

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MOLECULARES

Estudos Bioquímicos de proteases extracelulares e expressão de seus genes de isolados de *Trichoderma* spp. após crescimento em parede celular de *Rhizoctonia solani*

Dayana Rosa de Melo

Orientador: Profa.Dra. Valdirene Neves Monteiro

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MOLECULARES

Estudos Bioquímicos de proteases extracelulares e expressão de seus genes de isolados de *Trichoderma* spp. após crescimento em parede celular de *Rhizoctonia solani*

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Dayana Rosa de Melo

Orientador: Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro

Anápolis, setembro de 2012.

Melo, Dayana Rosa.

Estudos Bioquímicos de proteases extracelulares e expressão de seus genes de isolados de *Trichoderma* spp. após crescimento em parede celular de *Rhizoctonia solani*. – 2012.

72 folhas. il figuras.

Orientador: Prof. Dr Valdirene Neves Monteiro

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, 2012.

1. Trichoderma. 2. Estudos Bioquimicos. 3. Proteases. I. Título.

"A mente que se abre a uma nova idéia nunca voltará ao tamanho original"
Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais Cida e Wiosmar que me deram coragem, suporte e persistência;

Aos meus irmãos Danylo, Ledyane e Fredman que são meus ombros amigos para toda e qualquer hora;

Ao meu marido Victor principal apoiador e incentivador de todas minhas loucuras, companheiro para vida toda;

A Valdirene que com paciência e sabedoria me orientou nesse trabalho e que se tornou amiga incrível ao longo dessa jornada;

Aos colegas do laboratório Andrei, Amanda, Marcela, Marcelo, Fabiano, Saulo, Rogerio, Vanessa, Kenia, Raphaella, que ajudaram em cada centímetro dessas palavras com suas experiências e ensinamentos;

Ao professor Cirano que me acolheu em seu laboratório com extremada simpatia;

Mas principalmente a Deus pela força, pela fé, pela proteção e por tudo o que permeou esse trabalho tornando-o possível.

Obrigada!!

ESTUDOS BIOQUÍMICOS DE PROTEASES EXTRACELULARES E EXPRESSÃO DE SEUS GENES DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. APÓS CRESCIMENTO EM PAREDE CELULAR DE *Rhizoctonia solani*

DAYANA ROSA DE MELO

Dissertação apresentada ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada por:



Prof. Dra. Valdirene Neves Monteiro (UEG)



Prof. Dr. Flavio Marques Lopes (UFG)



Prof. Dra. Raphaela de Castro Georg (UFG)

ANÁPOLIS, GO - BRASIL
SETEMBRO 2012

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. Proteases	14
2.1.1. Classificação	14
2.1.2. Funções fisiológicas das proteases	15
2.1.3. Obtenção e Aplicações biotecnológicas de proteases	16
2.2. O gênero <i>Trichoderma</i>	17
2.2.1. Micoparasitismo	18
2.3. Principais enzimas envolvidas no micoparasitismo	22
2.3.1. Quitinases	22
2.3.2. Glucanases	23
2.3.3. Proteases	24
2.4. Aspectos gerais do fitopatogeno <i>Rhizoctonia solani</i>	26
3. JUSTIFICATIVA	28
4. OBJETIVOS GERAIS E ESPECIFICOS	29
4.1. Objetivos Gerais	29
4.2. Objetivos Específicos	29
5. METODOLOGIA	30
5.1. Manutenção dos isolados	30
5.2. Avaliação da capacidade antagonista de <i>Trichoderma</i>	30
5.3. Produção e tratamento da parede celular de <i>Rhizoctonia solani</i>	30
5.4. Cinética de produção de proteases extracelulares de <i>Trichoderma</i>	31
5.4.1. Obtenção de micélios	31

5.4.2. Cinética de produção de proteases	31
5.5. Determinação de proteínas totais	32
5.6. Determinação da atividade de proteases	32
5.7. Cromatografia de afinidade com Bacitracina	32
5.8. Avaliação das classes de proteases nos extrato de proteases (EP) dos isolados de <i>Trichoderma</i> .	33
5.9. Avaliação da Atividade enzimática dos extratos de proteases (EP) dos isolados de <i>Trichoderma</i> em albumina e Azocaseína.	33
5.10. pH e temperatura ótimos dos extratos de proteases (EP) dos isolados de <i>Trichoderma</i> .	33
5.11. Efeito de íons na atividade enzimática nos extratos de proteases (EP) dos isolados de <i>Trichoderma</i> .	33
5.12. Efeito de detergentes na atividade enzimática nos extratos de proteases (EP) dos isolados de <i>Trichoderma</i> .	34
5.13. Análise do perfil proteico dos EP dos isolados de <i>Trichoderma</i> por SDS-PAGE.	34
5.14. Zimograma dos EP dos isolados de <i>Trichoderma</i>	35
5.15. Extração de RNA	35
5.16. Síntese de cDNA	36
5.17. Análise de expressão por qRT-PCR	36
6. RESULTADOS E DISCUSSAO	38
6.1. Teste de pareamento	38
6.2. Atividade específica de proteases nos diferentes tempos de indução	40
6.3. Cromatografia de afinidade em bacitracina	41
6.4. Avaliação das classes de proteases nos extrato de proteases (EP) dos isolados de <i>Trichoderma</i> .	43
6.5. Avaliação da Atividade enzimática dos extratos de proteases (EP) dos isolados de <i>Trichoderma</i> em Albumina e Azocaseína.	45
6.6. pH e temperatura ótimos dos extratos de proteases (EP) dos isolados de <i>Trichoderma</i> .	45
6.7. Efeito de detergentes na atividade enzimática nos extratos de proteases (EP) dos isolados de <i>Trichoderma</i> .	47
6.8. Efeito de íons na atividade enzimática nos extratos de proteases (EP) dos isolados de <i>Trichoderma</i> .	49
6.9. Análise do perfil proteico dos EP dos isolados de <i>Trichoderma</i> por SDS-PAGE e Zimograma em gelatina a 12%.	51
6.10. RT-PCR para os isolados de <i>T harzianum</i> (494/02 e ALL 42)	52
6.11. Correlação entre quitinase 42kD, β 1,3 endoglucanase, nagase e proteases nos isolados de <i>T harzianum</i> (494/02 e ALL 42)	57
7. CONCLUSÕES	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência adquirida

BDA: Meio Batata dextrose e Agar

EC: Comissão de Enzimas

EP: Extrato de Proteases

IUB: União Internacional de Bioquímica

IUBMB: União de Bioquímica e Biologia Molecular

ITS: Espaçador interno transcrito

NC-IUBMB: União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

PCRS: Parede Celular de *Rhizoctonia solani*

RT-PCR: Transcrição Reversa- Reação em Cadeia da Polimerase

SDS-PAGE.: Gel de Poliacrilamida – Dodecil Sulfato de Sódio

PMSF: Fluoreto de fenilmetilsulfônio

LISTA DE FIGURAS

	Pag
Figura 1: Evento de pré-contato na interação de <i>Trichoderma</i> -Fungo hospedeiro.	19
Figura 2: Estrutura da parede celular de fungos. (MONTEIRO, 2008)	21
Figura 3: Micoparasitismo de <i>Trichoderma spp</i> em <i>R. solani</i>	21
Figura 4: Teste de pareamento entre os isolados de <i>Trichoderma</i> e o fitopatogeno <i>R solani</i> .	39
Figura 5: Atividade especifica dos extratos brutos de proteases em PCRS nos tempos de indução de 6, 12, 24 e 48 horas	41
Figura 6: Cromatografia de afinidade em pH 5,0 e 8,0, nos isolados 494/02, T00, ALL 42 e 301/01 medias de 3 replicatas	42
Figura 7: Efeito de inibidores nos extratos parcialmente purificados	43
Figura 8: Efeito do substrato nos extratos parcialmente purificados	45
Figura 9: Efeito de temperatura nos extratos parcialmente purificados	46
Figura 10: Efeito de pH nos extratos parcialmente purificados	46
Figura 11: Efeito de detergentes em extratos parcialmente purificados	48
Figura 12: Efeito de íons nos extratos parcialmente purificados	49
Figura 13: Zimograma dos EPs dos isolados de <i>Trichoderma</i>	51
Figura 15: SDS – Page dos EPs dos isolados de <i>Trichoderma</i>	51
Figura 14: Expressão de proteases frente a PCRS de ALL42 e 494/02	53
Figura 15: Expressão de enzimas hidrolíticas frente a PCRS de ALL42 e 494/02	55

LISTA DE TABELAS

	Pag
Tabela 1: Classificação de peptidases de acordo com o modo de ação	15
Tabela 2: Fontes de proteases e aplicações industriais	17
Tabela 3: Resumo das enzimas quitinolíticas purificadas de <i>Trichoderma harzianum</i> , induzidas por quitina.	22
Tabela 4. Resumo das -1,3-glucanase purificadas de <i>Trichoderma harzianum</i> .	24
Tabela 5: Correlação entre enzimas expressas em PCRS de ALL 42	58
Tabela 6: Correlação entre enzimas expressas em PCRS de 494/02	59

RESUMO

Espécies de *Trichoderma* tem sido estudadas principalmente pelo seu reconhecido papel no controle biológico de diversos fitopatógenos, sendo que proteases, glucanases e quitinases estão intrinsecamente envolvidas nesse processo. Esse trabalho objetivou o estudo bioquímico de proteases extracelulares de *Trichoderma virens* (301/01), *Trichoderma harzianum* (494/02 e ALL 42) e *Trichoderma asperellum* (T00) secretadas quando expostas a parede celular de *Rhizoctonia solani* (PCRS) e analisada a expressão dos genes de proteases, glucanases e quitinases frente à PCRS tendo como controle a indução em glicose. A atividade específica de proteases de *T harzianum* foi baixa em comparação a *T virens* e *T asperellum*, demonstrando a alta capacidade de micoparasitismo dessa espécie, já que no confronto em placa de petri todos os isolados foram efetivos contra *R. solani*. Foi utilizada a Cromatografia de afinidade com bacitracina para obtenção dos extratos de proteases, sendo observados perfis diferenciados para os isolados e para pHs 5,0 e 8,0. Foi avaliada a influência de inibidores e detergentes na atividade enzimática no extrato de proteases, PMSF e EDTA inibiram os extratos em aproximadamente 20%, Triton X-100 e SDS inibiram em até 25%. A ação de cátions di e monovalentes foi avaliada revelando um aumento na atividade enzimática em até 40% e uma diminuição de 20% respectivamente. Avaliou-se a afinidade dos extratos de proteases em dois substratos, albumina e azocaseína. A afinidade pela albumina foi baixa em relação a azocazeína para todos os isolados. Em relação a temperatura e pH ótimo verificou-se que os extratos apresentaram temperatura ótima em 50°C e pH ótimo a 8,0. Para avaliar o perfil de proteases dos isolados foi realizada uma cromatografia em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Para avaliar a atividade de proteases em gel de poliacrilamida, as condições foram não desnaturantes (zimograma). A análise da expressão dos genes de proteases foi analisada pela técnica de RT-PCR nos isolados 494/02 e ALL 42 nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas, demonstrando um perfil variando na expressão das proteases trypsin-like, aspartato protease e serino protease. Para analisar a relação da expressão dos genes de proteases e relação à expressão de genes de outras enzimas também envolvidas no micoparasitismo, foi analisada a expressão dos genes de β 1-3 endoglicanase, quitinase 42 kD e N-Acetilglicosaminidase (Nagase) frente a PCRS. O isolado *T. harzianum* (ALL 42) manteve melhor perfil de expressão de aspartato proteases e de β 1-3 endoglicanase, quitinase 42 kD e N-Acetilglicosaminidase (Nagase). O coeficiente de Pearson foi calculado para correlação entre glucanases, quitinases e proteases, correlações positivas foram observadas para o isolado ALL 42 para aspartato protease e β 1-3 endoglicanase, quitinase 42 kD e N-Acetilglicosaminidase (Nagase), enquanto que 494/02 não demonstrou correlação positiva para aspartato protease.

ABSTRACT

Trichoderma species have been studied mainly recognized for its role in biological control of many pathogens, and proteases, glucanases and chitinases are closely involved in this process. This work aimed to study the biochemistry of extracellular proteases from *Trichoderma virens* (301/01), *Trichoderma harzianum* (494/02 and ALL 42) and *Trichoderma asperellum* (T00) secreted when exposed to cell wall of *Rhizoctonia solani* (PCRS) and analyzed the expression genes of proteases, glucanases and chitinases front PCRS to a control induction into glucose. The specific activity of proteases *T harzianum* was low compared to *T asperellum* and *T virens*, showing the high capacity of mycoparasitism of this species, since the confrontation in petri dishes all isolates were effective against *R. solani*. Was used with bacitracin affinity chromatography for obtaining extracts of proteases and different profiles observed for isolates and pH 5.0 and 8.0. The influence of inhibitors and detergents on enzyme activity in the extract of proteases, PMSF and EDTA extracts inhibited by approximately 20%, Triton X-100 and SDS inhibited by 25%. The action of monovalent cations and divalent was evaluated revealing an increase in the enzyme activity by up to 40% and down 20%. We evaluated the affinity of the extracts on two substrates of proteases, albumin, and azocasein. The affinity for albumin was low compared to azocazeína for all isolates. In relation to temperature and pH optima found that the extracts showed optimum temperature at 50 ° C and optimum pH 8.0 To evaluate the profile of the isolated protease was performed on polyacrylamide gel chromatography SDS-PAGE. To evaluate the protease activity polyacrylamide gel electrophoresis, non-denaturing conditions were (zymogram). The analysis of gene expression of proteases was examined by RT-PCR in the isolated 494/02 42 ALL and in intervals of 6, 12, 24 and 48 hours, showing a profile varying in the expression of trypsin-like proteases, aspartate protease and serine protease. To analyze the relationship of gene expression of proteases and to the expression of genes of other enzymes involved in mycoparasitism. Also, we analyzed the gene expression of β 1-3 endoglicanase, 42 kD chitinase and N-acetylglucosaminidase (Nagase) against PCRS . The isolated *T. harzianum* (ALL 42) maintained higher expression profile aspartate proteases and β 1-3 endoglicanase, 42 kD chitinase and N-acetylglucosaminidase (Nagase). The Pearson coefficient was calculated for correlation between glucanases, chitinases and proteases, positive correlations were observed for isolated ALL 42 to aspartate protease and β 1-3 endoglicanase, 42 kD chitinase and N-acetylglucosaminidase (Nagase), whereas 494/02 showed no positive correlation to aspartate protease.

INTRODUÇÃO

O gênero *Trichoderma* com teleomorfismo em *Hypocrea* compreende um grupo de fungos saprófitas e micoparasitas componentes ativos da microbiota do solo, que são amplamente utilizados como agentes de controle biológico de fitopatógenos de solo, folhas e frutos sendo exemplos, *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp, *Rhizoctonia solani* entre outros (ALMEIDA et al., 2007 ; SCHUHMACHER & ZEILLINGER, 2007).

Dentre os mecanismos propostos para o biocontrole de espécies de *Trichoderma* estão: o micoparasitismo através da produção de enzimas degradadoras da parede celular de fitopatógenos, produção de antibióticos voláteis e não-voláteis, competição por nutrientes, rizosfera competente e indução de respostas de defesa em plantas (HOWELL, 2003).

O possível papel de proteases envolvidas no antagonismo de espécies de *Trichoderma* vem sendo descrito desde 1969 por Rodriguez-Kabana e colaboradores, demonstrando a atuação de atividade proteolítica de *T. viride* na diminuição da atividade enzimática de *Sclerotium rolfii*. Outros trabalhos abordaram outros aspectos como a importância do pH para a atividade máxima de proteases, o envolvimento de proteases na competição por substratos protéicos ou em conjunto com quitinases e glucanases na degradação da parede celular da célula hospedeira (ELAD & KAPAT, 1999; SIVAN & CHET, 1989).

O envolvimento do sistema enzimático quitinolítico e b-1,3 glucanolítico no micoparasitismo de *Trichoderma* foi investigado em detalhes, no qual o papel do sistema proteolítico extracelular não é muito bem conhecido (VAZQUEZ-GARCIDUENAS et al., 1998; KUBICEK et al., 2001). Porém recentemente mais abordagens estão sendo realizadas em proteases de *Trichoderma* quanto ao seu potencial papel no biocontrole entre outros (KREDICS et al., 2005).

As proteases são enzimas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas de proteínas, digerindo essas proteínas em peptídeos ou aminoácidos livres. São classificadas de acordo com o seu modo de ação e seus sítios ativos em aspartil, cisteíno, metalo, serino, treonino proteases e proteases com mecanismo catalítico não conhecido. As proteases podem ser divididas de acordo com o mecanismo de clivagem das ligações peptídicas em endoproteases (ou endopeptidases), que clivam as ligações peptídicas dentro do polipeptídeo, e exoproteases (ou exopeptidases) que clivam

ligações peptídicas somente em N- ou C-terminal das cadeias polipeptídicas (MONOD et al.,2002).

Espera-se com esse trabalho ampliar o estudo de proteases secretadas por diferentes isolados de *Trichoderma* tendo como fonte indutora a parede celular de *Rhizoctonia solani* bem como a análise da expressão de proteases por RT-PCR.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Proteases

Enzimas proteolíticas, proteases, proteinases ou peptidases, essa última terminação é mais bem aceita por ser a terminação recomendada pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), catalisam a quebra das ligações peptídicas de proteínas. Essas enzimas são largamente distribuídas em todas as plantas, animais e micro-organismos. Em organismos superiores, cerca de 2% dos genes codificam essas enzimas (MAHAJAN; BADGUJAR, 2010).

2.1.1. Classificação

Proteases são classificadas segundo a IUBMB, no grupo 3 – hidrolases, subgrupo 4. Elas também são classificadas segundo três critérios: (1) tipo de reação catalisada; (2) natureza química do sítio catalítico e (3) relação evolutiva de acordo com o tipo de estrutura. Essa classificação foi obtida pela combinação de dois sistemas parcialmente sobrepostos, o sistema MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) que divide peptidases em Clans e famílias e as recomendações da nomenclatura pela Comissão de Enzimas (EC). Segundo o Comitê de Nomenclatura Enzimática (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB; www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/) as peptidases são classificadas em endopeptidases, que clivam ligações no interior da cadeia polipeptídica (EC 3.4.21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19), que atuam na extremidade da cadeia polipeptídica (BARRET, 1994); VERMELHO et al., 2008; THYS, 2004; MENDONÇA, 2008; GIONGO, 2006). A tabela 1 mostra o mecanismo de ação de proteases.

Tabela 1. Classificação de peptidases de acordo com o modo de ação.

Protease	Mode of action ^a	EC no.
Exopeptidases		
Aminopeptidases	●↓○-○-○-○---	3.4.11
Dipeptidyl peptidase	●●↓○-○-○---	3.4.14
Tripeptidyl peptidase	●●●↓○-○---	3.4.14
Carboxypeptidase	---○-○-○-○-○↓●	3.4.16–3.4.18
Serine type protease		3.4.16
Metalloprotease		3.4.17
Cysteine type protease		3.4.18
Peptidyl dipeptidase	---○-○-○-○↓●●	3.4.15
Dipeptidases	●↓●	3.4.13
Omega peptidases	*-●↓○-○---	3.4.19
	---○-○-○↓●-*	3.4.19
Endopeptidases		
	---○-○-○↓○-○-○---	3.4.21–3.4.34
Serine protease		3.4.21
Cysteine protease		3.4.22
Aspartic protease		3.4.23
Metalloprotease		3.4.24
Endopeptidases of unknown catalytic mechanism		3.4.99

Fonte: RAO et al., 1998. Os círculos abertos representam os resíduos de aminoácidos da cadeia polipeptídica. Os círculos fechados indicam a porção aminoterminal, e os asteriscos significam o bloqueio da terminação. As setas indicam os sítios de ação da enzima. Note que os círculos abertos representam os resíduos de aminoácidos da cadeia polipeptídica. Os círculos fechados indicam a porção aminoterminal, e os asteriscos significam o bloqueio da terminação. As setas indicam os sítios de ação da enzima.

2.1.2-Funções fisiológicas das proteases

As proteases participam de diversos mecanismos fisiológicos, dentre eles o processo de inflamação, catabolismo de proteínas, coagulação do sangue, crescimento de tumores e metástases, transporte e secreção de proteínas na membrana celular. São também responsáveis por um mecanismo complexo que envolve a fisiologia normal das células e as condições patológicas anormais. Isto faz com que proteases sejam alvos para desenvolvimento de agentes terapêuticos para algumas doenças como a AIDS, ou ainda serem utilizadas em indústrias alimentícias e de detergentes (THYS, 2004).

Sua importância em conduzir o metabolismo essencial e as funções regulatórias é visível em todos os organismos vivos. De maneira geral as proteases extracelulares

catalisam a hidrólise de proteínas em moléculas menores para permitir absorção das células e as proteases intracelulares possuem papel vital na regulação do metabolismo (RAO et al., 1998; MENDONÇA, 2008).

2.1.3. Obtenção e Aplicações biotecnológicas de proteases

Protease são largamente distribuídas nas diversas fontes biológicas. As plantas ocupam o topo do rank com 43,85% de proteases encontradas seguido das bactérias com 18,09 %, fungos; 15,08 %, animais; 11,15 %, algas; 7,42 % e vírus; 4,41 %. Proteases isoladas de origem biológica estão em 27 a 67% independentemente da origem seja animal, planta ou microbiana. O restante das proteases permanece sem muito conhecimento ou estudo. Cisteíno peptidases são mais abundantes em plantas ocorrendo em 34,92% delas. Os microorganismos são mais hábeis em secretar largas quantidades de serino peptidases, em torno de 13,21% e aspartico-peptidases 8,81%. Recentemente, novas proteases glutâmicas ácidas de origem microbiana foram relatadas. Serino, cisteíno e aspártico peptidases são mais comumente encontradas em animais. Em plantas as proteases são encontradas em toda extensão da planta caule, raiz, folhas, frutos, flores, látex, gomas e sementes. As proteases mais encontradas em plantas são Cisteíno e serino endopeptidases sendo, as aspártico e aminopeptidases mais raramente encontradas em plantas (GAUR; WADHWA, 2008; MAHAJAN ; BADGUJAR, 2010).

Proteases extracelulares de fungos filamentosos desempenham papel essencial na secreção de proteínas de pós-processamento (ENEYSKAYA et al., 1999), na formação de micélio aéreo (WOSTEN et al. 1996), nutricionais (ARCHER e PEBERDY,1997), adaptação no ambiente (ST. LEGER et al., 1997) e na formação de estruturas de frutificação (SIMKOVIC et al, 2008). A secreção de proteínas extracelulares é regulada por fatores ambientais (DENISON 2000, TIBBET et al. 1999) e nutricionais (PAOLETTI et al. 1998). A produção de proteínas extracelulares pode ser a resposta à indução de peptídeos específicos, mas pode também desempenhar um papel na autólise de micélio de fungos filamentosos (MCLNTYRE et al. 2000).

Proteases são extremamente importantes para o mecanismo fisiológicos de todos os seres vivos, dessa forma plantas, animais e microrganismos são fontes naturais de obtenção de proteases. Cultivo submerso em água e em estado sólido tem sido amplamente utilizado como meios de obtenção dessas proteases. (GIONGO, 2006).

Diversas aplicações são conhecidas para proteases, entre as mais conhecidas: a indústria de detergentes, a alimentícia, a farmacêutica, química, de couros, entre outras. (RAO, et al, 1998). As proteases obtidas de fontes animal, vegetal e de microrganismos são amplamente utilizadas em escala biotecnológica. Alguns exemplos podem ser vistos na tabela 2.

Tabela 2: Fontes de proteases e aplicações industriais

Fonte de obtenção	Enzima	Aplicação Industrial
Animal	Tripsina, Quimotripsina, etc	Indústria farmacêutica, de couro, processamento de alimentos, especialmente hidrólise de proteínas e síntese de peptídeos
Vegetal	Papaína, Ficina, Bromelina	Produção de extratos de leveduras, cerveja resistente ao congelamento, panificação, fármacos, amaciamento de carne.
Microrganismos (<i>Aspergillus niger</i>)	Proteases ácidas e neutras	Queijo, carnes, pescado, cereais e bebidas
Microrganismos (<i>Aspergillus oryzae</i>)	Proteases ácidas e neutras	Hidrólise protéica, processamento de carne e pescado, indústria cervejeira e panificação
Microrganismos (<i>Aspergillus melleus</i> , <i>Endothia parasítica</i> , <i>Mucor miehei</i> e <i>Mucor pusillus</i>)	Proteases alcalinas	Manufatura de queijo (coagulação de leite)
Microrganismos (<i>Bacillus licheniformis</i> e <i>Bacillus subtilis</i>)	Proteases alcalinas	Fabricação de detergentes e indústria do couro, processamento de carnes, pescados e produtos lácteos.
Microrganismos (<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus cereus</i>)	Protease neutra	Produção de bebidas e panificação

Fonte: Weiseman, 1991

2.2. O gênero *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* compreende um grupo de fungos filamentosos saprófitas de solo encontrados sobre matéria orgânica em decomposição e na rizosfera de algumas plantas. Em cultura podem ser facilmente reconhecidos pelas estruturas características de seus conídios. Além disto, caracterizam-se por utilizarem uma grande variedade de compostos como fonte de carbono e nitrogênio, serem resistentes a inibidores produzidos por outros microrganismos e tolerantes a diferentes tipos de fungicidas (KULLNING et al, 2000). Isolados de *Trichoderma* podem ser reconhecidos, normalmente, através de características macroscópicas as quais incluem crescimento rápido em cultura, rede micelial aérea hialina, septada, bastante ramificada e esparsa e produção de pústulas conidiógenas diferenciais (brancas ou verdes). Os conídios, que são produzidos abundantemente, podem ser soltos ou muito compactados em tufo

(CORABI-ADELL, 2004). Como características microscópicas o conidióforo apresenta-se bastante ramificado, normalmente de uma forma regular dendrítica, ou seja, ramificam-se em vários níveis, onde as divisões primárias originam secundárias menores, as quais, por sua vez, também podem se ramificar e assim por diante. A ramificação primária é longa, subdividida sucessivamente em vários níveis, apical e distalmente, progressivamente menores e com ramificações e fiálides divergentes em todos os níveis. As fiálides são ampuliformes a lageniformes, normalmente com constrição na base, mais ou menos espessadas no meio, e abruptamente atenuadas próximo ao ápice, num curto segmento subcilíndrico. Elas se encontram dispostas em verticilos terminais sobre as ramificações do conidióforo ou, menos freqüentemente, de forma singular ou em verticilos originando-se diretamente abaixo do septo ao longo do conidióforo e suas ramificações (RIFAI 1969; BISSET, 1991a).

A maioria dos isolados de *Trichoderma* não são encontrados associados com seus estágios sexuais, sendo considerados fungos de reprodução clonal (mitóticos) o que constitui uma barreira muito grande para melhor compreender as inter-relações dentro e entre as espécies (LIMA, 2002). Mesmo assim, o gênero *Trichoderma* apresenta forma de reprodução assexuada naqueles que são mais frequentemente isolados do solo, esses fungos também colonizam matérias lenhosas e plantas herbáceas onde as formas mais encontradas são as formas telomórficas (gênero *Hypocrea*) muito embora as espécies, incluindo aquelas de biocontrole, são de forma sexual não conhecida (HARMAN et al., 2004).

Em estudos de micologia e filogenética é atualmente utilizada a análise do DNA ribossômico a qual apresenta resultados mais confiáveis e também esclarecem várias questões, restritas pela morfologia e análises bioquímicas (BRUNS et al., 1991). Em diversos estudos taxonômicos e filogenéticos regiões específicas como ITS1, ITS2 e 5.8S são predominantes devido à alta conservação destas regiões (HARMAN et al., 2004).

2.2.1. Micoparasitismo

O micoparasitismo é, sem dúvida, o evento mais característico das espécies de *Trichoderma*. O micoparasitismo é a habilidade que essas espécies possuem de parasitar outros fungos. É um processo complexo que envolve quatro estágios distintos: (a) crescimento quimiotrópico, no qual um estímulo químico atrai o fungo antagonista; (b)

reconhecimento específico, provavelmente mediado por lectinas na superfície celular de ambos (patógeno e antagonista); (c) ataque e enrolamento de *Trichoderma* em torno da hifa hospedeira; (d) secreção de enzimas líticas que degradam a parede celular do hospedeiro (CHET; BENHAMOU; HARAN, 1998). Durante o processo de micoparasitismo, *Trichoderma* secreta enzimas degradadoras da parede celular (CWDEs) que hidrolisam-na no fungo hospedeiro liberando oligômeros (Figura 1) ativando a expressão de genes envolvidos no micoparasitismo (VINALE et al., 2008).

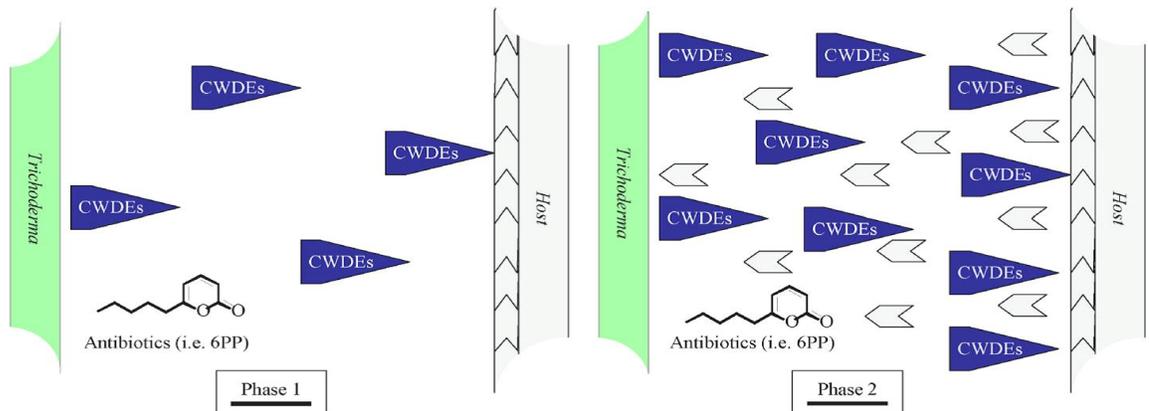


Figura 1 -Evento de pré-contato na interação de *Trichoderma*-Fungo hospedeiro. Fase 1) Produção de compostos de alta massa molecular pelo micoparasita que atinge o hospedeiro. Fase 2) Geração de produtos de baixa massa molecular que são liberados da parede celular do hospedeiro e que ativam a cascata de expressão de genes em *Trichoderma*. Fonte: Vinale et al. (2008).

No processo do micoparasitismo, as espécies de *Trichoderma* atuam na parede celular, utilizando entre outros mecanismos, a secreção de enzimas líticas, que mudam se adaptando a composição da parede celular do micro-organismo parasitado. Outras enzimas são secretadas com funções diversas, como: nutrição de plantas, competição por nutrientes e degradação da biomassa, por exemplo (VINALE et al, 2008).

A parede celular de fungos é uma estrutura que oferece resistência, determina sua forma, protege contra danos mecânicos e participa da comunicação célula-célula. Propriedades físicas e biológicas da parede celular são determinadas pela composição e arranjos dos componentes de sua estrutura (FONTAINE et al., 2000).

A parede celular é composta por lipídeos, proteínas e em alguns casos pigmentos (melanina), fosfatos, sais inorgânicos, entre outros. A sua estrutura é devido a

associação altamente coesa de alguns desses componentes por ligações covalentes, embora ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas sejam também importantes para a configuração final da estrutura. Outros componentes dessa estrutura se encontram fracamente ligados podendo ser retirados por processos de lavagem e sendo assim não são considerados componentes verdadeiros da parede celular (RUIZ-HERRERA, 1992). Fisicamente, a parede celular é constituída por microfibrilas entrelaçadas e embebidas em uma matriz de material amorfo (GARCIA-BARTINICKI, 1968)

Durante o crescimento em direção a hifa hospedeira, *Trichoderma* secreta antibióticos voláteis e enzimas degradadoras da parede celular (CWDEs) que hidrolisam a parede celular do fungo hospedeiro liberando oligômeros (Figura 1), ativando a expressão de genes envolvidos no micoparasitismo (VINALE et al., 2007). Uma vez estabelecido o contato, espécies de *Trichoderma* interagem com a hifa hospedeira através da ligação de carboidratos de sua parede celular às lectinas presentes na hifa hospedeira, enrolando-se ao longo dessa com o lançamento de estruturas em apressórios na superfície da hifa (ELAD et al., 1983a). Essas estruturas contêm altas concentrações de solutos osmóticos, como o glicerol, e servem para a penetração na hifa do hospedeiro. Estabelecido o contato, ocorre a produção de mais enzimas hidrolíticas que facilitam tanto a entrada da hifa de *Trichoderma* no lúmen do fungo parasitado quanto na assimilação do conteúdo da parede celular (Figura 3) (BENÍTEZ et al., 2004).

Polissacarídeos são os maiores constituintes da parede celular de fungos tais como -1,3-D-glucanas que também contém algumas ramificações do tipo -1,6-D-glucanas e quitinas. A quitina é um polímero com repetidas unidades de N-acetilglicosamina em ligações do tipo α -1,4. Esses polissacarídeos da parede celular dos fungos são distribuídos largamente na maioria dos diferentes gêneros (SANTOS et al 2000). Proteínas também estão presentes na parede celular, principalmente associadas com hetero ou homopolissacarídeos de açúcares (FONTAINE et al 2000).

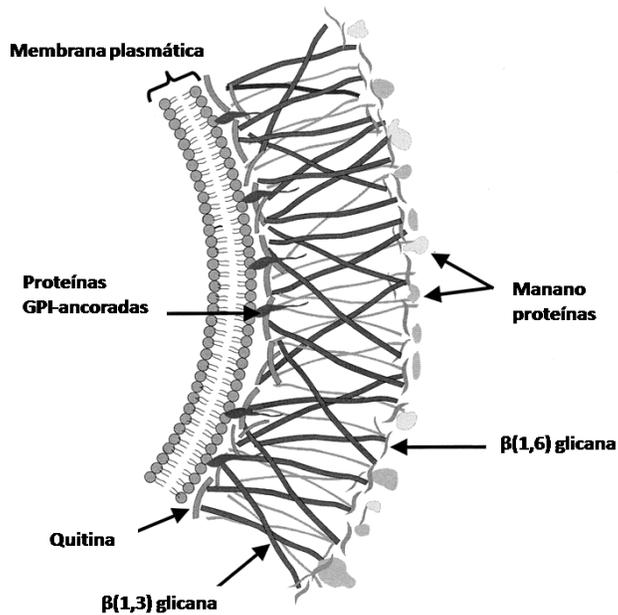


Figura 2: Estrutura da parede celular de fungos. (MONTEIRO, 2008)

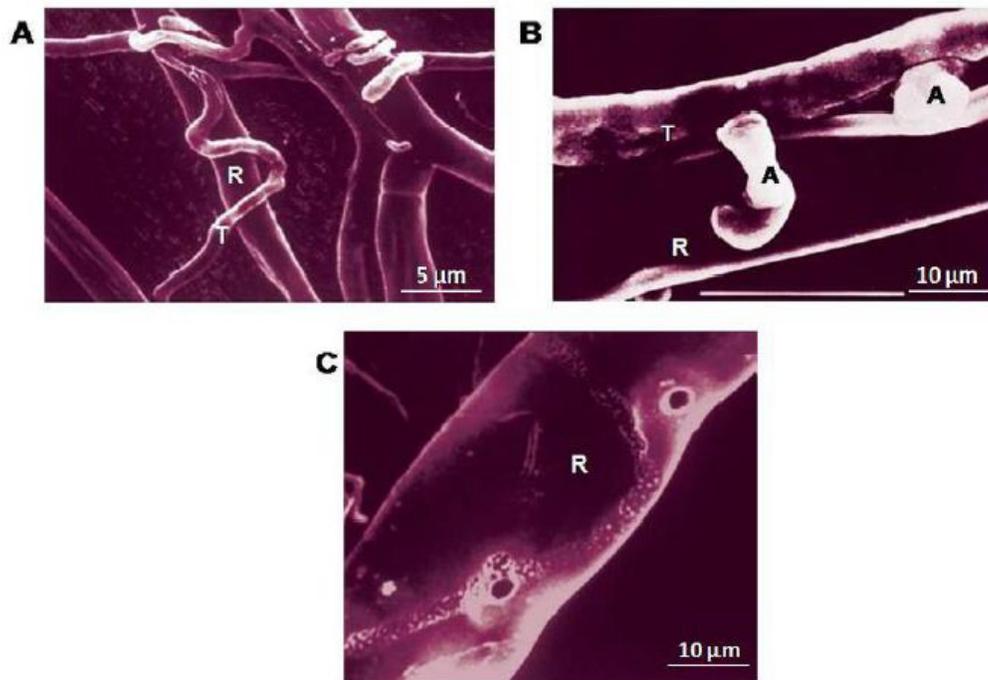


Figura 3. Micoparasitismo de *Trichoderma* spp. em *Rhizoctonia solani*. **A.** Cepa de *Trichoderma* está no processo de micoparasitismo da hifa de *R. solani*. **B.** Estruturas em apressórios de *Trichoderma* ligadas a hifa de *R. solani*. **C.** Hifa de *R. solani* após a retirada de *Trichoderma* spp., evidenciando os buracos na parede celular pela ação das CWDEs. T - *Trichoderma* spp.; R - *R. solani*; A - Estruturas do tipo apressórios (ELAD et al., 1983b; ELAD et al., 1987).

2.3. Principais enzimas envolvidas no micoparasitismo

2.3.1. Quitinases

Quitinases são divididas em -(1,4)-N-acetilglicosaminidases (NAGase), endoquitinases e exoquitinases ou quitobiosidases (VITERBO et al., 2002). Dependendo da espécie de *Trichoderma* o sistema quitinolítico (Tabela 3) pode conter de cinco a sete enzimas individuais (MARKOVICH; KONONOVA, 2003).

O isolado de *Trichoderma* mais bem caracterizado (isolado TM) é composto aparentemente por duas -(1,4)-N-acetilglicosaminidases (102 e 73 kDa) e quatro endoquitinases (52, 42 33 e 31 kDa) sendo a endoquitinase de 42kDa a de maior interesse, pois seu gene é fortemente induzido durante a interação fungo-fungo e quando *Trichoderma* é crescido na presença de micélio autoclavado de vários fitopatógenos ou com quitina coloidal (CARSOLIO et al., 1999).

Tabela 3. Resumo das enzimas quitinolíticas purificadas de *Trichoderma harzianum*, induzidas por quitina.

Enzima	Massa Molecular (Kda)	Atividade	Referência
CHIT 102	102-118	N-acetilglicosaminidase	Ulhoa & Peberdy (1991a)
CHIT 73	73	N-acetilglicosaminidase	Haran et al.(1995) Lorito et al. (1994)
CHIT 40	40	Exoquitinase	Harman et al. (1993)
CHIT 52	52	Endoquitinase	Haran et al. (1995)
CHIT 42	40-42	Endoquitinase	De La Cruz et al. (1992) Ulhoa & Peberdy (1992b) Harman et al. (1993)
CHIT 33	33-37	Endoquitinase	De La Cruz et al. (1992) Haran et al. (1995)
CHIT 31	31-33	Endoquitinase	De La Cruz et al. (1992) Haran et al. (1995)
CHIT 46	46	Endoquitinase	Lima et al. (1997)

Fonte: Monteiro (2001).

Quando crescido na presença de quitina como única fonte de carbono é secretada por *Trichoderma atroviride* uma endoquitinase de 40 kDa que, sozinha ou em conjunto com a CHIT 42, melhora a atividade no biocontrole de fitopatógenos (VITERBO et al., 2002).

Usando GFP para monitorar a expressão de dois genes *nag1* e *ech42*, que codificam, respectivamente, nagase e endoquitinase, foi possível a elucidação do papel dessas enzimas durante o micoparasitismo. Os resultados mostraram que *ech42* era expresso antes do contato físico entre os fungos e que a expressão de *nag1* só era observada após o contato entre esses. Para haver a indução da expressão de *ech42* deveria haver a participação de produtos solúveis da digestão enzimática da parede de *Rhizoctonia solani*. A expressão de *ech42* durante o período de pré-contato e ação efetiva de micoparasitismo requer a difusão de uma macromolécula de 12 a 90 kDa por *Trichoderma* e a sua ação em *R. solani* é crucial para a expressão de *ech42* (ZEILLINGER et al., 1999; KULLNING et al., 2000).

2.3.2. Glucanases

Glucanases incluem as não celulolíticas -(1,3) e -(1,6)-glucanases que possuem a habilidade em degradar as ligações -(1,3) e -(1,6)-glucanas. São classificadas de acordo com o modo de ação nas ligações glicosídicas em dois grupos: exo e endo-glucanases. As exo-glucanases atuam na cadeia de -glucana pela clivagem seqüencial dos resíduos de glicose a partir da extremidade não redutora apresentando somente glicose como produto final. As endo-glucanase atuam randomicamente ao longo da cadeia de -glucana liberando pequenos oligossacarídios (MARTIN et al., 2007).

Glucanases constituem outro grupo de enzimas-chaves envolvidas no micoparasitismo de espécies de *Trichoderma*. Glucanases parecem estar envolvidas no antagonismo de patógenos de plantas tais como *Pythium*. Estudos *in vitro* mostraram que uma glucanase de 78 kDa inibe, em sinergismo com a endoquitinase de 43 kDa, o crescimento de *Sclerotium rolfisii* (VITERBO et al., 2002).

Estudos mostram que -1,3-glucanases inibem a germinação de esporos ou o crescimento de patógenos em sinergismo com quitinases e antibióticos. Muitas -1,3 e -1,6 foram isoladas e caracterizadas (Tabela 4) e alguns genes clonados, como *bgn13.1*, *bgn16.2* e *lam1.3* de *Trichoderma harzianum*, *glu78* de *T. atroviride*, *lamA1*(que

codifica a endo-(1,3-1,6)-glucanase) e *Tv-bgn2* de *T.virens*. Regiões conservadas de exo--(1,3) glucanases foram utilizadas para construção de sondas para pesquisa em uma biblioteca genômica de *T. virens* resultando no isolamento de dois supostos genes (*Tv-bgn1* e *Tv-bgn2*) que codificam endo--(1,3) glucanases (BENÍTEZ et al., 2004; MARTIN et al., 2007).

Tabela 4. Resumo das -1,3-glucanase purificadas de *Trichoderma harzianum*.

Designação	Massa Molecular (kDA)	Tipos de -1,3-glucanase	Referências
GLUC 29	29	Exo-1,3-	Noronha & Ulhoa (2000)
GLUC 31	31	Exo-1,3-	Kitamoto <i>et al.</i> (1987)
GLUC 40	40	Exo-1,3-	Duboudieu <i>et al.</i> (1985)
GLUC 110	110	Exo-1,3-	Cohen-Kupiec <i>et al.</i> (1999)
GLUC 36	36	Endo-1,3-	Noronha & Ulhoa (2000)
GLUC 78	78	Endo -1,3-	De La Cruz <i>et al.</i> (1995)
GLUC 76	76	Endo -1,3-	Lorito <i>et al.</i> (1994)
GLUC 75	75	Exo - 1,3-	Monteiro& Ulhoa (2006)

Fonte: Monteiro (2001).

2.3.3 Proteases

Enzimas proteolíticas produzidas e secretadas por espécies de *Trichoderma* vêm recebendo muita atenção por sua habilidade potencial no biocontrole. Porém ainda assim são pouco estudadas.

Várias análises de proteases de *Trichoderma* revelaram que proteases ácidas são reguladas por pH assim, em meio suplementado com quitina, glicose ou amônio essas proteases encontravam-se presentes em pH mais baixos. Algumas fontes de nitrogênio como peptona, levedura e caseína parecem regular a expressão de proteases. As proteases alcalinas e neutras parecem ser induzidas somente por fontes de carbono não

facilmente degradáveis ou em condições de carência nutricional (VITERBO et al, 2002).

Proteases podem participar na degradação de proteínas celulares estruturais desestabilizando a integridade celular do fitopatógeno e facilitando a penetração e colonização por *Trichoderma*. Proteases também estão envolvidas na inativação de enzimas produzidas por patógenos durante o processo de infecção de plantas. Proteases produzidas por *T. virens* mostraram similaridade com serino peptidases que aumentam a resposta de defesa de plantas contra patógenos (SUÁREZ et al., 2007). Proteases de espécies de *Trichoderma* vêm sendo associadas no biocontrole de nematóides como *Meloidogyne javanica* em tomates (HOWEL, 2003).

Alguns genes foram clonados e caracterizados mostrando a relevância de proteases no biocontrole. Um gene que codifica uma família S8 serino peptidase (*prb1*) foi inicialmente clonado e caracterizado de *T. atroviride* e mais tarde de *T. virens* (*tvsp1*) e *T. hamatum* (*prb1*). Recentemente, três genes que codificam uma família A1 aspartico peptidases, *papA*, *papB* e *p6281* foram isolados de *T. harzianum* e *T. asperellum*. Tanto *papA* como *papB* foram relatadas em atividades de micoparasitismo e na colonização de raízes de plantas de *T. asperellum*, já *p6281* foi expresso por *T. harzianum* na presença de parede celular de fitopatógenos ou quitina. Um gene *pra1* que codifica uma família S1 serino peptidase com atividade nematocida foi descrito em *T. harzianum*. Uma seqüência incompleta com similaridade a metalo-endopeptidases foi descrita por ser expressa durante o micoparasitismo de *T. hamatum* (SUÁREZ et al., 2007).

Prb1 está ativa se fungos filamentosos foram cultivados em um meio contendo quitina ou paredes celulares de *R. solani* (OLMEDO-MONFIL et al. 2002). Alto nível de expressão de *pbr1* foi demonstrada em um experimento de cultura dupla com *T. atroviride* e *R. solani* não havendo contato mútuo desses fungos. Ele sugere que produz um fator difusível responsável por desencadear a síntese do gene *pbr1*. A expressão de *pbr1* é reprimida por glicose e regulada pela disponibilidade de nitrogênio (CORTÉS et al. 1998).

Um estudo com cepas mutantes de *T. virens* com super expressão de *tvsp1* mostrou que nenhuma das funções essenciais importantes para o crescimento e desenvolvimento dos fungos filamentosos são influenciados e que desempenha um papel importante no processo de controle biológico (POZO et al. 2004).

Resultados de SIMKOVIC e colaboradores, (2008) mostram que a secreção de proteases extracelulares do fungo *T. viride* não é apenas a resposta em geral como consequência de exigências nutricionais, mas também inclui um processo de reconhecimento molecular desconhecido, que provoca uma secreção específica de proteínas de acordo com o reconhecimento realizado (SIMKOVIC et al, 2008).

2.4. Aspectos gerais do fitopatógeno *Rhizoctonia solani*

O gênero *Rhizoctonia* foi descrito pela primeira vez pelo micologista francês De Candolle, em 1815, como sendo um fungo não esporulante que ataca, preferencialmente, raízes e que produz filamentos de hifas a partir de escleródios (SNEH et al., 1991). O qual é classificado como fungo mitospórico, Hyphomycetes, forma ordem Agonomycetales por não produzir esporos em sua fase assexuada. Outra classificação considerando Agonomycetes como forma-classe e Mycelia Sterilia como forma-ordem (PEREIRA, 1997).

O micélio é caracterizado pela ramificação em ângulo reto com septação imediatamente e após o ramo, constricção na base da ramificação e septo doliporo. A fase sexuada deste fungo é *Thanatephorus cucumeris*, classificado no reino Fungi, filo Basidiomycota, ordem Ceratobasidiales, Ceratobasidiaceae (ANDERSON, 1982; ADAMS, 1988).

Segundo Botelho et al. (2001), *R. solani* é um fungo cosmopolita, com vasto número de hospedeiros, e causa importantes doenças na maioria das plantas cultivadas em todo o mundo. É uma espécie complexa, com muitos biótipos que diferem quanto à patogenicidade, aos hospedeiros, à distribuição na natureza e à aparência em meio de cultura. Relatos sobre isolados de *Rhizoctonia*, fitopatogênicos ou saprofíticos, não descritos em nível específico, são comuns na literatura devido às dificuldades na identificação impostas por limitações morfológicas e taxonômicas do gênero, tais como: (i) Ausência de esporos assexuais, (ii) Instabilidade na morfologia de culturas e escleródios, em função de variações nas condições de cultivo (PARMETER; WHITNEY, 1970), (iii) Ampla variabilidade morfológica, sendo que há espécies constituídas por diferentes grupos de isolados com afinidade para efetuar anastomose de hifas entre si (OGOSHI, 1987), (iv) Necessidade de métodos específicos para se induzir estruturas basidiais *in vitro* (CARLING; SUMMER, 1992), (v) Desconhecimentos dos teleomorfos para algumas espécies anamórficas

O fungo sobrevive saprofiticamente no solo, infectando plantas nativas, ou em estágio de dormência, como micélio e escleródios. Esses propágulos são detectados no solo com relativa facilidade, porém de difícil quantificação. Geralmente, encontram-se nas camadas superficiais do perfil do solo, principalmente nos primeiros 10 cm, devido à dependência de oxigênio (CARDOSO, 1994). Os sintomas apresentados pela espécie de *R. solani* variam extensamente e são confundidos facilmente com os sintomas das doenças produzidas por outros patógenos. Atuam em regiões de temperaturas elevadas e chuvas frequentes acompanhadas de alta umidade (95%), que o tornam de primordial importância dentre os fatores limitantes ao cultivo de várias culturas, cuja maioria são plantas cultivadas, como beterraba, pepino, cenoura, berinjela, melão, tomate, melancia, repolho, alface, feijão, soja, figo, algodão, feijão-caupi e arroz, além de plantas nativas. Este fungo representa um grupo economicamente importante e geneticamente diverso de patógenos de solo que ocorrem em espécies de plantas em todo o mundo (CASTRO, 2007).

3. JUSTIFICATIVA

As principais enzimas envolvidas no micoparasitismo como glucanases e quitinases já são muito bem caracterizadas nos aspectos bioquímicos e moleculares. Embora proteases de espécies de *Trichoderma* vêm sendo estudadas e muitas até com suas sequências depositadas em bancos de dados genômicos, pouco se sabe sobre o perfil de proteases entre os isolados. É importante o conhecimento do perfil de proteases secretadas e ainda, se esse perfil é diferencial, pois, mostra a atuação de proteases entre as espécies de *Trichoderma*. Assim a avaliação bioquímica de proteases secretadas de diferentes espécies de *Trichoderma* quando em contato com a parede celular de fitopatógenos bem como a avaliação da expressão das diferentes classes de proteases constituem uma nova abordagem no estudo.

4. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

4.1. Objetivo geral

Estudar o perfil de secreção de proteases extracelulares e a expressão de alguns de seus genes de isolados de *Trichoderma* spp. na presença de parede celular tratada de *Rhizoctonia solani*.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial antagônico dos isolados de *Trichoderma* contra *R. solani*.
- Obtenção de extratos de proteases (EP) dos isolados de *Trichoderma* a partir de cromatografia de afinidade.
- Avaliação da classe das proteases nos EP dos isolados de *Trichoderma* com a utilização de inibidores.
- Avaliação da especificidade pelo substrato nos EP dos isolados de *Trichoderma*.
- Avaliação do efeito de íons na atividade de proteases nos EP dos isolados de *Trichoderma*.
- Avaliação do pH e temperatura ótimos nos EP dos isolados de *Trichoderma*.
- Análise dos genes expressos de proteases (Aspartic, aspartato protease, trypsin-like e serino endopeptidase).
- Análise da expressão dos genes de quitinases e glucanases para correlação com a expressão de proteases.
- Avaliar a correlação entre os genes expressos.

5. METODOLOGIA

5.1. Manutenção dos isolados

Os isolados *Trichoderma virens* (301/01), *Trichoderma harzianum* (ALL 42), *Trichoderma harzianum* (494/02) e *Trichoderma asperellum* (T00) da coleção do Laboratório de Enzimologia (UFG/ICB), foram mantidos com repiques periódicos em meio MYG (0,5% de extrato de malte, 0,25% de extrato de levedura, 1% de glicose e 2% de ágar) e estocados a 4°C. Esses isolados de *Trichoderma* tiveram suas espécies identificadas com base na região ITS.

O fitopatógeno *Rhizoctonia solani* obtido da EMBRAPA-ARROZ/FEIJÃO foi mantido com repiques periódicos em meio BDA (200 mL de caldo de batata, 20g de glicose e 2% de Agar em 1L de água destilada) e estocados a 4°C.

5.2. Avaliação da capacidade antagonista de *Trichoderma*.

A capacidade de antagonismo dos isolados de *Trichoderma* em relação ao fitopatógeno *R. solani* foi avaliada. Para isso discos de 5mm das culturas foram tomados da margem de crescimento ativo do antagonista *Trichoderma virens* (301/01), *Trichoderma harzianum* (ALL 42), *Trichoderma harzianum* (494/02) e *Trichoderma asperellum* (T00) e do fitopatógeno (*R. solani*), crescidos em meio BDA e submetidos ao teste de pareamento em placa contendo meio seletivo para *R. solani* (KO; HORA, 1971).

5.3. Produção e tratamento da parede celular de *Rhizoctonia solani*.

Cerca de 10 a 20 discos de ágar (BDA) contendo micélio dos fitopatógenos foram inoculados separadamente em frascos de 1 L contendo 500 mL de meio MYG líquido (0,5% de extrato de malte; 0,25% de extrato de levedura e 1% de glicose). Estes frascos foram incubados à temperatura de 28°C sob agitação constante de 180 rpm em agitador rotatório por 7 dias. Após a incubação, o meio foi filtrado à vácuo em papel filtro Whatman n.01. O micélio foi recolhido e tratado com a adição de uma solução de NaOH 3M.L⁻¹ e deixado em repouso a 4° C por 18h, após esse tempo o micélio foi lavado exaustivamente em água quente e a cada lavagem a quantidade de proteína total foi determinada pelo método de Bradford (1976). As lavagens seguiram até que o

conteúdo de proteínas fosse negativo. Logo em seguida o micélio foi liofilizado e posteriormente triturado a pó. O material dessa maneira foi utilizado como fonte indutora de proteases.

5.4. Cinética de Produção de proteases extracelulares de *Trichoderma*.

5.4.1. Obtenção dos micélios

Esporos (1×10^7 mL⁻¹) dos isolados de *Trichoderma* foram inoculados em frascos de 1L contendo 250 mL de meio TLE {CaCl₂ 0,1 g L⁻¹, KH₂PO₄ 7,0 g L⁻¹, K₂HPO₄ 2,0 g L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 0,1 g L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,1 g L⁻¹, Bactopeptona g L⁻¹ e 0,1 mL de solução elementos traços} contendo 2% glicose), Os frascos foram incubados em agitador rotatório à 28°C e velocidade de 180 rpm. Após 48 horas de incubação, o micélio foi então lavado exaustivamente em solução salina 0,9% para eliminar a glicose do micélio.

5.4.2. Cinética da produção das proteases

Os micélios dos isolados de *Trichoderma* foram adicionados cada um em frascos erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio mínimo (CaCl₂ 0,1 g L⁻¹, KH₂PO₄ 7,0 g L⁻¹, K₂HPO₄ 2,0 g L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 0,1 g L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,1 g L⁻¹, e 0,1 mL de solução elementos traços) contendo 0,5% de parede celular de *R solani*. Os frascos foram incubados em agitador rotatório à 28°C e velocidade de 180 rpm. Uma cinética de produção foi feita nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas de incubação na presença de PCRS. Outra cinética nos mesmos tempos de indução foi realizada com a diferença de que os micélios cresceram apenas na presença de 1% de glicose 1% como fonte de carbono. Esse procedimento trata-se do controle. Após cada tempo de incubação, o meio foi centrifugado e o sobrenadante recolhido, dialisados e concentrado por liofilização e armazenados a -20° C para ensaios de proteases. Os micélios foram recolhidos e armazenados a -80° C para as análises de RT-PCR.

5.5. Determinação de proteínas totais

Concentração de proteínas totais foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando-se albumina sérica bovina (Sigma) como padrão. Amostras de 100 μ L do sobrenadante da cultura foram adicionados a 1mL da solução de Bradford. Após incubação por 15 minutos as amostras foram lidas em espectrofotômetro em absorvância de 595nm.

5.6. Determinação da atividade de proteases

O substrato azocaseína (0,25%) foi preparado pela dissolução da azocaseína em tampão Tris-HCl 50 mM, com o pH 7,0 . A reação foi iniciada pela adição de 200 μ L de extrato bruto e 1mL de azocaseína e incubada por 1 hora a 37° C. A reação foi finalizada com a adição de 1 mL ácido tricloacético (TCA) 10%, centrifugada a 13000xg por 10 minutos. Retirou-se 500 μ L do sobrenadante e adicionou-se 500 μ L de NaOH 1M leu-se a 450nm. Uma unidade de enzimática é definida como a quantidade de enzima requerida para aumentar em 1.0 a absorvância em condições padrões do ensaio. O branco foi preparado do mesmo modo com exceção que no lugar da amostra houve a substituição por água destilada.

5.7. Cromatografia de afinidade com Bacitracina

Para obtenção do extrato de proteases (EP) no meio de cultura dos isolados foi utilizada uma cromatografia de afinidade com bacitracina de acordo com Van Noort et al.,(1991). O extrato bruto foi dialisado, concentrado por liofilização e o pH ajustado para 5,0. Em uma coluna de Bacitracina-Sepharose (GE Healthcare) pré-equilibrada com tampão A (acetato de sódio 50 mM em pH 5,0) com um fluxo de 100 μ L/min foi aplicada a amostra no volume de 1 mL (contendo 300 μ g de proteína/mL). A coluna foi lavada com 50 mL de tampão A e as proteínas foram eluídas com tampão B (tris-HCl 200mM pH 7,8 contendo NaCl 1M, 25% (v/v) de isopropanol). As frações foram coletadas em volume de 1,5 mL. Em seguida lidas em espectrofotômetro a 280nm e atividade de proteases determinada com azocaseína como descrito no item 5.6.

5.8. Avaliação das classes de proteases nos extrato de proteases (EP) dos isolados de *Trichoderma*.

Para avaliar o perfil das classes de proteases no EP dos isolados, as amostras obtidas da coluna de bacitracina foram incubadas com os inibidores de cisteíno, aspártico e metalo-protases, EDTA e PMSF. Esses inibidores foram solubilizados em concentrações de 2mM e pH 7,0. As amostras (75 μ L) foram incubadas com os inibidores (25 μ L) por 1 hora a 37° C. A atividade proteolítica residual foi determinada usando azocaseína como descrito no item 5.6, porém com incubação de 2 horas.

5.9. Avaliação da Atividade enzimática dos extratos de proteases (EP) dos isolados de *Trichoderma* em Albumina e Azocaseína.

Os EPs dos isolados foram incubados em azocaseína e albumina. Os substratos foram dissolvidos em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 na concentração de 10mg/mL. Para azocaseína a leitura em espectrofotômetro foi realizada a 450nm e da albumina em espectrofotômetro a 280nm.

5.10. pH e temperatura ótimos dos extratos de proteases (EP) dos isolados de *Trichoderma*.

Para avaliar o efeito do pH na atividade das proteases nos EPs dos isolados de *Trichoderma* foram utilizados tampões que variaram em: Acetato-Tris (pH 4.0 e 5.0), Mes (pH 6.0 e 7.0), e Tris-HCl (pH 8.0 e 9.0) todos na concentração de 100 mmol.L⁻¹ já acrescidos do substrato azocaseína na concentração de 0,25%. Para isso o ensaio desenvolveu da seguinte forma: 20 μ L do EP foi incubado com 40 μ L de azocaseína com o tampão a ser testado. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C. Para o ensaio do efeito da temperatura na atividade das proteases nos EPs dos isolados de *Trichoderma* foram utilizadas as temperaturas de 30, 35, 40, 45, 55 e 60°C. A atividade de proteases foi determinada como descrito no item 5.6.

5.11. Efeito de íons na atividade enzimática nos extratos de proteases (EP) dos isolados de *Trichoderma*.

Foram utilizados os sais CaCl₂, tungstato de sodio, tartarato de sodio, KH₂PO₄, KCl, MgCl₂, MnCl₂, FeCl₃ e CuCl₂ na concentração 12mM para avaliar o efeito de íons

na atividade das proteases nos EPs dos isolados de *Trichoderma*. Para isso 50µL dos EPs dos isolados de *Trichoderma* foram incubados com 10 µL do sal a ser testado sendo a concentração final de sal no meio reacional de 2mM. Essa mistura foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e a atividade proteolítica residual determinada usando azocaseína como descrito no item 5.6, porém com incubação de 2 horas.

5.12. Efeito de detergentes na atividade enzimática nos extratos de proteases (EP) dos isolados de *Trichoderma*.

O efeito de detergentes na atividade de proteases foi testado. Para isso 10 µL de detergente na concentração de 10% foi adicionado a 200 µL de EP dos isolados de *Trichoderma* e incubados por 10 minutos á temperatura ambiente. Os detergentes testados nesse ensaio foram o Dodecil sulfato de sódio (SDS) e Triton X-100 nas concentrações finais do meio reacional de 0,5%. A atividade proteolítica residual foi determinada usando azocaseína como descrito no item 5.6, porém com incubação de 2 horas.

5.13. Análise do perfil proteico dos EP dos isolados de *Trichoderma* por SDS-PAGE.

Para confecção da cromatografia SDS-PAGE, amostras dos EP, foi utilizado o sistema de eletroforese MiniGel (Sigma) em gel de poliacrilamida 12% (p/v) em condições desnaturantes conforme descrito por LAEMMLI (1970). Para isso, amostras dos EP de cada um dos isolados foram liofilizados e ressupensos em tampão de amostra 1X [50 µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 6,8, 1,0 µl β-mercaptoetanol, 100 µl de SDS 10% (p/v), 100 µl de glicerol, traços de azul de bromofenol e água destilada suficiente para 1,0 ml], fervidas por 5 minutos e aplicadas no gel em uma concentração final de 30 µg de proteína. A eletroforese foi desenvolvida utilizando-se uma voltagem inicial de 80 V, posteriormente aumentada para 100 V. Foi utilizado um marcador molecular de proteínas contendo (Miosina de músculo de coelho – 200kD; β – Galactosidade de *E. coli* – 116kD; Fosforilase b de músculo de coelho – 97kD; Albumina bovina – 66kD; Desidrogenase Glutamica bovina – 55kD; Ovoalbumina – 45kD; Gliceraldeido 3 Fosfato Desidrogenase de músculo de coelho – 36kD; Anidrase Carbonica bovina –

29kD; Tripsinogenio de pâncreas bovino – 24kD; Tripsina – 20kD; α – lactoalbumina bovina – 14,2kD; Aprotinina bovina – 6,5kD).

Os géis foram corados com pastilhas PhastGel™ Blue R (GE Healthcare) foram diluídas em 200 ml de uma solução de metanol 60% (v/v). A solução foi filtrada e foram adicionados 200 ml de ácido acético 20% (v/v). Os géis ficaram em agitação durante 14 horas na solução de coloração. Após esse período, a solução foi retirada e os géis foram descorados, com agitação, em solução descorante (ácido acético/metanol/água 10:10:80, v/v).

5.14. Zimograma dos EPs dos isolados de *Trichoderma*

A atividade proteolítica foi detectada em gel de poliacrilamida a 12% (m/v) sob condições não desnaturantes contendo 0,5% (m/v) de gelatina como descrito por LAEMMLI (1970) com algumas modificações. Aliquotas dos EP dos isolados de *Trichoderma* contendo 30 μ g de proteína foram liofilizadas e as amostras ressuspensas em 40 μ l de tampão não desnaturante 1X (50 μ l de tampão Tris-HCl 50 mM pH 6,8, 100 μ l de glicerol, traços de azul de bromofenol e água destilada suficiente para 1,0 ml). A eletroforese foi desenvolvida utilizando-se uma voltagem inicial de 80 V, posteriormente aumentada para 100 V procedimento que durou em torno de 2 horas. Após esse tempo, a eletroforese foi prolongada por mais 3 horas. Após a eletroforese, o gel foi lavado com água destilada e incubado por 30 minutos em tampão Tris-HCl 100mM pH 8,0 contendo 2,5% de tritonX-100. Após incubação o gel foi lavado com água destilada e novamente incubado com tampão Tris-HCl 100mM pH 8,0 contendo 2,5% de tritonX-100 por mais 30 minutos e em seguida lavado com água destilada. Os géis foram corados com pastilhas PhastGel™ Blue R (GE Healthcare) foram diluídas em 200 ml de uma solução de metanol 60% (v/v). A solução foi filtrada e foram adicionados 200 ml de ácido acético 20% (v/v). Os géis ficaram em agitação durante 14 horas na solução de coloração. Logo após, a solução foi retirada e os géis descorados, com agitação, em solução descorante (ácido acético/metanol/água 10:10:80, v/v).

5.15. Extração de RNA

Os micélios da cinética de produção foram congelados em nitrogênio líquido e macerados usando gral e pistilo até obtenção de um pó fino. Cerca de 100mg desse pó

foram ressuspensos em 1 mL de Trizol (Invitrogen), homogeneizados em vortex e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio, agitado por 15 segundos e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Logo depois a amostra foi centrifugada à 12000rpm por 15 minutos à 4°C. Depois de centrifugada a fase aquosa incolor superior foi transferida para um tubo contendo 0,5mL de isopropanol. A amostra foi agitada e incubada à temperatura ambiente por 15 minutos, em seguida seguiu-se a centrifugação à 12000rpm por 10 minutos. O sobrenadante, então foi removido e lavado com 1mL de etanol a 75%, centrifugado à 7500rpm por 5 minutos à 4°C. Em seguida o sobrenadante foi seco à temperatura ambiente por 10 minutos e ressuspensos em água RNase free e estocado à -80°C. A quantificação foi feita em espectrofotômetro pela relação das leituras à 260/280nm. Verificou-se a integridade do RNA obtido através de confecção de um gel de agarose. O RNA obtido foi então utilizado para síntese do cDNA

5.16. Síntese de cDNA

O RNA total extraído foi tratado com DNase I para a posterior síntese de cDNA, utilizando metodologia de RT-PCR (Invitrogen – SuperScript III). Cada reação (10 μ l) continha 1 μ l de tampão 10X, 1 μ l de DNase, 8 μ l de amostra de RNA com no máximo 5 μ g de quantificação (quando necessário o volume para 10 μ l foi completado com água mili Q RNase free), deixou-se 15 minutos em temperatura ambiente, em seguida foi adicionado 1 μ l de solução de parada e deixou-se em 10 minutos a 70°C afim de desnaturar a DNase I, após o ensaio seguiu-se para a síntese de cDNA.

Cada reação (20 μ l) continha 4 μ l de Mix 5X Reaction, 2 μ l de Máxima Enzyme Mix, 5 μ g de RNA e qsp de água mili Q. Misturou-se suavemente e centrifugou-se, em seguida a reação foi incubada por 10 minutos a 25°C, seguida por 30 minutos a 60°C, depois 5 minutos a 85°C e por último 20 minutos a 4°C. Em seguida foram adicionados 60 μ l de água mili Q. O cDNA sintetizado foi utilizado para estudos de expressão utilizando-se PCR quantitativo em tempo real.

5.17. Análise de expressão por qRT-PCR.

O RNA total extraído do micélio foi tratado com DNase I. Com RNA total (5 μ g) de cada amostra foi feita transcrição reversa em cDNA na presença de oligo(dT),

em um volume final de reação de 20 μ L usando o kit Revertaid First Strand cDNA Synthesis (Fermentas). O cDNA sintetizado foi diluído em 60 μ L de água e usado como molde para as reações de PCR em tempo real. As reações foram feitas no iQ5 real-time PCR system (Bio-Rad). Cada reação (20 μ L) continha 10 μ L de MAXIMA SYBR-green PCR Master mix (Applied Biosystems) e o ABI Prism 7500 Fast-Real Time PCR (Applied Biosystems) para execução das reações, primers iniciadores 5' e 3' (500nM de cada), cDNA como molde e água livre de nuclease. As condições de ciclagem foram: 10 minutos a 95°C (1 ciclo), 15 segundos a 95 °C seguido por 1 minuto a 60°C (40ciclos). Foi feita também a curva de melting nas seguintes condições: 1 minuto a 95°C , seguida por 30 segundos a 55°C e uma rampa final de 95°C com coleta contínua de dados. O procedimento foi realizado de acordo com metodologia descrita em Wen *et al.* (2005). O gene da α -tubulina (HS574101) foi utilizado como controle interno para comparação do nível de expressão nos diferentes tratamentos e normalizador. Os “primers” foram desenhados baseados nas seqüências dos genes codificadores depositadas na base de dados do GenBank e utilizando o programa PRIMER3Plus(<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Os primers testados para os isolados são do banco de dados de cDNA do isolado de *Trichoderma harzianum* (ALL 42) da biblioteca do laboratório de enzimologia/UFG e são: serina endopeptidase, aspartic, aspartato protease, tripsin-like, nagase, β 1,3 glucanase e quitinase 42 KD. Para cada isolado crescido em parede celular de *R. solani* havia um controle para comparação sendo esse controle o meio contendo 1% de glicose glicose como fonte de carbono. A expressão dos genes foi testada em ambos para posterior comparação.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Teste de pareamento

Foi avaliada a capacidade antagonista de *T. harzianum*, (494/02 e ALL 42) *T. asperellum* (T00) e *T. virens* (301/01) contra *R. solani*, em placa de petri. A capacidade de antagonismo em fitopatógenos é uma condição essencial para que isolados de *Trichoderma* sejam agentes efetivos no biocontrole (LIMA, 2002). Os resultados mostraram que houve um crescimento de todos os isolados em direção a hifa do fitopatógeno, havendo um contato entre elas após 48 horas de crescimento. Após este tempo nota-se que ocorre um crescimento de *Trichoderma* sobre a hifa do fitopatógeno testado, e com 72 a 96 horas foi observada a presença de esporos, caracterizando uma colonização da hifa hospedeira (Figura 4). Vários estudos relatam o sucesso de espécies de *Trichoderma* no biocontrole onde o mecanismo deste está relacionado ao micoparasitismo e/ou antibióticos ou um sinergismo desses (HOWELL, 2003). A importância de antibióticos no biocontrole por essas espécies foi demonstrada em vários estudos mostrando que há um sinergismo de antibióticos não voláteis e enzimas hidrolíticas contribuindo significativamente para o antagonismo (LORITO et al., 1993; SCHIRMBOCK et al., 1994).

O teste de confronto *in vitro* pode ser acoplado com análises de enzimas extracelulares que possuem papel importante na inativação de patógenos de plantas por espécies de *Trichoderma* (LARRALDE-CORONA et al., 2008). Observa-se que no confronto entre *T. asperellum* e *R. solani* (Figura 4 C e D) e entre *T. virens* e *R. solani* (Figura 4 A e B), estes parecem ser mais efetivos quanto a rapidez no controle do fitopatógeno, já que o tempo gasto para colonização da hifa hospedeira foi de no máximo 96h. Quando se observa o confronto entre *T. harzianum* 494/02 e ALL42 (Figura 4 E, F, G e H), foram mais lentos no antagonismo em placa em relação às outras espécies testadas, levando até 144h para colonização da hifa hospedeira, o que pode demonstrar diferenças entre eles no mecanismo biológico do micoparasitismo em relação a *R. solani*, sendo que o isolado 494/02 foi claramente menos efetivo quanto ao tempo demandado para a colonização.

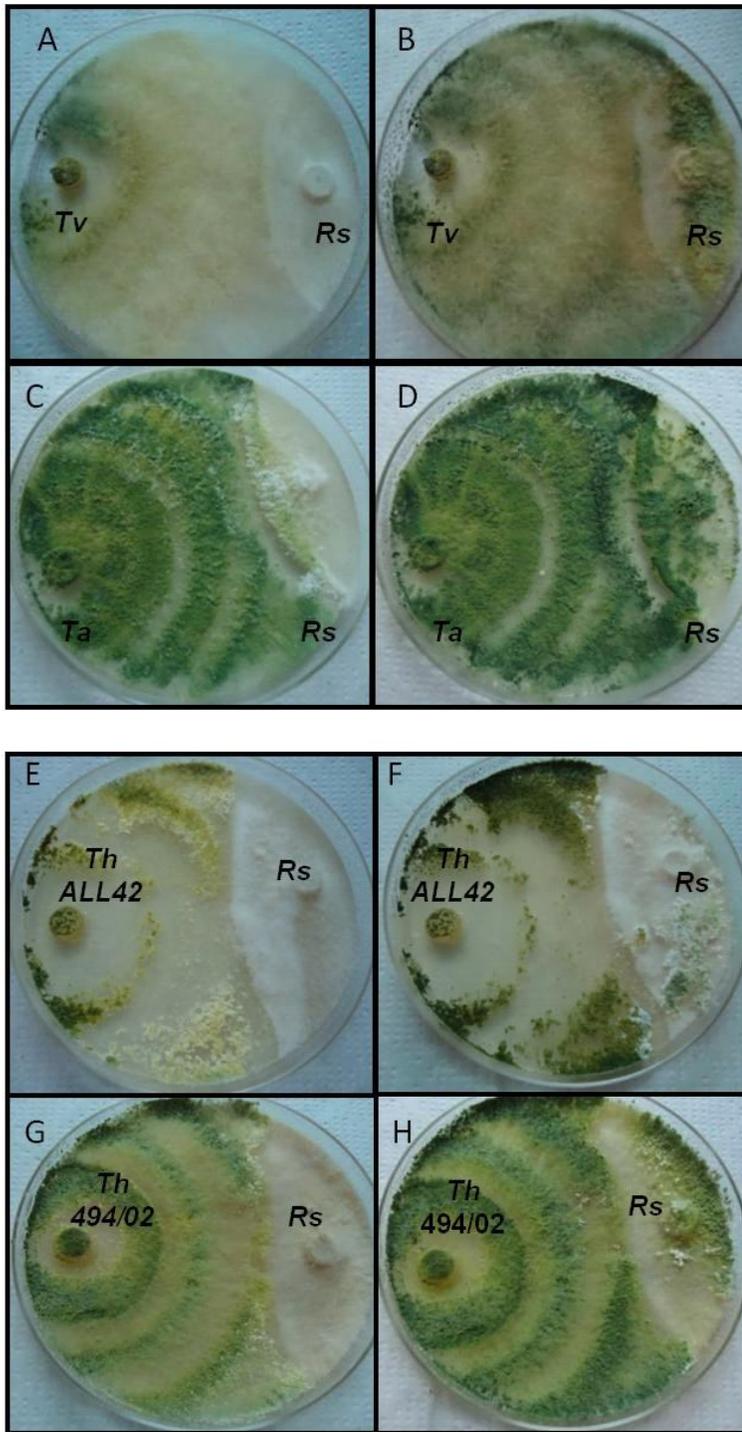


Figura 4 -Teste de pareamento entre os isolados de *Trichoderma* e o fitopatógeno *R. solani*. **A)** Pareamento entre *T. virens* e *R. solani* 96 h; **B)** *T. virens* e *R. solani* 144 h; **C)** Pareamento entre *T. asperellum* T00 e *R. solani* 96 h. **D)** Pareamento entre *T. asperellum* T00 e *R. solani* 144 h; **E)** Pareamento entre *T. harzianum* ALL 42 e *R. solani* 96 h; **F)** Pareamento entre *T. harzianum* ALL 42 e *R. solani* 144 h. **G)** Pareamento entre *T. harzianum* 494/02 e *R. solani* 96 h; **H)** Pareamento entre *T. harzianum* 494/02 e *R. solani* 144 h

A capacidade antagônica de *Trichoderma harzianum* em placa já foi relatada contra vários fungos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium sp.* (MONTEIRO et al., 2010), *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* (VITERBO et al., 2001) e *Bipolaris oryzae* (ABDEL-FATAH et al., 2007). Outra observação feita por MONTEIRO e colaboradores (2010) é que, durante a interação micoparasítica de *T. harzianum* ALL42 com *Fusarium sp.*, não houve enrolamento nas hifas do hospedeiro, apenas um contato, diferentemente do que foi observado da interação de *T. harzianum* ALL 42 com *R. solani* e *M. phaseolina*.

Dados recentes demonstraram que a interação entre um micoparasita e seu hospedeiro é muito mais complexa do que se imagina, pois também envolvem mecanismos, não elucidados, de sinalização celular com participação de proteínas G (REITHNER et al., 2005; ZEILINGER et al., 2005), proteínas quinases (REITHNER et al., 2007) e de moléculas sinalizadoras tais como AMP cíclico (OMERO et al., 1999).

6.2. Atividade específica de proteases nos diferentes tempos de indução

Os sobrenadantes das cinéticas de induções, conforme descrito em metodologia, foram concentrados por ultrafiltração e a quantidade de proteínas totais e a atividade de proteases foram determinadas no pH 7,0.

Observa-se que a atividade específica de proteases de *Trichoderma asperellum* (T00) foi maior em relação aos outros isolados (Figura 5). Nota-se que a atividade de protease desse isolado foi maior no início e no último dia da indução (6 e 48 horas respectivamente). O isolado *T. virens* (301/01) também apresentou atividade de proteases entre 12 e 24 horas. Com relação às duas espécies de *Trichoderma harzianum* (ALL42 e 494/02) apresentaram níveis muito baixos em todos os tempos. Esses resultados podem ser relacionados com a elevada capacidade de micoparasitismo das duas espécies que apresentaram efetiva capacidade micoparasita em 96 horas (Figura 4 A e C) onde se observa um avanço efetivo em direção ao micoparasita.

Embora Mischke tenha relatado que a atividade específica de proteases produzidas por cepas de *Trichoderma* não pareça se correlacionar com a sua capacidade de controle biológico conhecido, outros estudos indicam o oposto (FLORES et al., 1997). Sistemas de transformação foram desenvolvidos para aumentar o número de cópias do gene PRB1, codificante de uma serino protease, de *T. atroviridae* envolvido na

expressão de proteases, este exibiu um maior controle de *R solani* sugerindo que esse gene e suas proteases estão relacionados ao micoparasitismo (FLORES et al, 1997).

A superexpressão de TVSP1, codificante de uma serino protease, em *T virens* também resultou em uma atividade aumentada no biocontrole contra *R solani*. Os resultados destes estudos sugerem que a superexpressão de genes de codificação de protease é uma ferramenta poderosa para a melhoria da estirpe (KREDICS et al, 2005). No entanto, Flores e colaboradores (1997) relataram que os mutantes com níveis extremamente elevados de proteases em seu estudo não foram os melhores agentes de biocontrole em todos os casos.

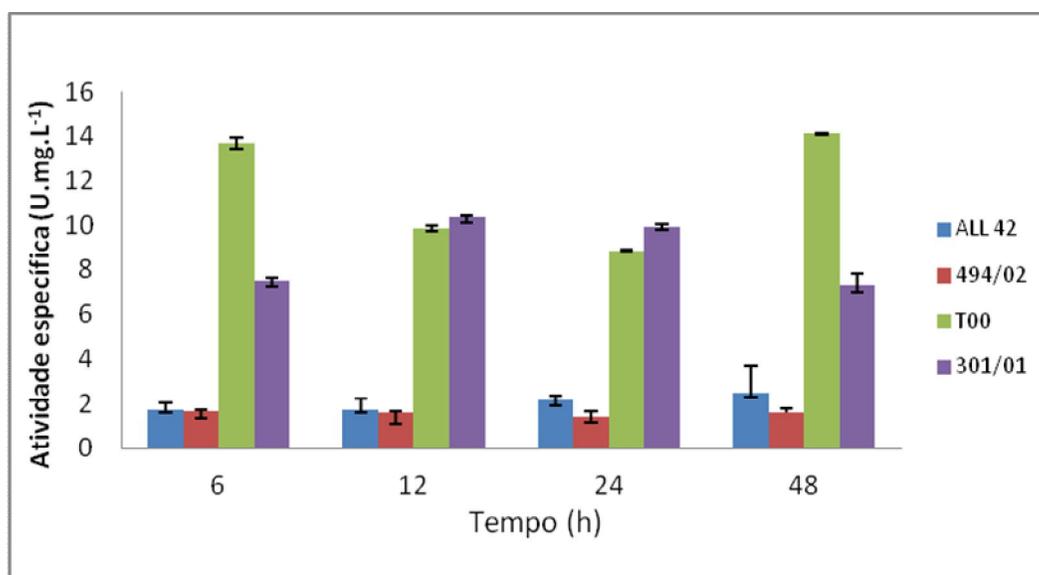


Figura 5: Atividade específica dos extratos brutos de proteases em azocaseína frente à PCRS com os tempos de induções de 6, 12, 24 e 48 horas

6.3. Cromatografia de afinidade

Para obtenção do extrato de proteases (EP), foi realizada uma cromatografia de afinidade com bacitracina de acordo com Van Noort et al.,(1991). A cromatografia foi realizada nos sobrenadantes do tempo de 48 horas de indução. Esses sobrenadantes foram dialisados e concentrados por liofilização e aplicados em uma coluna de afinidade com bacitracina. A eluição das proteases ligadas à coluna foi realizada em dois diferentes pHs, 5,0 e 8,0 para avaliar o perfil das proteases (Figura 6 A,B,C e D).

A Bacitracina atua como um inibidor de todas as classes de protease, ou seja, atua inibindo pepsina (uma aspártico protease), papaína (uma cisteíno proease),

subtilisina (serino protease) e leucinaminopeptidase (uma metaloprotease). Embora a natureza da ligação de proteases com a bacitracina não seja bem compreendida, interações eletrostáticas e hidrofóbicas e em alguns casos íons metálicos podem possuir algum papel na interação entre o inibidor e proteases (VAN NOORT et al.,1991).

Após observar os resultados decidiu-se por reunir as frações das colunas eluídas em pH 5.0 e pH 8.0 sendo aquelas que apresentaram atividade de protease (U) superior a 0,5 U/mg de proteases. Esse extrato de proteases (EP) foi utilizado para a avaliação do efeito de inibidores, íons, detergentes, pH, temperatura, substrato e realização de zimograma e SDS-PAGE .

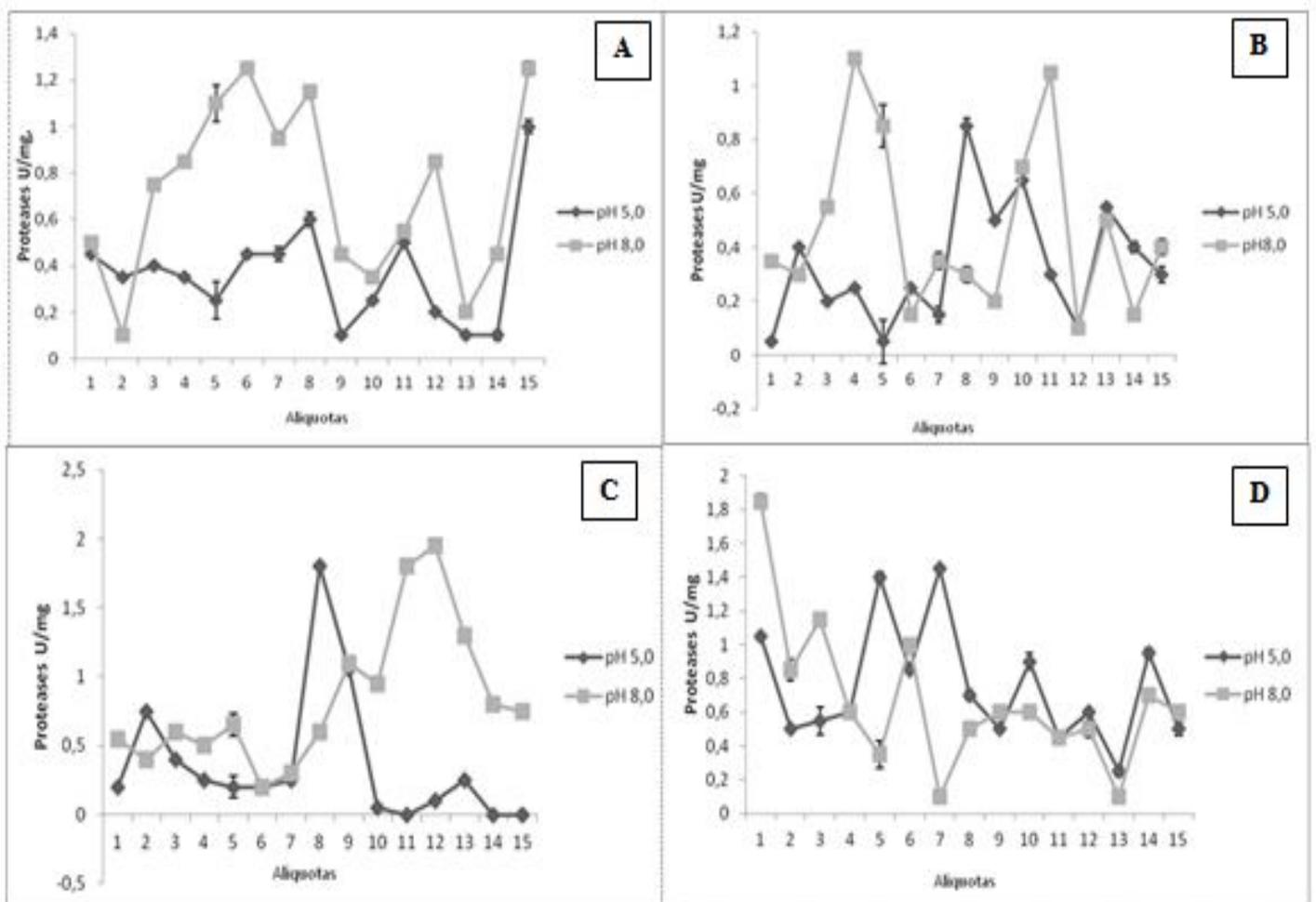


Figura 6: Cromatografia de afinidade em coluna com bacitracina em pH 5,0 e 8,0 nos isolados de *Trichoderma*. (A) Cromatografia de afinidade para *T. harzianum* ALL 42 (B) Cromatografia de afinidade para *T. harzianum* 494/02, (C) Cromatografia de afinidade para *T. asperellum* T00. (D) Cromatografia de afinidade para *T. virens* 301/01.

Para avaliar a pureza do extrato de proteases (EP) dos isolados bem como o desenvolvimento da coluna de bacitracina, foi determinada a atividade de glucanases e quitinases. Em todos os extratos de proteases dos isolados utilizados nesse estudo apresentaram resultados negativos para essas enzimas.

6.4. Avaliação das classes de proteases nos extrato de proteases (EP) dos isolados de *Trichoderma*.

Inibidores PMSF e EDTA foram utilizados para avaliar o efeito desses na atividade de proteases nos extratos obtidos na cromatografia de afinidade dos isolados de *Trichoderma*. O fluoreto de fenilmetanosulfonila (PMSF) reage com o resíduo de serina do sítio ativo de serino proteases. As metaloproteases são, geralmente, inibidas por agentes quelantes metálicos como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) que forma complexos muito estáveis com diversos íons metálicos.

Ambos os inibidores inibiram em média 20% a atividade de proteases do isolado T00. Foi observado ainda que esses inibidores não foram tão efetivos na inibição da atividade de proteases dos outros isolados onde a inibição foi menos de 10% (figura 7).

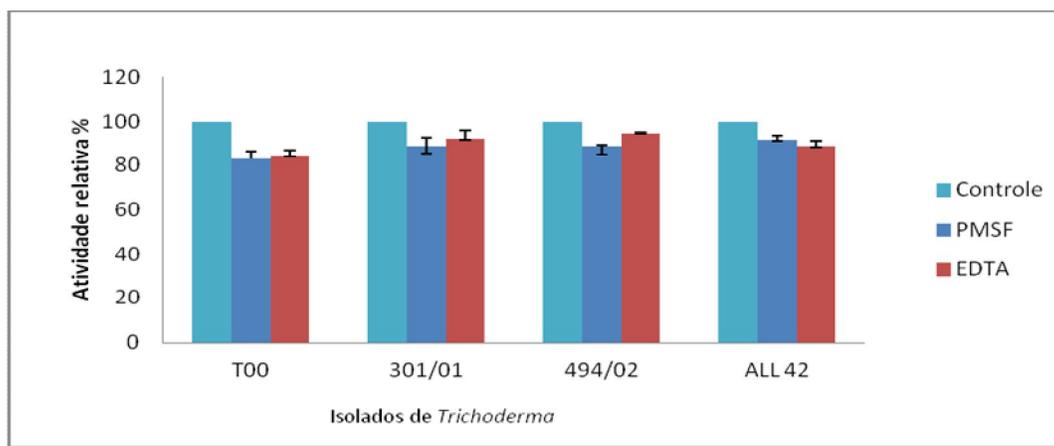


Figura 7: Efeito de inibidores nos extratos parcialmente purificados de proteases em azocaseína em pH 7,0.

Como observado na figura 7 o inibidor de serina protease, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), inibiu em media 20% a atividade enzimática em todos os isolados demonstrando que nesses isolados pode haver enzimas desse grupo, mas não são predominantes no extrato. Secades e Guijarro (1999) demonstraram resultado

similar em *Yersinia ruckeri*, no entanto no trabalho deles a enzima foi inibida quase totalmente por EDTA.

A grande maioria das proteínas neutras são pertencentes a família de serino proteases ou metaloproteases (CALDAS et al, 2001). As serino proteases não são afetadas por agentes quelantes como o EDTA, este sendo um inibidor mais eficiente para metaloproteases, estas também necessitam de um íon metálico normalmente divalente para a sua atividade, isso permite compreender o aumento da atividade em presença de íons metálicos divalentes (Mn, Mg, Ca e Fe). A figura 7 mostra que houve inibição de todos os extratos por EDTA de até 20% da atividade enzimática, indicando a presença de metaloproteases, mas estas também não são predominantes no extrato. Ambos inibidores permitiram verificar que um complexo de proteases pode atuar conjuntamente ou estarem presentes no processo de micoparasitismo de *Trichoderma* frente a PCRS, uma pequena distinção nos valores de inibição para os diferentes isolados permite a sugestão de que as mesmas famílias de proteases estejam agindo durante esse processo.

Os inibidores podem ser enquadrados em dois grupos: inibidores sítio-específicos, que modificam irreversivelmente um aminoácido do sítio ativo, e aqueles que ocorrem naturalmente, os quais podem atuar como pseudosubstratos. Tanto os inibidores sintéticos quanto os naturais imitam o substrato, competindo com o mesmo na ligação com o sítio ativo das proteases. Membros do primeiro grupo são os inibidores de serino proteases, como o diisopropil fosfluoridato e o fluoreto de fenilmetanosulfonila (PMSF), que reagem com o resíduo de serina do sítio ativo, e clorometilcetona derivada de aminoácidos e peptídeos que reagem com a histidina da tríade catalítica. As metaloproteases são, geralmente, inibidas por agentes quelantes metálicos como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) que forma complexos muito estáveis com diversos íons metálicos. Entre eles estão: magnésio e cálcio, em valores de pH acima de 7,0 e manganês, ferro(II), ferro(III), zinco, cobalto, cobre(II), chumbo e níquel em valores de pH abaixo de 7,0. O EDTA é um ácido que atua como ligante hexadentado, ou seja, pode complexar o íon metálico através de seis posições de coordenação, que são elas: através de quatro ânions carboxilato (-COO⁻), após a saída dos 4H⁺ dos grupos carboxílicos, e também através dos dois N (HARRIS, 2007). Os inibidores combinam-se de forma irreversível com o sítio ativo e são convertidos em uma forma modificada na qual um peptídeo é clivado, o qual corresponde ao substrato de especificidade primária do substrato da protease.

6.5. Avaliação da Atividade enzimática dos extratos de proteases (EP) dos isolados de *Trichoderma* em Albumina e Azocaseína.

Nos substratos testados a atividade específica permaneceu entre 1,8 e 2,9 U.mg.L⁻¹ demonstrando atividade superior quando em presença de azocaseína para os diferentes isolados como demonstrado na figura 8, já a albumina na mesma concentração manteve atividade específica um pouco abaixo da azocaseína, verificou-se dessa forma que todos os isolados possuem atividade proteolítica em ambos substratos, mas a azocaseína foi superior a albumina.

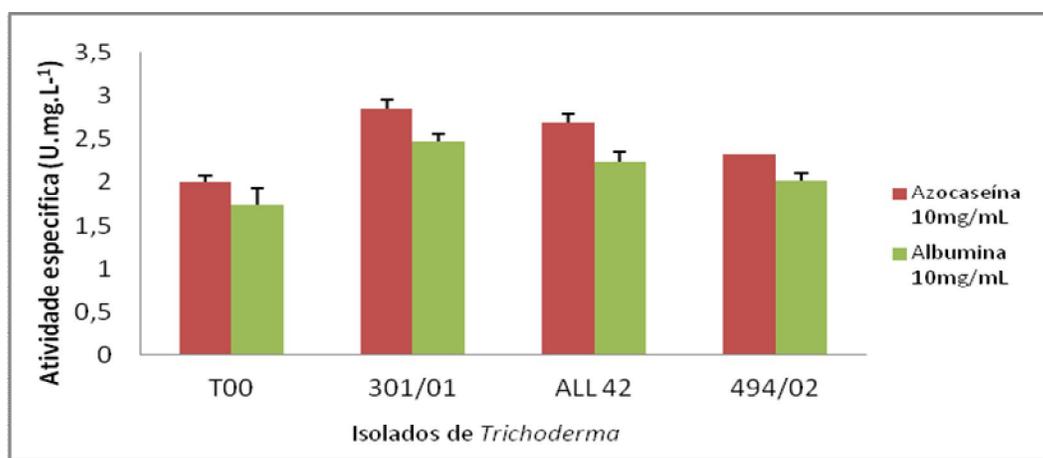


Figura 8: Efeito dos substratos azocaseína e albumina na concentração de 10mg/mL sobre a atividade específica dos extratos parcialmente purificados. A atividade específica foi calculada levando-se em consideração triplicatas.

6.6. pH e temperatura ótimos dos extratos de proteases (EP) dos isolados de *Trichoderma*.

A atividade das enzimas nos EPs foi testada como descrito no ítem 5.10. A temperatura ótima encontrada foi de 50°C com perda pronunciada de atividade em 60°C para todos os isolados (Figura 9). A atividade específica apresentada por *T. asperellum* e *T. virens* foram superiores a de *T. harzianum* frente a PCRS. *T. asperellum* manteve índices de atividade específica em 60°C superior aos demais isolados.

T. harzianum foi bem descrito na literatura como micoparasita de diversos fitopatogenos, com relação aos seus baixos índices de atividade específica, estes, podem significar eficiência no mecanismo micoparasita contra PCRS, como relatado por Flores et al (1997) em seu estudo que isolados com níveis extremamente elevados de

proteases em seu estudo não foram os melhores agentes de biocontrole em todos os casos.

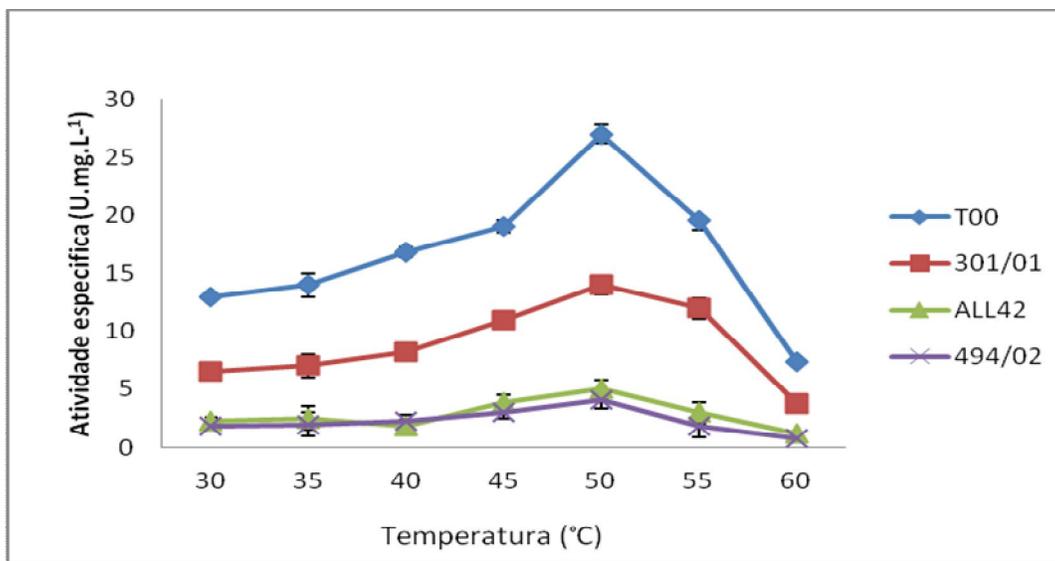


Figura 9: Efeito de temperatura nos extratos parcialmente purificados de proteases obtidos de cinética de indução frente a PCRS. A atividade específica foi calculada pela média de três análises. (T00 – *T. asperrellum*; 301/01 – *T. virens*; ALL 42 e 494/02 – *T. harzianum*)

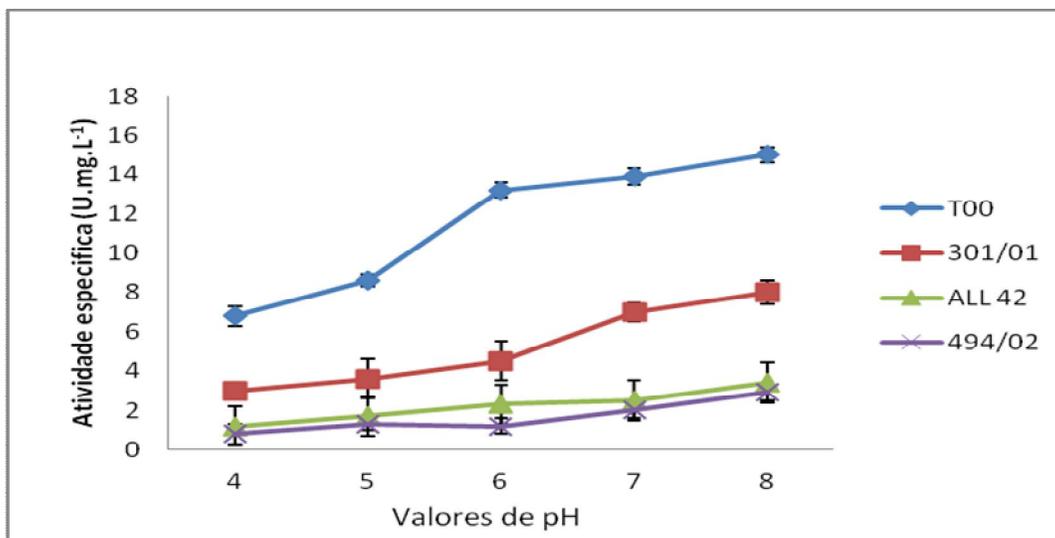


Figura 10: Efeito de pH nos extratos parcialmente purificados de proteases obtidos de cinética de indução frente a PCRS. A atividade específica foi calculada pela média de três análises. (T00 – *T. asperrellum*; 301/01 – *T. virens*; ALL 42 e 494/02 – *T. harzianum*)

Todos os isolados demonstraram atividade máxima em pH 8,0 o que pode indicar prevalência de proteases alcalinas nos EPs (Figura 10). A atividade específica

apresentada por *T. asperellum* e *T. virens* foram superiores a de *T. harzianum* frente a PCR. *T. asperellum* manteve índices de atividade específica em todos os pHs muito superior aos demais isolados. *T. harzianum* manteve perfil proteico bem inferior a *T. virens* e *T. asperellum*, mas em pH 8,0 sua atividade específica dobrou. *T. harzianum* (494/02 e ALL 42) apresentaram um constante crescimento na atividade com o aumento de pH demonstrando a prevalência de proteases alcalinas, enquanto *T. virens* e *T. asperellum* e demonstraram pequeno crescimento na atividade em relação ao pH 7,0 e 8,0, o que pode indicar prevalência de proteases tanto neutras e alcalinas.

Proteases alcalinas foram descritas em vários trabalhos, Dunaevsky e colaboradores (2006 apud SIMKOVIC 2008) purificaram em *T. harzianum* uma serino protease em pH ótimo 7,0. De Marco e Felix (2002) descreveram proteases em pH ótimo 8,0 para *T. harzianum*, e Dienes et al (2007) uma protease para *T. reesei* do tipo ``trypsin-like`` em pH 8,0.

6.7. Efeito de detergentes nos extratos parcialmente purificados

O SDS (dodecil sulfato de sodio) e um tensoativo aniônico que quando em solução aquosa possui carga negativa em sua porção hidrofílica, ligando-se dessa forma as porções positivas das enzimas solubilizando-as no meio, consequentemente inativando-as. Os principais representantes desta classe são os sabões de ácidos graxos, os alquil sulfatos, os alquil éter sulfatos e os alquil sulfossuccinatos.

Já o Triton X-100 (Éster octilfenólico de decaetilenglicol) e um detergente não-iónico do tipo polietóxi. Esse tensoativo do tipo não iônico e constituído por uma cadeia de polioxietileno e uma porção hidrofílica. O Triton X-100 é anfifílico, ou seja, é uma espécie química de origem orgânica que apresenta em sua estrutura uma parte polar e hidrofílica e outra apolar e hidrofóbica. Os átomos de oxigênio da porção hidrofílica (poliéter) tornam a molécula solúvel em água devido à possibilidade de formação de ligações de hidrogênio, e a porção hidrofóbica é formada pelo grupo p-t-octilfenil (FONSECA, 2004).

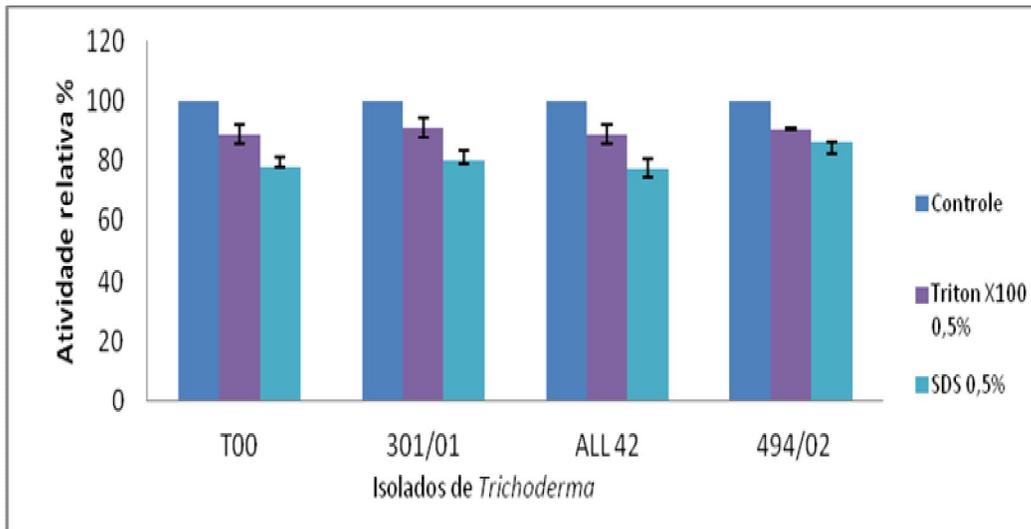


Figura 11: Efeito de detergentes nos extratos parcialmente purificados de proteases. O controle para análise de efeito de detergentes foi o extrato de cada isolado nas mesmas condições de testes, sem o agente detergente. O calculo foi realizado com a média de três amostras. (T00 – *T. asperrellum*; 301/01 – *T. virens*; ALL 42 e 494/02 – *T. harzianum*)

Houve um decréscimo de atividade no uso de ambos detergentes para todos os isolados, isso sugere que essas substâncias possam interagir com estruturas quaternária e terciária de algumas enzimas do extrato de modo que algumas proteases possam perder a sua atividade. No entanto, a atividade específica continua interessante demonstrando que grande parte do extrato proteico continua atuante mesmo em presença desses detergentes. Essa observação é extremamente relevante para enzimas de uso industrial, por exemplo (FELIX et al 2004). A pequena discrepância entre as atividades relativas encontradas para os diferentes isolados pode sugerir grupos parecidos de proteases atuantes ou presentes em todos os extratos.

6.8. Efeito de íons na atividade enzimática nos extratos de proteases (EP) dos isolados de *Trichoderma*.

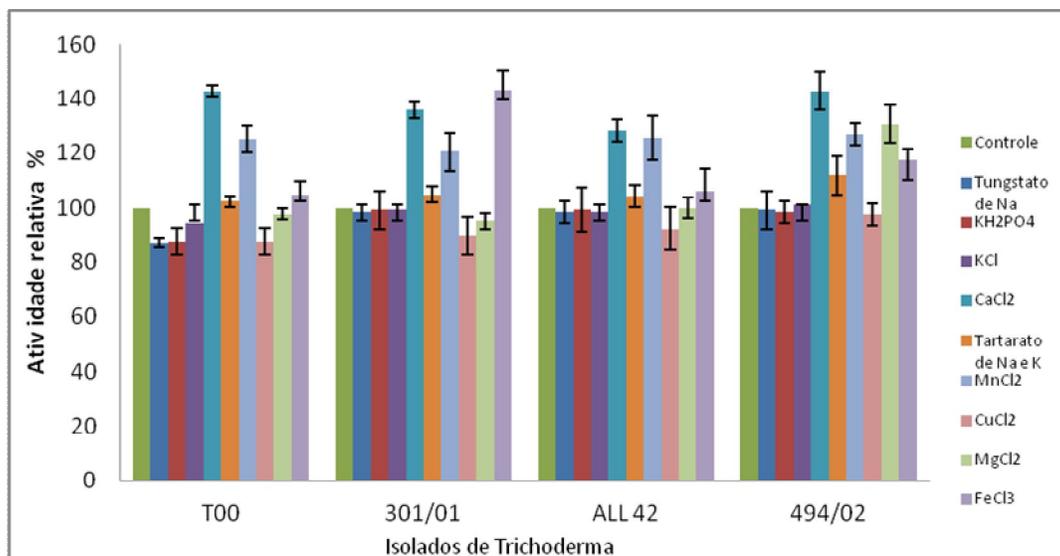


Figura 12: Efeito de íons nos extratos parcialmente purificados. O controle para a análise foi realizado com os extratos dos isolados nas mesmas condições de teste sem a adição de íons. O cálculo foi realizado com a média de três amostras. (T00 – *T. asperillum*; 301/01 – *T. virens*; ALL 42 e 494/02 – *T. harzianum*)

Os cátions Cu^{+2} e Na^{+} suprimiram a atividade dos extratos em até 20% provavelmente competem com o substrato pela carga negativa de algum aminoácido estrutural, desfavorecendo a ligação enzima-substrato diminuindo desse modo a atividade enzimática. O cátion Ca^{+2} , no entanto, aumentou em até 40% a atividade dos extratos, íons metálicos como Fe^{+3} , Mn^{+2} e Mg^{+2} aumentaram ou mantiveram a atividade enzimática próxima a do controle isento de íons. Pode haver alguma interação destes cátions com o centro ativo, que altere a configuração tridimensional do sítio de catálise, interferindo na interação enzima-substrato de tal forma a melhorar a atividade enzimática. Esses resultados podem sugerir a presença de enzimas tipo metaloproteases dependentes de Fe^{+3} , Ca^{+2} , Mg^{+2} ou Mn^{+2} , (cátions divalentes) e estas podem possuir papel importante no mecanismo de micoparasitismo.

As proteases alcalinas em especial metaloproteases requerem íons metálicos divalentes como Ca^{+2} , Mg^{+2} ou Mn^{+2} ou até mesmo a combinação desses cátions para aumento da atividade enzimática. Acredita-se que esses cátions protegem a enzima da desnaturação em razão da temperatura alta, mantendo a atividade em temperaturas mais elevadas que outras proteases (GIONGO, 2006).

O aumento da força iônica, causado pelo aumento da concentração de sais em solução, leva a uma diminuição da atração entre íons de carga oposta e, conseqüentemente, desfavorece a interação enzima-substrato. Tal fato também pode explicar a atividade inibidora de KH_2PO_4 , que libera anions com carga -2 em solução. A força iônica de uma solução depende da concentração molar de cada íon, mas também da carga destes íons. Quanto maior a carga do íon maior será seu efeito na força iônica. Portanto, soluções com mesma molaridade, mas compostas por sais de cátions com diferentes cargas terão maior força iônica. (SENA, 2006)

As soluções de MgCl_2 , MnCl_2 , CuCl_2 e CaCl_2 0,05 M tem força iônica duas vezes maior que soluções de Na_2WO_4 (tungstato de sódio), $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (tartarato de sódio e potássio) e KCl 0,05 M. No entanto tal fato não contribui para que os íons divalentes tivessem maior poder inibitório sobre a atividade enzimática dos extratos, com exceção do Cu. A maior força iônica apresentada por soluções equimolares de cátions divalentes, comparada às soluções de cátions monovalentes, resulta numa maior interação entre íons de carga oposta, e conseqüentemente, favorece ainda mais a interação enzima-substrato.

O aumento da força iônica da solução pode também quebrar o padrão normal de interações eletrostáticas que mantém a estrutura da enzima, o que pode levar a uma alteração conformacional no centro ativo e alterar a atividade enzima-substrato, no entanto o contrário foi percebido nesse estudo talvez porque a concentração de íons testada não resulte em aumento da força iônica, outra explicação é que os aminoácidos dos sítios ativos das enzimas dos extratos sejam dependentes de cátions divalentes (SENA, 2006).

6.9. Análise do perfil proteico dos EP dos isolados de *Trichoderma* por SDS-PAGE e Zimograma em gelatina a 12%.

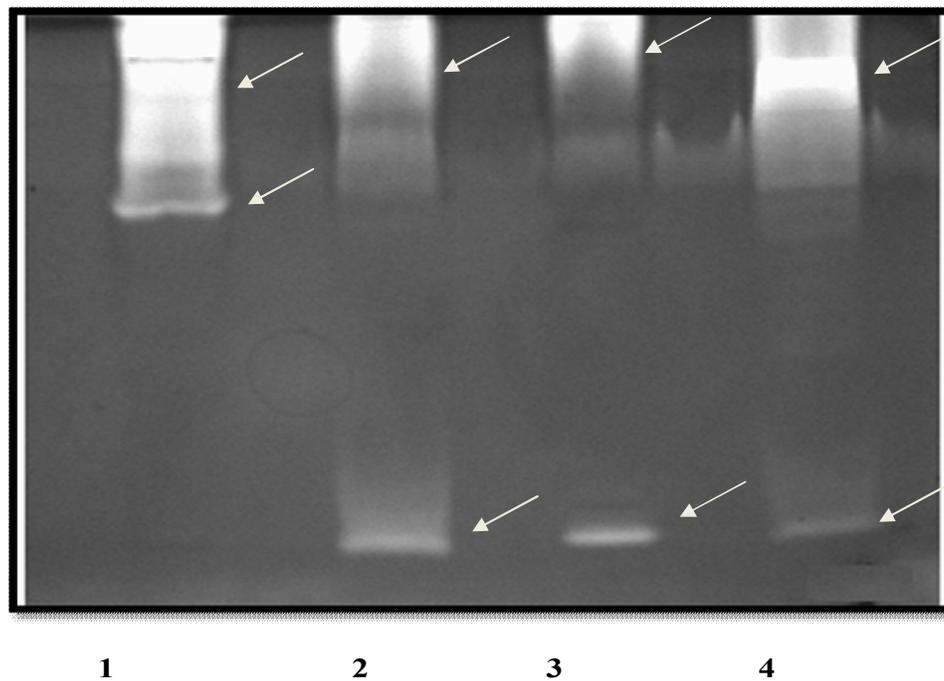


Figura 13- Zimograma dos extratos de proteases dos isolados de *Trichoderma*. 1) *T. asperellum* (T00); 2) *T. harzianum* (ALL42); 3) *T. harzianum* (494/02); *T. virens* (301/01).

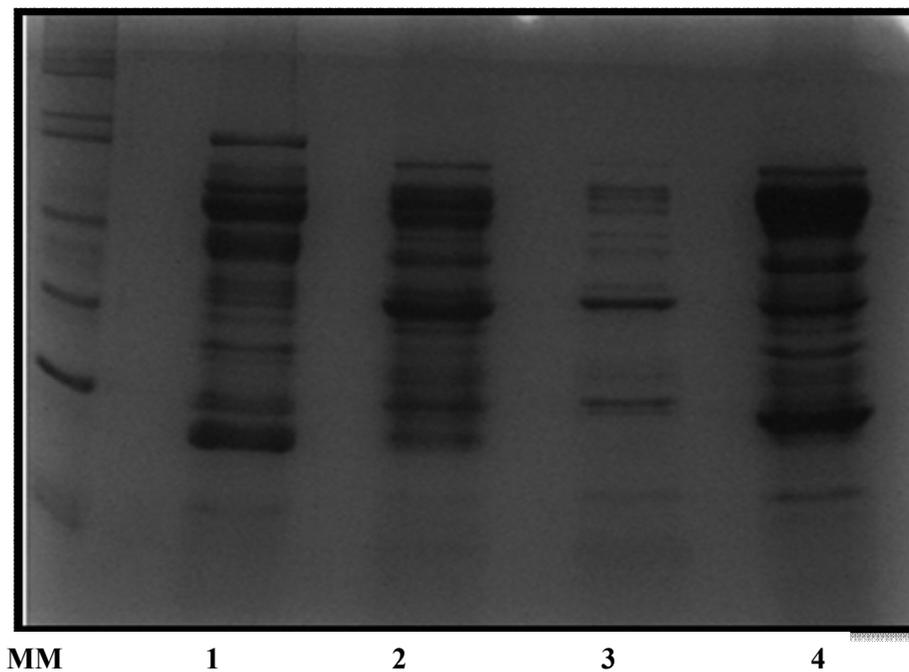


Figura 14- SDS-PAGE dos extratos de proteases (EP) dos isolados de *Trichoderma*. Marcador Molecular (MM); 1) *T. asperellum* (T00); 2) *T. harzianum* (ALL42); 3) *T. harzianum* (494/02); 4) *T. virens* (301/01).

O perfil das proteases dos EPs dos isolados de *Trichoderma* foi analisado por eletroforese não desnaturante (Zimograma). Todos os extratos de proteases dos isolados apresentaram isoformas (setas). As bandas proteicas correspondentes aos halos de degradação do substrato (gelatina) apresentaram padrão de degradação diferente mostrado pelas setas. Nota-se ainda que com exceção de *T. asperellum* todos os outros isolados apresentaram uma isoforma bem distanciada presente bem abaixo no gel (Figura 13).

Para avaliar o perfil de proteases dos isolados foi realizada uma eletroforese desnaturante SDS-PAGE. O perfil de bandas proteicas mostrou-se muito diversificado. Pode-se notar que o isolado 494/02 (*T. harzianum*) apresenta um perfil de bandas menor em relação aos outros isolados. Todos os extratos de proteases foram adicionados tanto no gel SDS-PAGE quanto no zimograma na concentração de 30µg de proteína (Figura 14).

6.10. RT- PCR dos isolados de Trichoderma para os isolados de *T harzianum* (494/02 e ALL 42)

Para a análise da expressão dos genes de proteases foi realizada a técnica de RT-PCR. Para isso, os micélios das induções nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas dos isolados de *Trichoderma* foram utilizados. Para o controle as mesmas induções foram feitas com os isolados sendo que os meios continham glicose a 2% como única fonte de carbono.

Os primers testados nesse estudo foram desenhados por um pesquisador do nosso grupo, a partir da montagem de uma biblioteca de cDNA para *T. harzianum* (ALL 42) crescido em parede celular tratada de *F. solani* a partir do mRNA total extraído durante cinética de indução sem normalização ou subtração.

Durante a realização da técnica de RT-PCR foi observado que a amplificação dos genes de proteases não ocorreu para *T. virens* e *T. asperellum*, desse modo a comparação foi feita somente para *T. harzianum* (494/02 e ALL 42). O fato dos primers não serem amplificados de modo satisfatório para *T. virens* e *T. asperellum* pode ser explicado pela especificidade da biblioteca de cDNA que foi montada para *T. harzianum* (ALL42) demonstrando que essas regiões podem ser conservadas para famílias diferentes.

Os primers utilizados foram escolhidos de acordo com que a amplificação ocorria perfeitamente dentro da curva esperada de RT-PCR para ambos os isolados de forma que pudesse haver posterior comparação, levando-se em consideração que os primers para serem testados deveriam amplificar proteases que tivessem papel relatado dentro do micoparasitismo, dessa forma foram selecionadas aspartato protease, aspartic, serina protease e uma tripsin-like, que já foram bem descritas na literatura como participantes ativas do processo de micoparasitismo por *T. harzianum* (RAMADA, 2010)

A RT-PCR foi realizada tendo como normalizador o gene da tubulina que é expresso constitutivamente pelo *Trichoderma spp.* Como controle o isolado crescido em mesmas condições somente variando a fonte de carbono para glicose (Figura 15 e 16). É importante ressaltar que as colunas abaixo de 0 (Figuras 15 e 16) não significam não amplificação ou não expressão, mas sim que em comparação a quantidade de protease expressa quando a fonte de carbono foi glicose, a expressão do teste foi bem inferior.

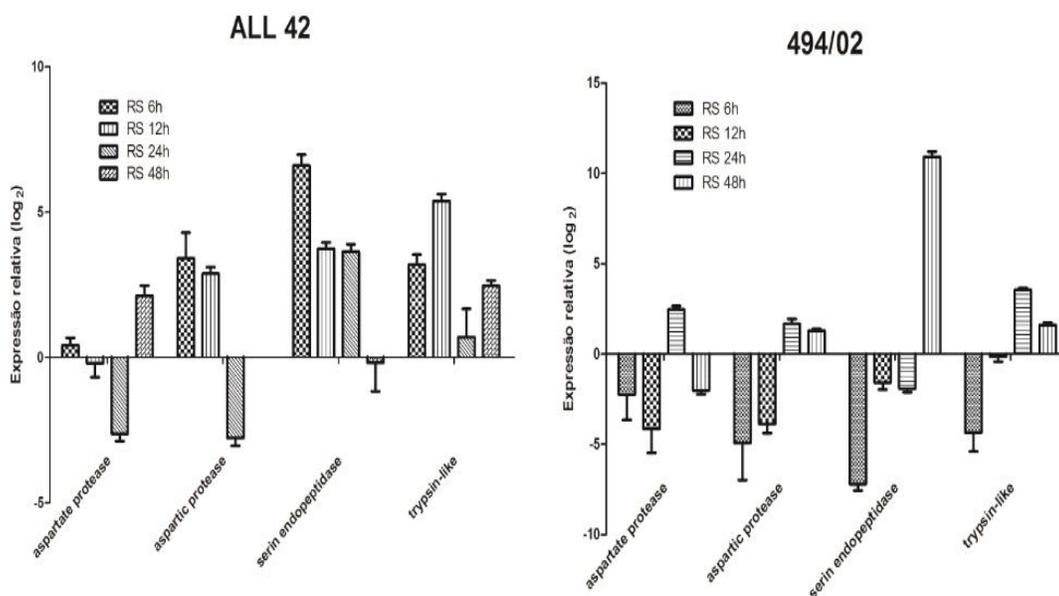


Figura 15: Expressão de proteases frente a PCRS em 6, 12, 24 e 48h de indução, como comparação foi usado glicose como sendo o 0 do gráfico, e o normalizador a Tubulina de *T. harzianum* ALL 42 e 494/02.

Foi observado que isolado 494/02 tem expressão aumentada de todas proteases testadas em 24h e 48h na presença de *R. solani*. Isso pode ser um indício de que a princípio esse isolado secreta outras enzimas hidrolíticas para iniciar o processo de micoparasitismo e complementa o processo com as proteases testadas (Figura 15). Já ALL 42 a princípio secreta todas as proteases testadas na maior parte do tempo

sugerindo concomitância entre as demais enzimas hidrolíticas testadas no mecanismo de micoparasitismo (Figura 15 e 16), isso pode ser um indicativo de que ALL 42 possui um complexo mecanismo de secreção de enzimas hidrolíticas para garantir sua vantagem competitiva frente ao fitopatogeno.

Os valores de expressão relativa encontrados para o isolado 494/02 (Figura 15) podem ainda indicar que durante o processo de micoparasitismo frente a PCRS este isolado secreta enzimas hidrolíticas diferentes das testadas para garantir a prevalência sobre o fitopatogeno.

GEREMIA et al (1993) demonstrou que proteases alcalinas são reprimidas quando *Trichoderma harzianum* foi crescido em fonte de carbono exclusiva como glicose. Além disso genes como PRA1, PRB1 e Tvsp1 que codificam serina proteases são induzidos em condições de micoparasitismo, bem como frente a PCRS (GOLDMAN & GOLDMAN 1998; GEREMIA et al 1993; POZO et al 2004) e parede celular de *B cinérea* (SUAREZ et al 2007).

TSENG et al. (2008) estudou as proteínas secretadas por *Trichoderma harzianum* ETS323 em resposta a *Rhizoctonia solani*, avaliando as diferenças das proteínas secretadas por ele quando crescido em meios contendo diferentes fontes de carbono (glicose, glicose + micélio de *R. solani* desativado e micélio de *R. solani*). Foram selecionadas 43 bandas, das quais 35 exibiram sinais de LC-MS/MS. No total, 8 proteínas foram identificadas [glicosil hidrolase 37 kDa, glicosil hidrolase 118 kDa, possível l-aminoácido oxidase (*T. harzianum*), possível protease aspártica (*T. harzianum*), β -glicosidase 92 kDa, endoquitinase 42 kDa (*Trichoderma* sp.), β -glicosidase 94 kDa, serina protease alcalina.

Um estudo da resposta proteômica de *Trichoderma atroviride* quando crescido na presença de parede celular de *Rhizoctonia solani* e em glicose foi realizado por GRYNIER et al. (2005). Foi observado que 56 bandas de proteínas estavam mais ou somente expressas no micélio crescido em meio contendo parede celular de *R. solani*. Com o objetivo de investigar proteínas possivelmente relacionadas com o micoparasitismo, essas bandas foram analisadas, e 24 bandas, correspondendo a 8 genes, foram identificados, 20 sendo eles: N-acetil- β -D-glicosaminidase, endoquitinase 42 kDa, protease vacuolar A, fator de iniciação eucariótica 4a, proteína hipotética, superóxido dismutase, protease *trypsin-like* e serina protease. Das três proteases identificadas (nunca descritas antes em *T. atroviride*), chama atenção a serina protease, que quando comparada em bancos de dados com proteínas de *Trichoderma*, incluindo

uma serina protease (gene *prb1*), não obteve correspondência, sugerindo que a protease identificada é diferente daquela caracterizada de *T. harzianum*. Portanto o perfil de expressão de proteases muda entre as espécies e provavelmente o mecanismo de secreção dessas proteases e hidrolases muda também com a espécie de *Trichoderma*,

SUÁREZ et al., 2005 cresceram um isolado de *T. harzianum* em meio contendo parede celular de diferentes fitopatógenos (*Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia solani*) ou quitina, e foram observados 33, 62, 122 e 256 bandas de proteínas, respectivamente. Foram selecionados 4 bandas (s1, s2, s3 e s4), que estavam presentes em todas as condições de crescimento. A banda s1 foi a mais expressa em todas as condições e foi identificada como uma protease aspártica pela similaridade com as de proteases de vários organismos. Foi observado também que a resposta proteômica de *T. harzianum* varia tanto quantitativamente quanto qualitativamente de acordo com a parede celular utilizada durante o crescimento, sugerindo que *T. harzianum* é hábil para modificar a produção dessas proteínas de acordo com o fungo hospedeiro.

Para comparação e posterior correlação com as proteases mais três enzimas hidrolíticas foram analisadas quanto a expressão frente a PCRS, são elas: β 1-3 endoglucanase, N- acetil-glicosaminidase (Nagase) e quitinase 42kD, também escolhidas por serem bem relatadas no mecanismo de micoparasitismo de *T. harzianum* em *Rhizoctonia solani*.

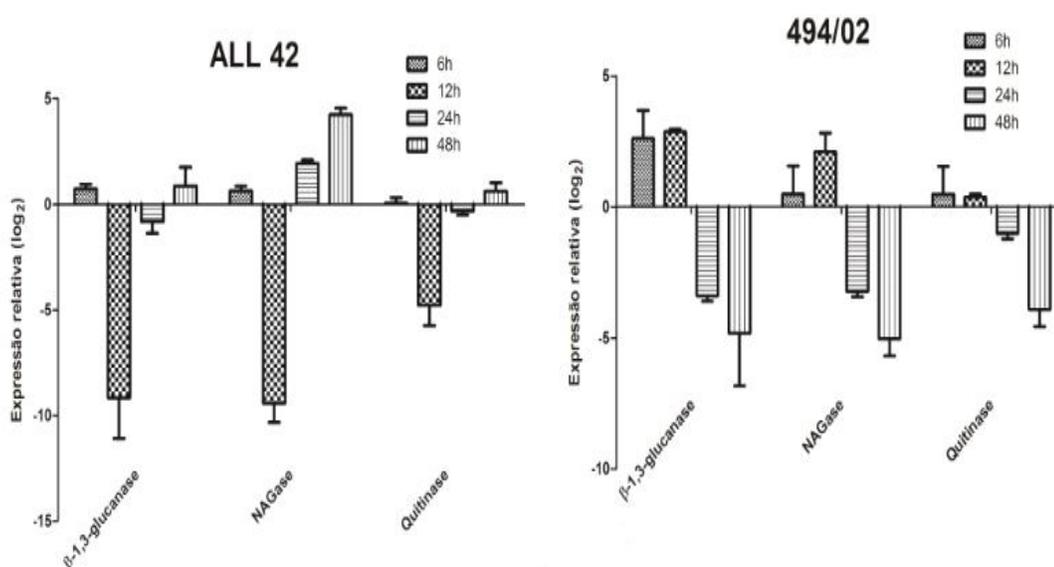


Figura 16: Expressão de enzimas hidrolíticas frente a PCRS em 6, 12, 24 e 48h de indução, como comparação foi usado glicose como sendo o 0 do gráfico, e o normalizador a Tubulina de *T. harzianum* ALL 42 e 494/02.

A expressão das demais hidrolases testadas β 1-3 endoglucanase, N-acetil glicosaminidase (Nagase) e quitinase 42kD foi diferente nas duas espécies de *T harzianum*, em 6 horas 494/02 secretou mais β 1-3 endoglucanase em detrimento das outras. Enquanto ALL 42 obteve expressão também de N-acetil glicosaminidase (Nagase), mas em valores bem mais discretos, em 12 horas o isolado ALL 42 teve suprimida qualquer expressão de hidrolases, enquanto o 494/02 manteve aumento de β 1-3 endoglucanase e N-acetil glicosaminidase (Nagase), só tendo suprimida sua expressão de hidrolases em 24h e posteriormente totalmente em 48h (Figura 16).

Enquanto a expressão dessas enzimas hidrolíticas permaneceu constante durante os tempos de indução em ALL 42, o isolado 494/02 expressou essas apenas em 6 e 12 horas diminuindo a sua expressão quando comparado com a fonte de carbono glicose.

ALL 42 em 24h passou a expressar N-acetil glicosaminidase (Nagase) mas em 48h diminuiu sua expressão. Inicialmente frente à parede de *R. solani* a expressão de β 1-3 endoglucanase se torna alta em ambos *T harzianum*, posteriormente com o contato prolongado as expressões em ambos parece ser inibida, sendo que ALL 42 mantém os índices de expressão se comparado a 48h, enquanto a quitinase 42kD parece ter uma função no micoparasitismo, mas não é expressa acima do controle.

A produção de hidrolases de parede celular fúngica por espécies do gênero *Trichoderma* já foi descrita como uma importante etapa para a sua atividade e ação micoparásita contra fitopatógenos (BENITEZ et al 2004; ALMEIDA et al 2007). A expressão de genes que codificam essas enzimas é diferenciada nas diversas espécies de *Trichoderma*, essa expressão parece ser regulada de acordo com a fonte de carbono na qual houve crescimento fúngico, incluindo-se as paredes celulares de fitopatógenos, como a PCRS. (STAYAERT et al 2004).

Os níveis de expressão de hidrolases parecem aumentar quando o *Trichoderma* foi cultivado em meios ricos em quitina e em meios com parede celular de fitopatógenos como demonstrado em trabalhos com *Pythium ultimum*, *Botrytis cinérea* e *Rhizoctonia solani* (SUAREZ et al 2005) *R. solani* (ALMEIDA et al 2007; TSENG et al 2008) *B. cinérea* (YANG et al 2009) *R. solani*, *Fusarium sp* e *Macrophomina phaseolamina* (MONTEIRO et al 2010) e *F solani* (RAMADA 2010).

6.11. Correlação entre quitinase 42 kD, nagase e β – 1,3 endoglucanase e proteases nos isolados de *T. harzianum* (ALL42 e 494/02)

Para tentar compreender a correlação entre a expressão de hidrolases e proteases no processo de micoparasitismo foi realizado o teste de Pearson, sendo que o nível de significância foi ajustado pela correção de Bonferroni, que é dada por $\beta = \alpha / N$, onde β é o nível de significância corrigido, α é o nível de significância do teste (0,05) e o N é o número de amostras do teste.

As correlações foram calculadas mediante os valores de expressão em 48 horas de indução para: quitinase 42kD, nagase, β 1-3 glucanase, aspartato protease, tripsin-like, aspartic e serina endopeptidase.

Correlações positivas e negativas significativas foram tidas de pelo menos 60% de incidência, (valores em tabela em torno de 0,6-positiva e -0,6-negativa) sendo fortemente positivas ou negativas quando acima de 85% (valores em tabela em torno de 0,85-positiva e -0,85-negativa). As que se tornaram significativas positivas para o isolado ALL 42 foram a expressão entre aspartic e serina endopeptidase, o que estatisticamente parece ser dependente, sugerindo ação sinérgica entre ambas proteases, a expressão de aspartato protease e todas as hidrolases sugerindo também sinergismo entre a hidrolase e as proteases em estudo. Outras correlações significativas positivas foram entre β 1-3 glucanase e nagase e quitinase 42kD; e nagase e quitinase 42kD demonstrando sinergismo entre as hidrolases secretadas. Já correlações negativas significativas foram observadas entre tripsin-like e β 1-3 glucanase, nagase e quitinase 42 kD sugerindo que quando uma estiver em ação é muito pouco provável que alguma enzima hidrolítica testada também esteja (tabela 5).

Atividades proteolíticas alcalinas associadas as atividades de quitinases e B 1-3 glicanases demonstraram-se significativas contra fitopatogenos como *F. oxysporum* e *R. solani* (MONTEIRO et al 2010, RAMADA 2010). Esses trabalhos demonstraram a correlação entre atividade antagônica e produção de hidrolases de parede celular fungica. Além do papel do micélio ou parede celular do fungo hospedeiro como indutor de expressão dessas atividades.

E relatada em *T viride* e *T harzianum* a ação sinérgica de enzimas hidrolíticas e proteases no mecanismo de micoparasitismo no momento da degradação da parede celular do patógeno (BENITEZ et al, 2004), acredita-se que a secreção de uma protease ative a secreção de outras agindo conjuntamente para aumento da efetividade do

controle e degradação da parede celular do patógeno. O fato de não correlação pode indicar outros mecanismos de micoparasitismo sendo expressos somando-se a degradação da parede celular. Esse mecanismo ainda é pouco compreendido.

Tabela 5: Correlação entre enzimas expressas em PCRS de ALL 42

	Aspartato protease	Aspartic	Serina Endopeptidase	Trypsin-like	β 1-3 glucanase	Nagase	Quitinase 42kD
Aspartato protease	1						
Aspartic	-0,3287	1					
Serina Endopeptidase	-0,2471	0,8044	1				
Trypsin- like	-0,2421	0,4789	-0,1347	1			
β 1-3 glucanase	0,7110	-0,0401	0,3806	-0,6728	1		
Nagase	0,9171	-0,6655	-0,4618	-0,4733	0,6411	1	
Quitinase 42kD	0,7317	-0,4122	0,0699	-0,8277	0,9248	0,8076	1

Tabela 5: Correlação entre enzimas expressas em PCRS de ALL 42. As correlações de número 1 são entre enzimas idênticas. A correlação positiva indica quando ambas enzimas estão atuando no mesmo período, já a correlação negativa indica ausência de atuação conjunta.

As correlações significativas positivas do isolado de 494/02 (Tabela 6) foram observadas entre aspartato protease e aspartic e trypsin-like, aspartic e trypsin-like e como já relatado em ALL 42 as correlações entre as hidrolases entre β 1-3 glucanase e nagase e entre quitinase 42KD e nagase e quitinase 42kD. Essa correlação parece se manter conservada em *T harzianum* em ambas espécies estudadas, demonstrando o sinergismo entre a expressão destas. Uma correlação bastante interessante e diferenciada entre ambos isolados e entre as enzimas hidrolíticas e aspartato protease que existe em ALL 42 e não em 494/02, essa correlação pode sugerir um mecanismo evolutivo no micoparasitismo, explicando o porque de ALL 42 apresentou-se mais efetivo no biocontrole que 494/02.

Tabela 6: Correlação entre enzimas expressas em PCRS de 494/02

	Aspartate protease	Aspartic	Serin Endopeptidase	Trypsin-like	β 1-3 glucanase	Nagase	Quitinas e 42kD
Aspartate protease	1						
Aspartic	0,7269	1					
Serin Endopeptidase	-0,3145	0,4256	1				
Trypsin-like	0,9746	0,852	-0,1117	1			
β 1-3 glucanase	-0,5864	-0,9337	-0,5779	-0,7267	1		
Nagase	-0,4794	-0,7851	-0,4782	-0,55179	0,8745	1	
Quitinase 42kD	-0,3499	-0,8973	-0,7762	-0,5371	0,9469	0,7428	1

Tabela 6: Correlação entre enzimas expressas em PCRS de 494/02. As correlações de número 1 são entre enzimas idênticas. A correlação positiva indica quando ambas enzimas estão atuando no mesmo período, já a correlação negativa indica ausência de atuação conjunta.

As correlações significativas negativas são de aspartic entre β 1-3 glucanase, entre nagase e entre quitinase 42kD e trypsin-like entre β 1-3 glucanase demonstrando ação diversa entre as enzimas envolvidas, provavelmente estas devam atuar em locos distintos na função do micoparasitismo em *R. solani*.

Uma probabilidade para essa variação encontrada na expressão de proteases e enzimas hidrolíticas testadas é que cada espécie possua mecanismos de expressão de enzimas diferenciados para o biocontrole, como foi sugerido em nosso estudo entre 494/02 e ALL 42.

7. CONCLUSÕES

- O teste de pareamento mostrou que *T. harzianum*, *T. asperrellum* e *T. virens* são eficientes na capacidade antagonista no fitopatógeno *R. solani* utilizado nesse estudo. Sendo que *T. asperrellum* e *T. virens* foram mais rápidos que os *T. harzianum*, enquanto para *T. harzianum* o isolado ALL 42 foi mais rápido e eficiente que 494/02
- Cromatografia de afinidade em Bacitracina foi eficiente para obtenção de um extrato de proteases.
- Efeitos de íons, inibidores, detergentes, substrato, pH e temperatura foram diferentes para os isolados de *Trichoderma* sugerindo variações de perfil proteico para esses extratos purificados frente a PCRS,
- Como demonstrado na eletroforese em gel de poliacrilamida e em zimograma em gelatina a quantidade de proteases secretadas pelo isolado 494/02 e bem inferior que o isolado ALL 42 nas condições de indução frente a PCRS.
- A diferença na expressão observada na análise de RT-PCR para *T. harzianum* (494/02 e ALL 42) das induções quando foi crescido em meio contendo parede celular de *R. solani* mostra que a variação da secreção de proteínas varia de acordo com o indutor e com a espécie.
- Correlações positivas e negativas entre as expressões de proteases e hidrolases foram estabelecidas sugerindo secreção seguida e/ou conjunta dessas enzimas no processo de micoparasitismo. Em ALL 42 uma correlação interessante foi observada entre hidrolases e aspartato protease não encontrada em 494/02 sugerindo que este pode ser um dos motivos para ação micoparasita melhorada em ALL 42 frente a PCRS.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.C. Thanatephorus cucumeris (Rhizoctonia solani), a species complex of wide host range. *Advances in Plant Pathology*, London, v.6, p.535-552, 1988.

AIT-LAHSEN, H., SOLER, A., REY, M., De la CRUZ, J. , MONTE, E. & LLOBELLI, A. An antifungal exo- α -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Applied Environmental Microbiology*, 67(12): 5833-9, 2001.

ALMEIDA, F.B.R; CERQUEIRA, F.M.; SILVA, R.N.; ULHOA, C.J; LIMA, A.L. (2007). Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters* 29:1189–1193. 2007

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E.A.V. MAFIA, R.G., ASSIS, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto. Vicoca. Editora UFV, 2004

ANDERSON, N.A. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, St. Paul, v.20, p.329-344, 1982.

ARCHER DB, PEBERDY JF. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17: 273-306. 1997

BANVILLE, G.J; CARLING, D.E., OTRYSKO, B.E. *Rhizoctonia* disease on potato. *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996.

BARCHINI., and R. E. COWART. Extracellular iron reductase activity produced by *Listeria monocytogenes*. *Arch. Microbiol.* 166:51–57. 1996

BARTNICKI-GARCIA, S. Cell Wall Chemistry, Morphogenesis, and Taxonomy of Fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* v.22, p. 87-108, 1968

BENITEZ, T., RINCON, A.M., LIMON, M.C. E CODON. A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4): 249-260, 2004.

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*, 1976

BRUNS, T.D.; WHITE, T.J.; TAYLOR, J.W. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. v.22, p.525-64, 1991.

CHAVERRI, P., CASTLEBURY, L.A., SAMUELS, G.J., GEISER, D., Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Mol. Phylogenet. Evol.*, n. 27, p.302-313. 2003.

CHET, I. *Trichoderma* – application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soil borne plant pathogenic fungi. New York: John Wiley and Sons, 1987

CORABI-ADELL, Carlo. *Biodiversidade do gênero trichoderma (hypocreales – fungi) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica*. 202p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro. São Paulo. 2004

CORTES C, GUTIERREZ A, OLMEDO V, INBAR J, CHET I, HERRERA-ESTRELLA A. *Mol. Gen. Genet.* 260: 218-225. 1998

DELGADO-JARANA, J., PINTOR-TORO, J. A., BENITEZ, T.: Overproduction of b-1,6-glucanase in *Trichoderma harzianum* is controlled by extracellular acidic proteases and pH. *Biochim Biophys Acta* 1481, 289–296. 2000.

DENISON S. *Fungal Genet. Biol.* 29: 61-71. 2000

De MARCO, J.L., Lima, L.H.C., Sousa, M.V. De & Felix, C.R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis*

perniciosa, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 16:383-386, 2000.

DJONOVIC S, POZO MJ, DANGOTT LJ, HOWELL CR, KENERLEY CM. Mol. Plant. Microbe Interact. 19: 838-853. 2006

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. 6B, n.2, p.100-112. 2005.

ELAD, Y., David, D.R., Levi, T., Kapat, A. & Kirshner, B. *Trichoderma harzianum* T-39-mechanisms of biocontrol of foliar pathogens. In: Modern fungicides and antifungal compounds II (Eds. H. Lyr, P.E. Russel, H.W. Dehne & H.D. Sisler). Andoverm Hants, UK: Intercept, pp.459-67, 1999.

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

ENEYSKAYA EV, Kulminskaya AA, Savelev AN, Saveleva NV, Shabalin KA, Neustroev KN (1999) Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: 226-231.

ESPÓSITO, E. & SILVA, M. da. Sisthematics and Environmental Applications of the genus *Trichoderma*. Critical Reviews In Microbiology, 24: 89-98, 1998.

FAISAL, M; SCHAFHAUSER D.Y; GARREIS K.A; ELSAYED E; LA PEYRE J.F. Isolation and characterization of *Perkinsus marinus* proteases using bacitracin–sepharose affinity chromatography. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 123 , 417–426. 1999.

FLORES, A., CHET, I., HERRERA-ESTRELA, A.: Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. Curr Genet 31, 30–37. 1997.

FONTAINE, T. et al. Molecular organization of the alkali insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J. Biol. Chem.* n. 275, p. 27594–27607. 2000

GEREMIA RA, GOLDMAN GH, JACOBS D, ARDILES W, VILA SB, Van MONTAGU M, HERRERA-ESTRELLA . A *Mol. Microbiol.* 8: 603-613. 1993

GIONGO, J. L. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp. 95p. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. RS. 2006

HARAN, S. SCHINCKLER, H; CHET, I. Molecular Mechanismo of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*, *Microbiology*, 1995

HARMAN, G.E., Howel, C.R., Viterbo, A. , Chet, I. & Lorito, M. *Trichoderma* species- opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews/Microbiology*, 2: 43-56, 2004.

HOMOUTH, M., P. VALENTIN-WEIGAND, M. ROHDE, and G.-F. GERLACH. Identification and characterization of a novel extracellular ferric reductase from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 66:710–716. 1998

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. *Applied Environmental Microbiology*, 66:1890-1898, 2000.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. v. 87, n.01, Jan, 2003.

KINDERMANN, J., EL-AYOUTI, Y., SAMUELS, G.J., AND KUBICEK, C.P. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA cluster. *Fungal Genet. Biol.* 24, 298-309. 1998.

KREDICS, L. et al.: Extracellular proteases of *Trichoderma* species a review. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 52 (2), pp. 169–184. 2005

KRUGNER, T. L.; BACCHI, L. M. A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Eds.) *Manual de Fitopatologia*. v. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 46-95, 1995.

KUBICEK, C. P., MACH, R. L., PETERBAUER, C. K., LORITO, M.: *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *J Plant Pathol* 83(S2), 11–23. 2001.

KUHLS, K. et al. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proc. Natl Acad Sci USA*, n. 93, p. 7755-7760. 1996.

KUÇUK, Ç. & KIVANÇ, M. Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. *Turk. J. Biol.*, 27: 247-253, 2003.

KUNEIDA-ALONSO, S. ALFENAS, AA.C.; MAFFIA, L.A. Sobrevivencia de micélio e escleródios de *Rhizoctonia solani* tratados com *Trichoderma* spp, em restos de cultura de eucalipto. *Fitopatologia Brasileira*, 2005.

LARRALDE-CORONA, C.P. et al. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.80, n.1, p. 80-177, 2008.

LIMA, L.H.C., De Marco, J.L.; Queiroz, P.R., Ulhoa, C.J. & Felix, C.R. Método de purificação de uma endoquitinase de *Trichoderma harzianum* com atividade sobre a parede celular de fungos fitopatogênicos. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 32p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 11). 2001

LIMA, A. L. *Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de Trichoderma spp isolados de solo do cerrado brasileiro*. 73p. Tese (Doutorado). ICB / Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília. 2002

LORITO, M., Woo, S.L., Ambrosio, M.D., Harman, G.E., Hayes, C.K., Kubicek, C.P. & Scala, F. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9:206-213, 1996.

LU, Z., Tombolini, R., Woo, S., Zeilinger, S., Lorito, M. & Jansson, J.K. In vivo study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5): 3073-3080, 2004.

MARCHETTI, R., NIPOTI, P., D'ERCOLE, N. & GUERONI, M.E. Competition at atmosphere level as biocontrol mechanism in *Trichoderma* spp. *Petria*, 2: 137-47, 1992.

MCINTYRE M, MULLER C, DYNESEN J, NILESEN J. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 73: 103- 128. 2001

MISCHKE, S.: Evaluation of chromogenic substrates for measurement of protease production by biocontrol strains of *Trichoderma*. *Microbios* 87, 175–183. 1996.

MENDONÇA, E. G. *Propriedades bioquímicas e cinético-enzimáticas de cisteino-proteases do intestino médio de largata da soja*. 63p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG. 2008

MELLO, S.C.M., Melo, D.F. & Ávila, Z.R. de. Avaliação de pesticidas sobre o crescimento e esporulação de *Dycima pulvinata*, agente de biocontrole de *Microcyclus ulei*. Brasília: CENARGEN/EMBRAPA.. 8p. (Comunicado Técnico, 120). 2005

MONOD, M. et al.: Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int.J.Med.Microbiol.*292, 404-419. 2002

MONTEIRO, V.N. *Estudos bioquímicos da produção de -1,3-glucanases por isolados de Trichoderma spp.* 2001.60p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Goiás. Goiânia-GO. 2001

MONTEIRO, V.N. *Avaliação do perfil de proteínas secretadas pelo isolado de Trichoderma harzianum (ALL42) obtido do solo do Cerrado induzido por fitopatógenos.* 2008.86p. Dissertação (Doutorado). Universidade Federal de Goiás. Goiânia-GO. 2008

MUCHA, J et al. Synthesis of enzymes connected with mycoparasitism by ectomycorrhizal fungi. *Arch Microbiol.* v. 185 p. 69-77. 2006.

NAGARATHNAM, R.; RENGASAMY, A.; BALASUBRAMANIAN. Purification and proprieties of cistine proteases from rhizomes of *Curcuma longa* (Linn). *J Sci Food Agric*; 90: 97–105. 2010

NIHUS, K. J., A. T. WILBORN, and E. S. JACOBSON. Ferric iron reduction by *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 65:434–438. 1997

OLMEDO-MONFIL V, MENDONZA A, GOMEZ I, CORTEZ C, HERRERA-ESTRELLA A. *Mol. Gen. Genom.* 267: 703-712. 2002

PANNECOUCQUE, J. HOFTE M. Interactions between cauliflower and *Rhizoctonia anstomosis* groups with different levels of aggressiveness. *BMC Plant Biology*, 2009

PARMERTER J.R. WHITNEY, H.S. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. Berkeley. University of California, 1970

PARMERTER J.R, WHITNEY, H.S., PLATT, W.D. Affinities of some *Rhizoctonia* species that resemble mycelium of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopatology*, 1967.

POLETTI, I. MUNIZ, MFB, CECONI, D.E. SANTIN, D. WEBER, MND, BLUME, E. Zoneamento e identificacao de Fusarium spp, causador de podridao de raizes em plantios de erva-mate, Ciencia Florestal, 2006.

PAOLETTI M, CLAVE C, BEGUERET J. Gene 210: 45-52. 1998

POZO MJ, BAEK JM, GARCIA JM, KENERLEY CM. Fungal Genet. Biol. 41: 336-348. 2004

PUNJA, Z.K. & Utkhede, R.S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. Trends in Biotechnology, 21: 400-7, 2003.

RAMIREZ, I. S. et al. Trichoderma harzianum (Cepa A34): un biopreparado de amplio espectro para micopatologías del tomate y del pimiento. Habana: INISAV, (CID-INISAV Boletin Técnico, 4), 36p, 1995.

RAO, M. B.; APARNA, MT. GHATGE M. S; DESHPANGE V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62. 597-665. 1998.

ROMEIRO, R. S. Indução de resistência em plantas a patógenos. Viçosa Ed. UFV, (Caderno Didático no56), 45p, 1999

RUIZ-HERRERA, J. Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis, and Assembly Ed. CRC Press, 248 p. 1992

SAMUELS, G.J. Trichoderma: A review of biology and systematic of the fungus. Mycological Research, 100, 923-925, 1996.

SHARON, M. KUNINAGA, S. HYAKUMACHI, M. NAITO, S., SNEH, B. Classification of Rhizoctonia spp using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. Mycoscience, 2008

SCHIRMBOCK, M., Lorito, M., Wang, Y.L., Hayes, C.K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G.E. & Kubicek, C. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied Environmental Microbiology*, 60: 4363-70, 1994.

SCHUHMACHER R, STOPPACHER N, ZEILINGER S. Peptaibols of *Trichoderma atroviride*: screening, identification, and structure elucidation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 2007.

SENA, M P T. caracterização cinética da protease trombica presente no veneno de *bothrops leucurus*: leucurobina. Dissertacao de mestrado. UFMG, 2006.

SILVA, P.R.Q. da. Transformação de *Trichoderma harzianum* com os genes da proteína fluorescente verde e de resistência ao fungicida benomil. Tese de doutorado, Brasília, UnB, 130p., 2000

ŠIMKOVIC M, KURUCOVA A, HUNOVA M, VARECKA L. Induction of secretion of extracellular proteases from *Trichoderma viride*. *Acta Chimica Slovaca*, Vol.1, No. 1, 250 – 264. 2008

SMITH, V.L.; Wilcox, W.F. & Harman, G.E. Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology*, 80(9): 880-885, 1990.

SIVAN, A., CHET, I.: Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J Gen Microbiol* 135, 675–682. 1989.

SPIEGEL, Y.; CHET, I. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. *Integrated Pest Management Review*, v. 3, p. 169-175, 1998.

STEPANOV VM, RUDENSKAYA GN, GAIDA AV, OSTERMAN AL. J. Biochem. Biophys. Methods 5: 177-186. 1981

ST LEGER RJ, JOSHI L, ROBERTS DW . Microbiology 143: 1983-1992. 1997

SUÁREZ, M.B. et al. Characterization of genes encoding novel peptidases in biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413 using the TrichoEST funcional genomics approach. *Curr. Genet.*v.51. p. 331-342. April 2007.

SZEKERES, A.; KREDICS, L.; ANTAL, Z.; KEVEI, F.; MANCZINGER, L. Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*, . 215-222. 2004

THRANE, C.; Funck Jensen, D. & Tronsmo, A. Substrate colonization, strains competition, enzyme production *in vitro*, and biocontrol of *Pythium ultimum* by *Trichoderma* spp. Isolates P1 and T3. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 215-20, 2000.

THYS, R.C.S. Produção, caracterização, purificação e aplicação de uma protease produzida pelo microrganismo *Microbacterium SP-kr10*. 114p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS. 2004

TSENG, S.C., LIU, S.Y., YANG, H.H., LO, C.T., PENG, K.C.. Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in response to *Rhizoctonia solani*. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 56:6914-6922.2008.

ULHOA,C.J., PEBERDY, J.F. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microbial and Technology*, 1992.

ULLAH, M.A; KIM, K.S.; YU, Y.G. Purification and characterization of a serine protease from *Cucumis trigonus* Roxburghi. *Phytochemistry* 67. 870–875. 2006

VAZQUEZ-GARCIDUENAS, S., LEAL-MORALES, C. A., HERRERA-ESTRELLA, A.: Analysis of the b-1,3- glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol* 64, 1442–1446. 1998.

VERMELHO, A. B. et al. Enzimas proteolíticas: Aplicações Biotecnológicas. In: Elba P.S.Bon; Maria Antonieta Ferrara; Maria Luísa Corvo. *Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado*. Rio de Janeiro: Interciências Ltda, 2008.

VITERBO, A. et al., Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* ssp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie von Leewenhoek*. V. 81, p. 549-556. 2002.

WOSTEN HA, Bohlmann R, Eckerskorn C, Lottspeich F, Bolker M, Kahmann REMBO J. 15: 4274-4281.1996

WYSS, P., Boller, T.H. & Wiemken, A. Testing the effect of biological control agents on the formation of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 147: 159-62, 1992.

YEDIDIA, I., Srivastva, A.K., Kapulnik, Y. & Chet, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and growth of cucumber plants. *Plant and Soil*, 235: 235-242, 2001.

ZALDIVAR, M.; VELASQUEZ, J.C.; CONTRERAS, I.; PEREZ, L.M. *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*. Chile. 2001.