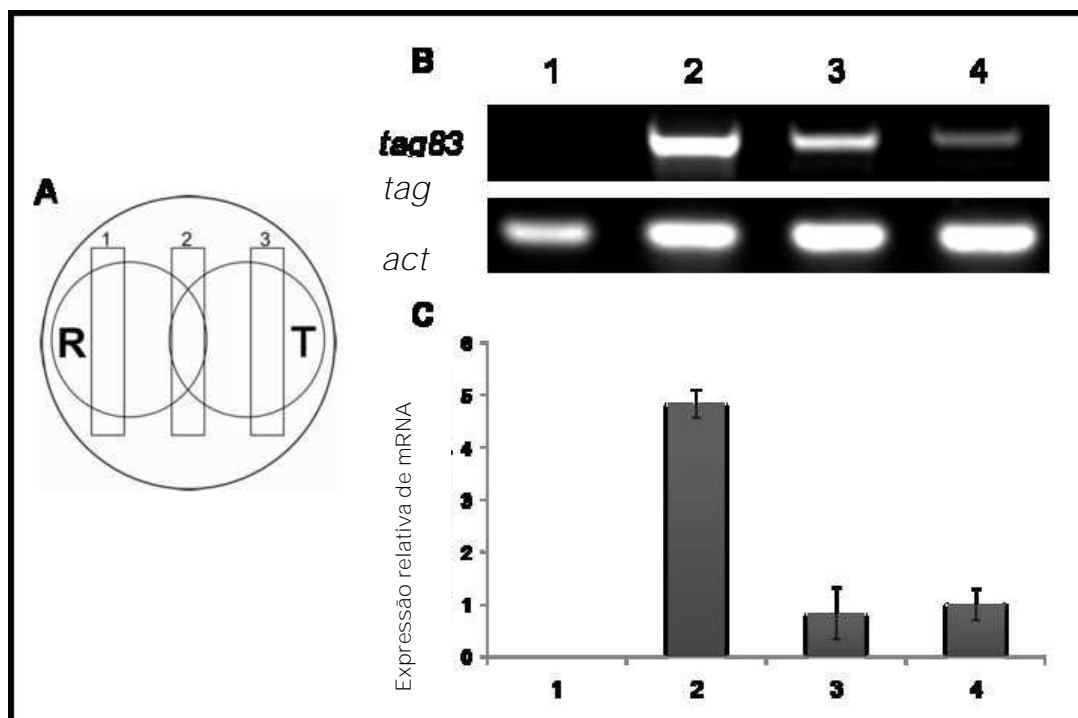


Figura 9 – Confronto simulando micoparasitismo entre *T. asperellum* (T00) e *R. solani*. A) Descrição esquemática da placa do confronto. Os círculos pequenos representam colônias de *T. asperellum* (T) e de *R. solani* (R), crescidos em meio MYG por 72 h. em placa de petri (círculo grande); B) RT-PCR do gene *tag* (264 bp) e do gene controle actina (297 bp); C) PCR *real-time* representando os níveis de expressão relativa do gene *tag* durante simulação de micoparasitismo. Os dados foram normalizados com o gene controle (actina); 1) Níveis de mRNA do gene *tag* de *R. solani* antes do contato; 2) Níveis de mRNA *tag* durante confronto de *T. asperellum* com *R. solani*; 3) Níveis de mRNA *tag* de *T. asperellum* antes do contato; 4) Níveis de mRNA *tag* de *T. asperellum* crescido em meio MYG, sem o hospedeiro. As barras representam a média ± DPM. A média do nível de expressão de *tag* (n=3) em comparação ao controle (n=3) revelou significância estatística pelo teste-*t* de Student ($p = 0.022 = ***$).

V. DISCUSSÃO

Diversas espécies do gênero *Trichoderma* spp. têm atraído interesse em biocontrole, o gênero foi reconhecido a algum tempo como agente de controle de doenças de plantas e pesquisas relacionadas a mecanismos enfocam a habilidade destes fungos desenvolverem efeito antagônico sobre outros fungos de solo (KUBICEK *et al.*, 2001; EL-KATATNY *et al.*, 2001; VITERBO *et al.* 2002; RAMOT *et al.*, 2004; CHUTRAKUL E PEBERDY, 2005; DJONOVIC, POZO E KENERLEY, 2006; GROSCH *et al.*, 2006).

O *Trichoderma* spp. é um gênero de fungo antagonista e com mecanismo de micoparasitismo relacionado a produção de enzimas hidrolíticas como quitinases, proteases e α -1,3-glucanases (HARAN, SCHICKLER E CHET, 1996), a produção destas enzimas hidrolíticas são as maiores determinantes do biocontrole (THRANE, TRONSMO E JENSEN, 1997; HJELJORD E TRONSMO, 1998). Dentre estas enzimas, as β -1,3-glucanases possuem um importante papel nas interações entre espécies do gênero *Trichoderma* spp. e seus hospedeiros (SCHIRMBOCK *et al.*, 1994; THRANE, TRONSMO E JENSEN, 1997) e parecem estar presentes em muitos fungos (MOUYNA *et al.*, 2002) uma vez que as β -glucanas são polissacarídeos muito abundantes na parede celular (BENITEZ *et al.*, 2004).

Dados da literatura mostram que as α -glucanases produzidas por fungos podem ser constitutivas ou induzidas por diferentes fontes de carbono (EL-KATATNY *et al.* 2001; MARTIN *et al.* 2007). Compostos como quitina, podem induzir a produção de α -1,3-glucanases de *Trichoderma* spp. (STAHMANN, SCHIMZ E SAHM, 1993; ZEILINGER *et al.*, 1999). Poucos dados estão disponíveis referentes à regulação da expressão de α -1,3-glucanases em *T. asperellum*, principalmente aqueles relacionados com as condições de cultura que podem afetar sua produção (MARTIN *et al.*, 2007).

O efeito de diferentes fontes de carbono na produção de α -1,3-glucanases produzidas por *T. asperellum* (T00) foi avaliado quando o fungo foi crescido em meio TLE suplementado com as fontes de carbono: glicose, amido, quitina, quitosana, celulose e parede celular de *R. solani* (Figura 5).

A maior atividade específica foi verificada na presença de amido ($0,020 \text{ U.mg}^{-1}$) e parede celular ($0,013 \text{ U.mg}^{-1}$) (Figura 5A), mostrando que estes substratos são bons indutores da expressão de α -1,3-glucanases em *T. asperellum* (T00). Em presença de parede celular foi detectada atividade específica a partir de 4 h., atingindo o máximo em 24 h. de incubação (Figura 6A).

Em gel de poliacrilamida não-desnaturante, uma banda significativa de atividade, correspondente α -1,3-glucanase TAG83 de *T. asperellum* (T00), foi detectada nos meios contendo amido e parede celular de *R. solani* (Figura 5B), sugerindo que esta α -1,3-glucanase possa estar sendo expressa de forma induzida em função do substrato utilizado. A outra banda de atividade referente à α -1,3-glucanases de menor massa molecular não foi verificada neste experimento, provavelmente devido a quantidade de enzima aplicada no gel ou a perda de atividade devido a diálise (BARA, 2002; SILVA, 2005). Entretanto, nos experimentos de cinética de produção, a banda de atividade correspondente a α -1,3-glucanase de menor massa molecular foi detectada a partir de 8 h permanecendo constante (Figura 6B). Silva (2005), observou que amostras enzimáticas dializadas não apresentavam a presença da banda de atividade referente a α -1,3-glucanase de 19 kDa. Nossos dados sugerem que as duas bandas de atividade encontradas correspondem as α -1,3-glucanases purificadas e caracterizadas por Bara (2002) e Silva (2005). Ambas as enzimas foram produzidas na presença de parede celular, a enzima de maior massa molecular (83,1 kDa) foi caracterizada como uma exo- α -1,3-glucanase (TAG83) e a de menor massa (19 kDa), como uma endo- α -1,3-glucanase (TAG19). A expressão de mais de uma β -1,3-glucanase tem sido verificada em *Trichoderma* spp., principalmente em *T. harzianum* (DE LA CRUZ *et al.*, 1995a; VAZQUEZ-GARCIDUENAS, LEAL-MORALES E HERRERA-ESTRELLA, 1998; AL. RAMOT *et al.*, 2000; NORONHA *et al.*, 2000; NORONHA E ULHOA, 2000).

O estudo molecular foi realizado através de amplificação do mRNA por RT-PCR, e demonstrou dados quantitativos da expressão de α -1,3-glucanase nestas condições (Figura 5C e 6C). Os experimentos confirmaram a presença do mRNA do gene de α -1,3-glucanase (*tag*) em

todas as fontes de carbono utilizadas. Os níveis mais baixos foram observados em presença de glicose e quitosana. Foram encontrados níveis significativos de mRNA com amido, quitina e celulose. A maior produção de mRNA para este gene foi observado quando parede celular de *R. solani* foi utilizada como fonte de carbono, e esta expressão é dependente do tempo de incubação, conforme mostrado no experimento de cinética de produção (Figura 6C). Em fungos micoparasitas como o *T. harzianum*, *Verticillium fungicola* e *S. elegans*, análise do mRNA revela que as β -1,3-glucanases podem ser induzidas na presença da parede celular do fungo hospedeiro (TWEDDELL *et al.*, 1994; VASQUEZ-GARCIDUENAS *et al.*, 1998; AMEY *et al.*, 2003).

A elevada atividade enzimática e a presença de transcritos de α -1,3-glucanases quando o fungo cresceu em amido precisa ser melhor estudada. Amilases foram descritas em fungos do gênero *Trichoderma* spp. (DE AZEVEDO, DE MARCO E FELIX, 2002; KOVACS *et al.*, 2004) e pequenas moléculas derivadas da hidrólise do amido podem estar contribuindo para a produção de α -1,3-glucanases em *T. asperellum* (T00). A hipótese de que pequenas moléculas derivadas da hidrólise de polissacarídeos, por ação de enzimas constitutivas, possam estar funcionando como indutoras de enzimas em fungos já foi observada (LORA *et al.*, 1995; ZEILINGER *et al.* 1999).

A presença de moléculas indutoras e a ausência de glicose são consideradas essenciais para a produção de β -1,3-glucanases induzidas em fungos (MARTIN *et al.*, 2007). Entretanto, o fato de termos encontrado a expressão de glucanases em presença de glicose, sugere que estas enzimas em *T. asperellum* (T00) possam ter um papel importante relacionado às funções morfogênicas, tais como, germinação de esporos e alongamento de hifas, conforme descritas na literatura para outros fungos filamentosos (PITSON, SEVIOUR E MCDOUGALL, 1993; MARTIN *et al.*, 2007).

A seqüência codante da α -1,3-glucanase de *T. asperellum* (T00) foi obtida através da amplificação do DNA genômico, seqüenciamento e análise dos fragmentos, e apresentou uma ORF de 3096 pares de bases com elevado nível de identidade frente a outras duas exo- α -1,3-glucanases,

descritas nas espécies *T. harzianum* e *T. hamatum* (Tabela 6 e Figura 7) (COHEN-KUPIEC, *et al.* 1999; STEYAERT, STEWART E RIDGWAY, 2004). A proteína predita revelou 1032 aminoácidos, com massa molecular de 107,9 kDa, com elevado grau de identidade com outras exo- α -1,3-glucanases de *T. harzianum*, *T. hamatum* e *Aspergillus* spp. (COHEN-KUPIEC, *et al.* 1999; STEYAERT, STEWART E RIDGWAY, 2004; NIERMAN *et al.* 2005; FEDOROVA *et al.*, 2008). Estes dados sugerem que estas proteínas encontram-se bastante conservadas em fungos filamentosos. A análise da seqüência obtida, mecanismo de ação da α -1,3-glucanase e a massa molecular predita sugerem que esta enzima corresponde a exo- β -1,3-glucanase de *T. asperellum* (T00) de maior massa molecular, descrita por Bara (2002). A diferença encontrada entre a massa molecular determinada por Bara (2002), de 83,1 kDa. e a predita, de 107,9 kDa. pode ser explicada por possíveis modificações pós-traducionais.

A predição revelou ainda a existência de um sinal de secreção, o peptídeo sinal (aminoácido 1 ao 22), enquanto no trabalho de Cohen-Copiec (1999), foi previsto um peptídeo sinal contendo 35 aminoácidos. Esta divergência pode ser resultado da utilização de programas computacionais diferentes para predição. O peptídeo sinal possui função no direcionamento da proteína para espaços extracelulares (GAULIN *et al.*, 2006). Também foi verificada a presença de dois domínios de ligação a carboidratos, próximos ao C-terminal, estas regiões são responsáveis pela ligação a carboidratos e geralmente contém acima de 8 resíduos conservados de cisteína que podem estar conferindo função estrutural quando envolvidos com pontes dissulfeto ou integridade às células, em resposta ao estresse (PONTING, HOFMANN E BORK, 1999). A proteína apresentou ainda motivos de glicosilação. A glicosilação de proteínas secretadas por fungos é uma importante modificação estrutural covalente, conferindo estabilidade à cadeia polipeptídica durante transporte por via secretória (WANG *et al.*, 1996). A maioria das proteínas secretadas por fungos são provavelmente glicosiladas (PEBERDY, 1994).

A avaliação da produção de enzimas hidrolíticas em ensaios de confronto *in vivo* tem contribuído para o entendimento do mecanismo de micoparasitismo em fungos do gênero *Trichoderma* spp. (CORTES *et al.*,

1998; ZEILINGER *et al.*, 1999; HARMAN 2000; KUBICEK *et al.*, 2001). Recentemente, Sanz (2004), através desta técnica, mostrou a expressão de uma α -1,3-glucanase de *T. asperellum* em confronto com o fitopatógeno *Botrytis cinerea*.

O potencial para uso do isolado de *T. asperellum* (T00) como agente de controle biológico e a importância de enzimas hidrolíticas neste mecanismo foram avaliados pela análise da expressão da α -1,3-glucanase durante crescimento do *T. asperellum* (T00) contra o fungo fitopatogênico *R. solani* (Figura 8). Inicialmente, observa-se a capacidade de crescer em direção ao hospedeiro com sobreposição de hifas, confirmando estudos anteriores de Bara (2002) (Figura 3), que por análise realizada por microscopia de varredura demonstrou que na região de confronto ocorre o enrolamento da hifa de *T. asperellum* (T00) e posterior penetração na hifa de *R. solani*. Estes dados indicam que o *T. asperellum* atua por micoparasitismo e que o isolado T00 possui potencial para emprego em controle biológico.

Análise por RT-PCR e PCR quantitativa em tempo real, da expressão do gene *tag*, mostraram elevação significativa (4,8 vezes na PCR quantitativa) de transcritos de α -1,3-glucanase durante a interação *T. asperellum* (T00) e *R. solani* (Figura 9B e 9C, linha 2). Não foram detectados transcritos nas amostras contendo mRNA de *R. solani* (Figura 9B e 9C, linha 1) demonstrando elevada especificidade dos oligonucleotídeos utilizados. Um nível basal do gene *tag* de *T. asperellum* pode ser detectado antes mesmo do contato físico (Figura 9C, linha 3), esta expressão pode relacionar estas enzimas com processos morfogênicos, tais como germinação de esporos, alongação e ramificação das hifas (MARTIN *et al.*, 2007; MOUYNA *et al.*, 2002; BENITEZ *et al.*, 2004).

A expressão de genes durante a interação *Trichoderma*-hospedeiro durante ensaios de confronto tem sido descritos, incluindo de uma α -1,3-glucanase (SANZ *et al.*, 2005) e uma endoquitinase (VITERBO, *et al.*, 2005), ambas produzidas por *T. asperellum*. Os autores mostraram a expressão de α -1,3-glucanase (*ang13.2*) e endoquitinase (*chit36Y*), quando o *T. asperellum* cresceu sob condições de antagonismo simulado contra *B. cinerea* e *R. solani*, respectivamente.

Considerando os dados da literatura e os encontrados neste trabalho, podemos considerar que o mecanismo de micoparasitismo de *T. asperellum* é um sistema complexo e envolve a participação de α -1,3-glucanase. Entretanto, outros estudos relacionados a expressão de genes durante esta interação, são necessários para melhor entendimento do mecanismo de micoparasitismo de *T. asperellum*.

VI. CONCLUSÕES

- A produção de α -1,3-glucanase por *T. asperellum* (T00) é influenciada pela fonte de carbono e pelo tempo de incubação, principalmente quando parede celular de *R. solani* é utilizada;
- A sequência gênica da α -1,3-glucanase de *T. asperellum* (T00) mostrou elevada identidade com outras α -1,3-glucanases;
- Durante interação entre *T. asperellum* e *R. solani* ocorre maior expressão do gene α -1,3-glucanase de *T. asperellum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS D.J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150, p. 2029–2035, 2004.
2. AGOSIN E, AGUILERA JM Industrial production of active propagules of *Trichoderma* for agricultural uses. In: Harman GE, Kubicek CP, eds. *Trichoderma and Gliocladium* Vol. 2, Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Taylor E Francis, London, 1998.
3. BARA, M.T.F. Purificação e caracterização de uma exo- β -1,3-glucanase produzida por *Trichoderma asperellum*. Tese de Doutorado apresentada ao departamento de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. 78 p., 2002.
4. BARA, M.T.F.; LIMA, A.L.; ULHOA, C.J. Purification and characterization of an exo-beta-1,3-glucanase produced by *trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiology Letters* 219, p. 81-85, 2003.
5. BARTINICK-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annual Review of Microbiology* 22, p. 87-109, 1968.
6. BEAGLE-RISTAINO, J.E. E PAPAVIDAS, G.C. Survival and proliferation of propagules of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens* in soil and in plant rhizospheres. *Phytopathology* 75:729-732. 1985.
7. BENÍTEZ T.; RINCÓN A.M.; LIMÓN M.C. E CODÓN A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology* 7, p. 249-260, 2004.
8. BENHAMOU, N. E CHET, I. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure and gold citochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology* 83 (10), p. 1062-1071, 1993.
9. BENHAMOU N. E CHET I. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* 86, p. 405-416. 1996.

10. BENHAMOU N. E CHET I. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Appl Environ Microbiol* 63, p. 2095–2099, 1997.
11. BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. Em: *Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil*. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, p.225-236, 1991.
12. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, p. 248-254, 1976.
13. BRUNNER, K. *et al.* The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr. Genet.* 43, p. 289–295, 2003.
14. BURTSEVA I.U.V.; VERIGINA N.S.; SOVA V.V.; PIVKIN M.V.; ZVIAGINTSEVA T.N. O-glycosylhydrolases of marine filamentous fungi beta-1,3-Glucanases of *Trichoderma aureviride* *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 39 (5), p. 542-548, 2003.
15. CALLAN, N.W.; MATHRE, D.E.; MILLER, J.B.; AVRINA, C.S. Biological seed treatments: factors involved in efficiency. *Horticultural Science*, V. 32, p.179-183, 1997.
16. CHET, I. *Trichoderma* - Application, mode of action and potential as a biocontrol agents of soilborne plant pathogenic fungi. In: CHET, I., ed. *Innovative approaches to plant disease control*. New York: J. Wiley, p.137-160, 1987.
17. CHET, I. E INBAR, J. Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v.48, p.37-43, 1994.
18. CHET, H. E BAKER, R. Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* 70, p. 994-998,1980.
19. CHET, I. E BAKER, R. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 71:286-290. 1981.
20. CHÉRIF, M. E BENHAMOU, N. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. On *Fusarium oxysporum* sp. *Phytopathology* 80 (12), p. 1406-1414, 1990.

21. CHUTRAKUL C.; PEBERDY J.F. Isolation and characterization of a partial peptide synthetase gene from *Trichoderma asperellum*. FEMS Microbiology Letters 252, 257–265, 2005.
22. COHEN-KUPIEC, R.; BROGLIE, K.E.; FRIESEM, D.; BROGSLIE, R.M.; CHET, I. Molecular characterization of a novel α -1,3-glucanase related to mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. Gene 226 (2), p. 147-154, 1999.
23. CORTES C.; GUTIERREZ A.; OLMEDO V.; INBAR J. The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by a diffusible factor. Mol. Gen. Genet. 260, p. 218-225, 1998.
24. COMBET C.; BLANCHET C.; GEOURJON C. E DELÉAGE G. NPS@: Network Protein Sequence Analysis. TIBS 25, p. 147-150, 2000.
25. COTXARRERA, L.; TRILLAS-GAY, M. I.; STEINBERG, C.; ALABOUVETTE, C. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. Soil Biology and Biochemistry 34 (4), p. 467-476, 2001.
26. CUTFIELD S.M.; DAVIES G.J.; MURSHUDOV G.; ANDERSON BF, MOODY P.C.; SULLIVAN P.A.; CUTFIELD J.F. The structure of the exo-b-(1,3)-glucanase from *Candida albicans* in native and bound forms: relationship between a pocket and groove in family 5 glycosyl hydrolases. J Mol Biol 294: 771–783,1999.
27. DE AZEVEDO A.M.; DE MARCO J.L. E FELIX C.R. Characterization of an amylase produced by a *Trichoderma harzianum* isolate with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. Fems Microbiol. Lett. 188 (2), p.171-175, 2000.
28. DE LA CRUZ, J.; HIDALGO-GALLEGO, A.; LORA, J. M.; BENITEZ, T.; PINTOR-TORO, J. A.; LLOBELL, A. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. European Journal of Biochemistry, v.206, p.859-867, 1992.
29. DE LA CRUZ, J.; PINTOR-TORO, J.A.; BENITEZ, T.; LLOBELL, A.; ROMERO, L.C. A novel endo- α -1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. Journal of Bacteriology 177 (23), p. 6937-6945, 1995a.

30. DE LA CRUZ, J.; PINTOR-TORO, J. A.; BENITEZ, T.; LLOBELL, A. Purification and characterization of an endo- β -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *Journal of Bacteriology*, v.177, p.6937-6945, 1995b.
31. DE MARCO, J. L.; LIMA, L. H. C.; SOUSA, M. V.; FELIX, C. R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso* the causal agent of witches broom disease of cocoa. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.16, p.383-386, 2000.
32. DE MARCO, J.L.; FELIX, C.R. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* which controls cocoa plant witches broom disease. *BMC Biochemistry* 3:3; p. 1471-2091, 2002.
33. DE MARCO, J.L.; FELIX, C.R. Purification and characterization of a beta-Glucanase produced by *Trichoderma harzianum* showing biocontrol potential. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 50 (1), p. 21-29, 2007
34. DJONOVIC S.; POZO M.J. E KENERLEY C.M. Tvbg3, a β -1,6-Glucanase from the Biocontrol Fungus *Trichoderma virens*, Is Involved in Mycoparasitism and Control of *Pythium ultimum*. *Environmental Microbiology* 72 (12), p. 7661–7670, 2006.
35. DODD, S.L.; LIECKFELDT, E.; E SAMUELS, G.J. cDNA parcial do fator 1a de elongação traducional de *Trichoderma asperellum* linhagem CBS 433.97. Dados não publicados. Banco de dados público Genbank catalogada no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) sob o número AF456907, 2001.
36. DONZELLI B.G.G.; LORITO M.; SCALA F. E HARMAN G.E. Cloning, sequence and structure of a gene encoding an antifungal glucan 1,3- β -glucosidase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*). *Gene* 277, p. 199–208, 2001.
37. DUBOURDIEU, D.; DESPLANQUES, C.; VILLETAZ, J.; RIBEREAU-GAYON, P. Investigations of an industrial β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Carbohydrate Research* 144 (2), p. 277-287, 1985.

38. DRUZHININA I., KUBICEK C.P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *Journal of Zhejiang University Science* v. 6 (2), p. 100-112, 2005.
39. ELAD, Y., CHET, I. E KATAN, J. *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70:119-121. 1980.
40. ELAD Y., BARAK R. E CHET I. Possible Role of Lectins in Mycoparasitism. *Journal of Bacteriology*, V. 154, p. 1431-1435, 1983.
41. EWING B.; HILLIER L.; WENDL M.; GREEN P Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* , v. 8, p. 175-185, 1998.
42. EL-KATATNY, M.H.; GUDELJ, M.; ROBRA, K.H.; ELNAGHY, M.A.; GUBITZ, G.M. Characterization of a chitinase and endo α -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T 24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, p. 137-143, 2001.
43. FELIX, C.R. A importância de enzimas hidrolíticas em controle biológico - Ciclo de seminários do núcleo temático de controle biológico: resumos anos 2005–2006. Organizadores Raúl Alberto Laumann e João Batista Tavares da Silva. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1ª edição. 27 p., 2006.
44. FEDOROVA, N.D.; KHALDI, N.; JOARDAR, V.S.; MAITI, R.; AMEDEO, P.; ANDERSON, M.J.; CRABTREE, J.; SILVA, J.C.; BADGER, J.H.; ALBARRAQ, A.; ANGIUOLI, S.; BUSSEY, H.; BOWYER, P.; COTTY, P.J.; DYER, P.S.; EGAN, A.; GALENS, K.; FRASER-LIGGETT, C.M.; HAAS, B.J.; INMAN, J.M.; KENT, R.; LEMIEUX, S.; MALAVAZI, I.; ORVIS, J.; ROEMER, T.; RONNING, C.M.; SUNDARAM, J.P.; SUTTON, G.; TURNER, G.; VENTER, J.C.; WHITE, O.R.; WHITTY, B.R.; YOUNGMAN, P.; WOLFE, K.H.; GOLDMAN, G.H.; WORTMAN, J.R.; JIANG, B.; DENNING, D.W.; NIERMAN, W.C. Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet.* V. 4, 2008.

45. FRAVEL D.R. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, p. 337-359, 2005.
46. GAO W.; WU Y.; YANG H. Cloning of beta-1,3-glucanase gene from *Trichoderma viride* LTR-2 and its expression in *Pichia pastoris*. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 48 (2), p. 239-243, 2008.
47. GASTEIGER E.; HOOGLAND C.; GATTIKER A.; DUVAUD S.; WILKINS M.R.; APPEL R.D.; BAIROCH A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, p. 571-607, 2005.
48. GEORGAKOPOULOS D.G., FIDDAMAN P., LEIFERT C.; MALATHRAKIS N.E. Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by *Pythium ultimum* with and fungal antagonists. *Journal of Applied Microbiology* 92, 1078–1086, 2002.
49. GICZEY G, KERENYL A, FULOP L E HORNOK L Expression of cmg1, an exo-b-1,3-glucanase gene from *Coniothyrium minitans*, increases during sclerotial parasitism. *Appl Environ Microbiol* 67, p. 865–871, 2001.
50. GORODECKI, B. E HADAR, Y. Suppression of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* diseases in container media containing composted separated cattle manure and composted grape marc. *Crop Protection* 9, p. 271-274, 1990.
51. GRESSEL, J.B; HARTMANN, K.M. Morphogenesis of *Trichoderma*: Action spectrum of photoinduced sporulation. *Planta*, v. 79, p. 271-74, 1968.
52. GROSCH R.; SCHERWINSKI K.; LOTTMANN J. E BERG G. Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community. *Mycology Research* 110, p. 1464-74, 2006.
53. GULLINO M.L. E KUIJPERS L.A.M. Social and Political Implications of Managing Plant Diseases with Restricted Fungicides in Europe. *Annual Review of Phytopathology*, V. 32, p. 559-581, 1994.
54. GROMOVYKH, T.I.; LITOVKA, Y.A.; GROMOVYKH, V.S.; MAKHOVA, E.G. Effect of strain *Trichoderma asperellum* (MG-97) towards

- fusarioses of *Larix sibirica* seedlings. Mikologiya i fitopatologiya 36, p. 70-75, 2002.
55. GUPTA, R.; JUNG E.; BRUNAK S. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. Em preparação, 2004.
 56. GUSTIN, M C.; ALBERTYN, J.; ALEXANDER, M. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62 (4), p. 1264–300, 1998.
 57. HADAR, Y., CHET, I. E HENIS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with brean culture of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 69:64-68. 1979.
 58. HARAN, S.; SCHICKLER, H. E CHET, I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology 142: 2321–2331, 1996.
 59. HARMAN, G.C., CHET, I. E BAKER, R. *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedlings diseases induced in radish and pea by *Pythium* spp. or *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 70:1167-1172. 1980
 60. HARMAN, G.E. Myths and Dogmas of Biocontrol. Plant Disease 84, p. 377-393, 2000.
 61. HARMAN, G.E.; HOWELL C.R.; VITERBO, A., CHET I. E LORITO M. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews, Microbiology V. 2, 2004.
 62. HAWKSWORTH, D.L.; KIRK,P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.M. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi 8 ed., Editora IMI, Reino Unido, 1995.
 63. HENIS Y., GRAFFAR, A. E BAKER, R. Factors affecting suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. Phytopathology 69:1164-1169. 1979.
 64. HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS P.M. Real Time Quantitative PCR. Genome Research, v. 6, p. 986-994, 1996.
 65. HERMOSA, M.R.; GRONDONA, I.; ITURRIAGA E.A.; DIAZ-MINGUEZ, J.M.; CASTRO, C.; MONTE E.; GARCIA-ACHA I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. Appl. Environ. Microbiol. 66 (5), p. 1890-1898, 2000.

66. HERMOSA, M.R.; KECK E.; CHAMORRO I., RUBIO B., SANZ L., VIZCAINO J.A., GRONDONA I. E MONTE E. Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates, *Mycol. Res.* 108 (8): 897–906, 2004.
67. HERRERA-ESTRELLA, A. E CHET, I Biocontrol of bacteria and phitopathogenic fungi. In *Agriculture Biotechnology*. Ed. Arien Altman. Marcel Dekker, Inc. New York, p. 263-282, 1998.
68. HJELJORD L., E TRONSMO A. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biocontrol: an overview. In KUBICEK C.P. E HARMAN G.E. (ed.), *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor E Francis, Ltda., London, United Kingdom, p. 135–151, 1998.
69. HOLMES, K.A.; SCHROERS, H.J.; THOMAS, S.E.; EVANS, H.C. E SAMUELS,G.J. ,2003. cDNA parcial do fator de alongamento traducional de *Trichoderma asperellum*, linhagem CBS 433.97. Dados não publicados. Banco de dados público Genbank catalogada no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) sob o número AY376058.
70. HUANG X. E MADAN A. Cap3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9 (9), p. 868-877, 1999.
71. INBAR, J., ABRAMSHY, D., COHEN, D. E CHET, I. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. *European Journal of Plant Pathology* 100: 337–346, 1994.
72. INBAR, J.; MENENDEZ, A. E CHET, I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biol. Biochem.* 28, p. 757–763, 1996.
73. INOUE H.; NOJIMA H.; OKAYAMA H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96 (1), p. 23-28, 1990.
74. KITAMOTO Y.; KONO R.; SHIMOTORI A.; MORI N.; ICHIKAWA Y. Purification and some properties of na exo â-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Abricultural Biological and Chemistry* 51 (12), p. 3385-3386, 1987.

75. KIM DJ, BAEK JM, URIBE P, KENERLEY CM E COOK DR Cloning and characterisation of multiple glycosyl hydrolase genes from *Trichoderma virens*. *Curr Genet* 40, p. 374–384, 2002.
76. KNUDSEN, G.R. E BIN, L. Effects of temperature, soil moisture, and wheat bran on growth of *Trichoderma harzianum* from alginate pellets. *Phytopathology* 80:724-727. 1990.
77. KOVACS K, SZAKACS G, PUSZTAHELYI T, PANDEY A Production of chitinolytic enzymes with *Trichoderma longibrachiatum* IMI 92027 in solid substrate fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 118 (1-3), p.189-204, 2004.
78. KREDICS L.; ANTAL Z. S.; SZEKERES A.; HATVANI L.; MANCZINGER L.; VAGVOLGYI C.; NAGY E. Extracellular proteases of *Trichoderma* species: A review. *Acta microbiologica et immunologica hungarica* 52, p. 169-184, 2005.
79. KUBICEK, C.P. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*, structure, multiplicity, mode of action and regulaton of formation. *Adv Biochem Engineer Biotechnol*, v. 45, p.1-27, 1992.
80. KUBICEK, C.P.; MACH, R.L.; PETERBAUER, C.K.; E LORITO, M. *Trichoderma*: From Genes to Biocontrol. *Journal of Plant Pathology*, v. 83 (2), p. 11-23, 2001.
81. KUBICEK C.P.; BISSETT J. DRUZHININA I.; KULLNIG-GRADINGER C.; SZAKACS G. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet Biol.* 38 (3), p. 310-319, 2003.
82. KUBICEK C.P.; KOMOÑ-ZELAZOWSKA M.; SÁNDOR E.; DRUZHININA I.S. Facts and challenges in the understanding of the biosynthesis of peptaibols by *Trichoderma*. *Chem Biodivers.* 4 (6), p. 1068-1082, 2007.
83. KUBICEK C.P.; BAKER S.; GAMAUF C.; KENERLEY C.M.; DRUZHININA I.S. Purifying selection and birth-and-death evolution in the class II hydrophobin gene families of the ascomycete *Trichoderma/Hypocrea*. *BMC Evol Biol.* 10, 2008.

84. KULLNIG C.; SZAKACS G.; KUBICEK C.P. Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycological Research*, v. 104, p. 1117-1125, 2000.
85. KWOK O.C.H.; FAHY P.C.; HOITINK H.A. E KUTER, G.A. Interactions between bacteria and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia* spp. damping-off in bark compost media. *Phytopathology* 77:1206-1212. 1987.
86. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, p. 680-685, 1970.
87. LEWIS J.A. E PAPAIVIZAS G.C. Application of *Trichoderma* and *Gliocladium* in alginate pellets for control of *Rhizoctonia* damping-off. *Plant Pathology* 36:438-446. 1987
88. LEWIS, J.A., LARKIN, R.P. E ROGERS, D.L. A formulation of *Trichoderma* and *Gliocladium* to reduce damping-off caused by *Rhizoctonia solani* and saprophytic growth of the pathogen in soilless mix. *Plant Disease* 82:501-506. 1998.
89. LI L.; QU Q.; TIAN B. E ZHANG K.Q. Induction of Chlamydospores in *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium roseum* by Antifungal Compounds Produced by *Bacillus subtilis* C2 *Journal Phytopathology* 153, p. 686–693, 2005.
90. LIECKFELDT E.; SAMUELS G.J.; NIRENBERG H.I.; PETRINI O. A Morphological and Molecular Perspective of *Trichoderma viride*: Is It One or Two Species? *Appl Environ Microbiol.* 65 (6), p. 2418–2428, 1999.
91. LIMA, A.L. Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de *Trichoderma* spp. isolados de solo do cerrado brasileiro. Tese de Doutorado apresentada ao departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília. 73 p., 2002.
92. LIMA, L.H.C.; ULHOA, C.J.; FERNANDES A.P. E FELIX C.R. Purification of a chitinase from *Trichoderma* sp. and its action on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 43, p. 31-37, 1997.
93. LIU, S. E BAKER, R. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70, p. 404-412, 1980.

94. LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- CT Method. *Methods* 25, p. 402–408, 2001.
95. LORA JM, DE LA CRUZ J, LLOBELL A, BENITEZ T & PINTOR-TORO JA Molecular characterization and heterologous expression of an endo-b-1,6-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Mol Gen Genet* 247, p. 639–645, 1995.
96. LORITO, M.; HAYES, K.; DI PIETRO A.; WOO S.L. HARMAN, G.E. Purification, characterization and synergistic activity of a glucan β -1,3-glucosidase and an N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Molecular Plant Pathology* 84, p. 398-405, 1994a.
97. LORITO, M.; HARMAN, G.E; HAYES, C.K; BRODWAY, R.M; TROSMO, A.; WOO, S.L; PIETRO, A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*, antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*, v. 83, p. 302-07, 1994b.
98. LORITO, M. Chitinolytic enzymes and their genes. In: *Trichoderma and Gliocladium – enzymes, biological control and commercial applications* (HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P., eds). London, Taylor & Francis, vol 2, pp. 73-99, 1998.
99. LÜBECK M.; BULAT S.; ALEKHINA I.; LIECKFELDT E. Delineation of species within the *Trichoderma viride/atroviride/koningii* complex by UP-PCR cross-blot hybridization. *FEMS Microbiology Letters* 237 (2), p. 255–260, 2006.
100. MARTIN KL, MCDOUGALL BM, UNKLES SE E SEVIOUR RJ The three b-1,3-glucanases from the fungus *Acremonium blochii* strain C59 appear to be encoded by separate genes. *Mycol Res* 110, p. 66–74, 2006.
101. MARTIN K., MCDOUGALL B.M., MCILROY S., JAYUS, CHEN J. E SEVIOUR R.J. Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal β -(1,3)- and β -(1,6)-glucanases. *FEMS Microbiol Rev* 31, p. 168–192, 2007.
102. MARTINEZ D.; BERKA R.M.; HENRISSAT B.; SALOHEIMO M.; ARVAS M.; BAKER S.E.; CHAPMAN J.; CHERTKOV O.; COUTINHO P.M.; CULLEN D.; DANCHIN E.G.; GRIGORIEV I.V.; HARRIS P.;

JACKSON M.; KUBICEK C.P.; HAN C.S.; HO I.; LARRONDO L.F.; DE LEON A.L.; MAGNUSON J.K.; MERINO S.; MISRA M.; NELSON B.; PUTNAM N.; ROBERTSE B.; SALAMOV A.A.; SCHMOLL M.; TERRY A.; THAYER N.; WESTERHOLM-PARVINEN A.; SCHOCH C.L.; YAO J.; BARBOTE R.; NELSON M.A.; DETTER C.; BRUCE D.; KUSKE C.R.; XIE G.; RICHARDSON P.; ROKHSAR D.S.; LUCAS S.M.; RUBIN E.M.; DUNN-COLEMAN N.; WARD M.; BRETTIN T.S. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). Nat. Biotechnol. 26 (5), p. 553-560, 2008.

103. MARTINS-CORDER, M.P. E MELO, I.S. Antagonismo "in vitro" de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* KLEB. Scientia Agrícola 55: 1-7, 1998.
104. MELO, I.S.; AZEVEDO, J. L. Controle biológico, v. 1. Ed. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, p.69-96, 1998.
105. MENDOZA-MENDOZA, A.; POZO, M.J.; GRZEGORSKI, D. Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma* through inactivation of a mitogen-activated protein kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100 (26), p. 15965–15970, 2003.
106. MESTRIES E.; GENTZBITTEL L.; DE LABROUHE D.T.; NICOLAS P. E VEAR F. Analyses of quantitative trait *loci* associated with resistance to shape *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflowers (shape *Helianthus annuus* L.) using molecular markers. Biomedical and Life Sciences, V. 4 (3), 1998.
107. MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31, p. 426:428, 1959.
108. MITCHEL, A.D.; TAYLOR, I.E. Cell-wall proteins of *Aspergillus niger* an *Claetomium globosum*. Journal of General Microbiology 50, p. 103-109, 1969.
109. MONTERO M.; SANZ L.; REY M.; LLOBELL A.; MONTE E. Cloning and characterization of bgn16.3, coding for a beta-1,6-glucanase expressed during *Trichoderma harzianum* mycoparasitism. J. Appl. Microbiol. 103 (4), p. 1291-1300, 2007.

110. MONTEIRO V.N. E ULHOA C.J. Biochemical characterization of a beta-1,3-glucanase from *Trichoderma koningii* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*. *Current Microbiology* 52 (2), p. 92-96, 2006.
111. MOUYNA I, SARFATI J, RECCO P, FONTAINE T, HENRISSAT B E LATGE J.P. Molecular characterization of a cell wall-associated beta(1–3) endoglucanase of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 40: 455–464, 2002.
112. MUKHERJEE, P.K.; LATHA, J.; HADAR, R. TmkA, a mitogen-activated protein kinase of *Trichoderma virens*, is involved in biocontrol properties and repression of conidiation in the dark. *Eukaryot Cell*, 2 (3), p. 446–455, 2003.
113. NELSON E.B.; KUTER G.A.; HOITINK H.A.J. Effects of fungal antagonists and compost age on suppression of *Rhizoctonia* damping-off in container media amended with composted hardwood bark. *Phytopathology* 73, p. 1457–1462, 1983.
114. NEUHOF T.; DIECKMANN R.; DRUZHININA I.S.; KUBICEK C.P.; NAKARI-SETÄLÄ T.; PENTTILÄ M.; VON DÖHREN H. Direct identification of hydrophobins and their processing in *Trichoderma* using intact-cell MALDI-TOF MS *FEBS Journal* 274 (3), p. 841–852, 2007.
115. NIERMAN, W.C.; PAIN, A.; ANDERSON, M.J.; WORTMAN, J.R.; KIM, H.S.; ARROYO, J.; BERRIMAN, M.; ABE, K.; ARCHER, D.B.; BERMEJO, C.; BENNETT, J.W.; BOWYER, P.; CHEN, D.; COLLINS, M.; COULSEN, R.; DAVIES, R.; DYER, P.S.; FARMAN, M.L.; FEDOROVA, N.; FEDOROVA, N.D.; FELDBLYUM, T.V.; FISCHER, R.; FOSKER, N.; FRASER, A.; GARCIA, J.L.; GARCIA, M.J.; GOBLE, A.; GOLDMAN, G.H.; GOMI, K.; GRIFFITH-JONES, S.; GWILLIAM, R.; HAAS, B.J.; HAAS, H.; HARRIS, D.E.; HORIUCHI, H.; HUANG, J.; HUMPHRAY, S.; JIMENEZ, J.; KELLER, N.; KHOURI, H.; KITAMOTO, K.; KOBAYASHI, T.; KONZACK, S.; KULKARNI, R.; KUMAGAI, T.; LAFTON, A.; LATGE, J.P.; LI, W.; LORD, A.; LU, C.; MAJOROS, W.H.; MAY, G.S.; MILLER, B.L.; MOHAMOUD, Y.; MOLINA, M.; MONOD, M.; MOUYNA, I.; MULLIGAN, S.; MURPHY, L.D.; O'NEIL, S.; PAULSEN, I.; PENALVA, M.A.; PERTEA, M.;

- PRICE, C.; PRITCHARD, B.L.; QUAIL, M.A.; RABBINOWITSCH, E.; RAWLINS, N.; RAJANDREAM, M.A.; REICHARD, U.; RENAULD, H.; ROBSON, G.D.; RODRIGUEZ DE CORDOBA, S.; RODRIGUEZ-PENA, J.M.; RONNING, C.M.; RUTTER, S.; SALZBERG, S.L.; SANCHEZ, M.; SANCHEZ-FERRERO, J.C.; SAUNDERS, D.; SEEGER, K.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TAKEUCHI, M.; TEKAIA, F.; TURNER, G.; VAZQUEZ DE ALDANA, C.R.; WEIDMAN, J.; WHITE, O.; WOODWARD, J.R.; YU, J.-H.; FRASER, C.M.; GALAGAN, J.E.; ASAI, K.; MACHIDA, M.; HALL, N.; BARRELL, B.G.; DENNING, D.W. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438, p. 1151-1156, 2005.
116. NIKOLSKAYA A, PITKIN J, SCHAEFFER H, AHN J E WALTON J EXG1p, a novel exo- β 1,3-glucanase from the fungus *Cochliobolus carbonum*, contains a repeated motif present in other proteins that interact with polysaccharides. *Biochim Biophys Acta* 1425: 632–636, 1998.
117. NOBE R, SAKAKIBARA Y, OGAWA K E SUIKO M Cloning and expression of a novel *Trichoderma viride* laminarinase AI gene (lamAI). *Biosci Biotechnol Biochem* 68, p. 2111–2119, 2004.
118. NORONHA E.F.; ULHOA C.J. Purification and characterization of an endo- β 1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal Microbiology* 42, p. 1039-1044, 1996.
119. NORONHA E.F.; ULHOA C.J. Characterization of a 29-kDa β 1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters* 183, p. 119-123, 2000.
120. NORONHA E.F.; KIPNIS A.; JUNQUEIRA-KIPNIS A.P.; ULHOA C.J. Regulation of 36-kDa β 1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *Fems Microbiology Letters* 188 (1), p. 19-22, 2000.
121. PAN, S.Q.; YE, X.S. E KUE, J. Direct detection of β 1,3-glucanase isozymes on polyacrilamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels. *Analytical Biochemistry* 182, p. 136-140, 1989.
122. PAPAIVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 23, p. 23–54, 1985.

123. PEBERDY, J.F. Protein secretion in filamentous fungi – trying to understand a highly productive black box. *Trends in Biotechnology* 12, p. 50-57, 1994.
124. PITSON S.M.; SEVIOUR R.J.; McDOUGALL B.M. Noncellulolytic fungal α -1,3-glucanases: Their Physiology and Regulation. *Enzyme Microbial and Technology* 15, p. 178-192, 1993.
125. PONTING C.P.; HOFMANN K.; BORK P. A latrophilin/CL-1-like GPS domain in polycystin-1. *Curr. Biol.* 26, p. 585-588, 1999.
126. RIFAI, M.A. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.* 116, p.1-56, 1969.
127. PITSON S.; SEVIOUR R. E MCDUGALL B. Effect of carbon source on extracellular (1–3)- and (1–6)-b-glucanase production by *Acremonium persicinum*. *Can. J. Microbiol.* 43, p. 432–439, 1997.
128. RAGSDALE N.N. E SISLER H.D. Social and Political Implications of Managing Plant Diseases with Decreased Availability of Fungicides in the United States. *Annual Review of Phytopathology*, V. 32, p. 545-557, 1994.
129. RAMOT O.; COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. Regulation of α -1,3-glucanase by carbon starvation in the mycoparasite *Trichoderma harzianum*. *Mycological Research* 104, 415-420, 2000.
130. RAMOT O; VITERBO A.; FRIESEM D.; OPPENHEIM A.; CHET I. Regulation of two homodimer hexosaminidases in the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum* by glucosamine. *Curr Genet.* 45 (4), p.205-213, 2004.
131. REITHNER, B.; BRUNNER, K.; SCHUHMACHER, R. The G protein alpha subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genet. Biol.* 42 (9), p. 749–760, 2005.
132. ROCHA-RAMIREZ, V.; OMER, C.; CHET, I. *Trichoderma atroviride* G-protein alpha-subunit gene *tga1* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. *Eukaryot Cell*, 1(4), p. 594–605, 2002.
133. ROIGERS, D.J., JEFFERS, S.N., CALDWELL, R.W. Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v.23, p.352-359, 1991.

134. ROTEM Y, YARDEN O. E SZTENJNBERG A. The mycoparasite *Ampelomyces quisqualis* expresses exgA encoding an exo-b-1,3-glucanase in culture and during mycoparasitism. *Phytopathology* 89: 631–638, 1999.
135. SAMUELS, G.J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research* 100: 925–935, 1996.
136. SAMUELS, G.J.; LIECKFELDT E.; NIRENBERG, H.I. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia* 51, p. 71-78, 1999.
137. SAMUELS, G.J.; SUAREZ, C.; SOLIS, K.; HOLMES, K.A.; THOMAS, S.E.; ISMAIEL, A. E EVANS, H.C. *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South America - Gene parcial de actina de *Trichoderma atroviride* linhagem CBS 142.95. Banco de dados público Genbank catalogada no *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* (www.ncbi.nlm.nih.gov) sob o número DQ111971. *J. Mycol. Res.* 110, (4), p. 381-392 (2006).
138. SANTOS, T.; SANCHEZ, M.; VILLANUEVA, J.R.; NOMBELA, C. Regulation of the α -1,3-glucanase system in *Penicillium italicum*: Glucose repression of the various enzymes. *Journal of Bacteriology*, 133 (2), p. 455-471, 1977.
139. SANZ L.; MONTERO M.; GRONDONA I.; VIZCAÍNO J.A.; LLOBELL A.; HERMOSA R.; MONTE E. Cell wall-degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma* biocontrol strains show correlation with rDNA taxonomic species. *Curr. Genet.* 46 (5), p. 277-286, 2004.
140. SCHIRMBÖCK, M.; LORITO, M.; WANG, Y.; HAYES, C.K.; ARISAN-ATAC, I.; SCALA, F.; HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, p. 4364–4370, 1994.
141. SHORESH M., GAL-ON A., LEIBMAN D. , E CHET I. Characterization of a mitogen-activated protein kinase gene from cucumber required for *Trichoderma*-Conferred Plant Resistance *Plant Physiology* 142, p. 1169–1179, 2006.

142. SILVA A.R. Produção e caracterização da endo- α -1,3-glucanase de *Trichoderma asperellum*. Goiânia, Goiás. Universidade de Goiás. Dissertação (Mestrado em Biologia), Instituto de Ciências Biológicas (UFG), Universidade Federal de Goiás, 2005.
143. STAHMANN K.; SCHIMZ K. E SAHM H. Purification and characterization of four extracellular 1,3- α -glucanases of *Botrytis cinerea*. J. Gen. Microbiol. 139, p. 2833–2840, 1993.
144. STEYAERT J.M.; STEWART A. E RIDGWAY, H.J. Co-expression of two genes, a chitinase (chit42) and proteinase (prb1), implicated in mycoparasitism by *Trichoderma hamatum*. Journal of Mycologia 96 (6), p. 1245-1252, 2004.
145. THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. E HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 24, p. 4876-4882, 1997.
146. THRANE C.; TRONSMO A.; JENSEN D.F. Endo- α -1,3-glucanase and cellulose from *Trichoderma harzianum*: Purification and partial characterization, induction of and biological activity against plant pathogenic *Pythium* spp. European Journal of Plant Pathology 103, p. 331-344, 1997.
147. TRILLAS M.I.; CASANOVA E.; COTXARRERA L.; ORDOVÁS J.; BORRERO C.; AVILÉS M. Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. Biological Control 39, p. 32–38, 2006.
148. ULHOA, C.J.; PEBERDY, J.F. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. Enzyme and Microbial Technology 14, p. 236-240, 1992.
149. VÁZQUEZ-GARCIDUEÑAS S.; LEAL-MORALES C.A.; HERRERA-ESTRELLA A. Analysis of the beta-1,3-Glucanolytic System of the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. Appl Environ Microbiol. 64 (4), p. 1442-1446, 1998.
150. VITERBO A. E CHET I. *TasHyd1*, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. Molecular Plant Pathology, V. 7 (4), p. 249–258, 2006.

151. VITERBO A.; HAREL, M. E CHET, I. Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots. FEMS Microbiology Letters 238, p. 151-158, 2004.
152. VITERBO A.; MONTERO M.; RAMOT O.; FRIESEM D.; MONTE E.; LLOBELL A.; CHET I. Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). Curr Genet 42, p. 114–122, 2002.
153. VIZCAÍNO J.A.; REDONDO J.; SUÁREZ M.B.; CARDOZA R.E.; HERMOSA R.; GONZÁLEZ F.J.; REY M.; MONTE E. Generation, annotation, and analysis of ESTs from four different *Trichoderma* strains grown under conditions related to biocontrol. Appl Microbiol Biotechnol. 75(4), p. 853-862, 2007.
154. ZHANG Z.; SCHWARTZ S.; WAGNER L.; MILLER W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J. Comput Biol 7 (1-2), p. 203-214, 2000.
155. WANG C.; EUFEMI M.; TURANO M.; GIARTOSIO A. Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. Biochemistry 35, p. 7299–7307, 1996.
156. WATANABE, S.; KATO, H.; KUMAKURA, K.; ISHIBASHI, E.; NAGAYAMA, K. Properties and biological control activities of aerial and submerged spores in *Trichoderma asperellum* SKT-1. Journal of Pesticide Science 31, p. 375-379, 2006.
157. WEINDLING, R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology 22, p. 837-845, 1932.
158. WESSELS J.G.H. Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. Adv Microb Physiology 38, p. 1-45, 1997
159. WITKOWSKA D.E. E MAJ A. Production of lytic enzymes by *Trichoderma* spp. and their effect on the growth of phytopathogenic fungi. Folia Microbiol (Praha) 47 (3), p. 279-82, 2002.
160. YEDIDIA, I., BENHAMOU, I.N. E CHET, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativa* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 65: 1061–1070, 1999.

161. ZDOBNOV E.M.; APWEILER R. InterProScan - an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* 17 (9), p. 847-848, 2001.
162. ZEILINGER S.; GALHAUP C.; PAYER K.; WOO S.L.; MACH R.L.; FEKETE C.; LORITO M. E KUBICEK P. Chitinase gene expression during micoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genetics and Biology* 26, p. 131-140, 1999.
163. ZEILINGER S. E OMANN M. *Trichoderma* Biocontrol: Signal Transduction Pathways Involved in Host Sensing and Mycoparasitism, *Gene Regulation and Systems Biology* 1, p. 227–234, 2007.

Ms. Ref. No.: MICRES-D-07-00384R2

Sent: Friday, August 08, 2008.

Title: Expression analysis of the exo-beta-1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*

MICROBIOLOGICAL RESEARCH

Dear Cirano,

I am pleased to confirm that your paper "Expression analysis of the exo-beta-1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*" has been accepted for publication in Microbiological Research.

The PDF that I received contains two sets of Figures. This should be taken care of at the proofs stage.

Thank you for submitting your work to this journal I am sure it will make a valuable contribution to our journal and I hope you will consider Microbiological REsearch again for submitting your future work.

With kind regards,

Jürgen Wendland
Editor in Chief
Microbiological Research

Expression analysis of the *exo-b-1,3-glucanase* from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*

César Marcos Marcello^a, Andrei Stecca Steindorff^b, Silvana Petrofeza da Silva^b, Roberto do Nascimento Silva^b, Luiz Artur Mendes Bataus^b, Cirano José Ulhoa^b

^A - Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, 70910-900 DF, Brazil

^B - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 74.001-940 Goiânia, Go, Brazil

Received 14 December 2007; received in revised form 5 August 2008; accepted 8 August 2008

KEYWORDS: *Exo-b-1,3-glucanase*; *Trichoderma asperellum*; Regulation; Mycoparasitism

SUMMARY

The regulation of the gene encoding the extracellular *exo-b-1,3-glucanase* (*tag83*) produced by the mycoparasite *Trichoderma asperellum* was studied. Enzyme activity was detected in all carbon sources, but the highest levels were found when starch and purified cell walls from *Rhizoctonia solani* were used. These results are supported by the appearance of one strong band with enzyme activity in non-denaturing PAGE. Experiments using RT-PCR showed that *exo-b-1,3-glucanase* induction in *T. asperellum* occurred at the transcriptional level. We used RT-PCR and real-time PCR analysis to examine the expression of *tag83* gene during *in vivo* assay of *T. asperellum* against *R. solani*. We showed that the expression of *tag83* is significantly increased by the presence of *R. solani*.
& 2008 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Species of the genus *Trichoderma* have been found to attack a wide range of plant-pathogenic fungi and have been used as biocontrol agents (Howell, 2003). The majority of *Trichoderma* preparations used commercially for biological control are *Trichoderma atroviride* or *Trichoderma harzianum*. However, *Trichoderma asperellum*, a less well-studied species, is also an effective biological control agent against rice seedborne diseases (Watanabe et al., 2006), *Rhizoctania solani* (Trillas et al., 2006), *Fusarium sporotrichioides* (Gromovykh et al., 2002) and *Fusarium oxysporum* (Cotxarrera et al., 2001). The interaction of *T. asperellum* with *R. solani* is characteristically mycoparasitic, involving growth along the host hyphae, production of appressoria-like structures and coiling (Harman et al., 2004). However, little is known about the genetics and biochemistry of mycoparasitism in *T. asperellum*. Most phytopathogenic fungi have cell wall that contain chitin as a structural backbone arranged in regularly ordered layers and *b-1,3-glucan* as a filling material arranged in an amorphous manner. Chitinases and *b-1,3-glucanases* have been found to be directly involved in the mycoparasitism interaction between *Trichoderma* species and its hosts (Harman et al., 2004; Howell, 2003).

ARTICLE IN PRESS

www.elsevier.de/micres

0944-5013/\$ - see front matter & 2008 Elsevier GmbH. All rights reserved.

doi:10.1016/j.micres.2008.08.002

Corresponding author. Tel.: +55 62 35211473.

E-mail address: ulhoa@icb.ufg.br (C.J. Ulhoa).

Please cite this article as: Marcello CM, et al. Expression analysis of the *exo-b-1,3-glucanase* from the mycoparasitic fungus

Trichoderma asperellum. Microbiol Res 2006; (2008), doi:10.1016/j.micres.2008.08.002