



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL GOIANO – CAMPUS URUTAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS

ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE CODIFICADOR DE UMA N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG1) DE *Trichoderma harzianum*

VANESSA MENDES

MESTRADO PROFISSIONAL

Urutaí - GO
2017

VANESSA MENDES

**ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE CODIFICADOR DE
UMA N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG1) DE
*Trichoderma harzianum***

Orientador: Profa. Dra. Pabline Marino Vieira

Dissertação apresentada ao Instituto Federal
Goiano – Campus Urutaí, como parte das
exigências do Programa de Pós- Graduação
em Proteção de Plantas para obtenção do
título de MESTRE.

Urutaí – GO
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/IF Goiano Campus Urutaí

M538a Mendes, Vanessa

Análise funcional do gene codificador de uma N-acetil- β -d-glicosaminidase (NAG1) de *Trichoderma harzianum* / Vanessa Mendes, -
- Urutaí: IF Goiano, 2017.

51 fls.

Orientador: Prof.^a Dra. Pabline Marino Vieira

**DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO
FEDERAL GOIANO CAMPUS URUTAÍ, 2017.**

1. Enzima quitinolítica. 2. Micoparasitismo. 3. Fitopatógeno. 4.
microscopia eletrônica de fluorescência 5. Parede celular. I. Título.

CDU 577

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

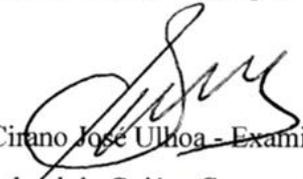
TÍTULO: “Análise funcional do gene codificador de uma N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG1) de *Trichoderma harzianum*”.

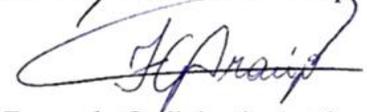
AUTORA: Vanessa Mendes

ORIENTADOR: Pabline Marinho Vieira

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM PROTEÇÃO DE PLANTAS**, pela comissão examinadora:


Prof.ª. Dra. Pabline Marinho Vieira – Presidente
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí


Prof. Dr. Cirano José Ulhoa - Examinador
Universidade Federal de Goiás – Campus Samambaia


Prof. Dr. Fernando Godinho de Araújo - Examinador
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí

Data da realização: 15 de maio de 2017.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao meu querido
avô Brás, com que recebi grande
exemplo de determinação, coragem,
amor e perseverança.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e minha família por todo apoio, suporte e incentivo ao longo da minha jornada acadêmica.

A minha orientadora Profa. Dra. Pabline Marinho Vieira, pelo estímulo científico e oportunidades oferecidas.

Aos Prof. Dr. Cirano José Ulhoa e Dr. Francisco Aragão, por me receberem em seus laboratórios com todo suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

A toda equipe dos laboratórios de Biotecnologia do Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí, Enzimologia da Universidade Federal de Goiás e Engenharia Genética EMBRAPA-CENARGEM, pelo bom convívio diário e colaborações.

Um agradecimento especial para, Profa. Dra. Valdirene Monteiro por sua amizade, conselhos e constante auxílio. Ao Dr. Giovanni Rodrigues Vianna e Jéssica Carrijo de Souza, pela colaboração e ensinamentos transmitidos. A querida Marcela Suriani, pela amizade, conselhos, apoio e assistência na parte experimental deste trabalho. A Dra. Muza do Carmo Vieira, pelas enriquecedoras conversas, conselhos quase maternos, carinho e amizade.

Aos queridos Theo, Marlene e Gabrielle Simão que me receberam de braços abertos em suas casas ao longo da minha estadia em Brasília e Goiânia.

Aos meus amigos que nunca estiveram ausentes, agradeço a amizade e carinho.

Ao Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí e a FAPEG, pelos auxílios prestados.

A todos citados e muitos não citados, um MUITO OBRIGADO por permitirem que esta dissertação seja uma realidade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE QUADROS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 Introdução.....	1
1.1 Prejuízos econômicos na agricultura causados por doenças fúngicas.....	1
1.2 <i>Trichoderma</i> como agente de controle biológico.....	2
1.3 <i>Trichoderma</i> e o sistema quitinolítico.....	3
1.4 Papel funcional de N-acetil- β -D-glicosaminidases (NAGases) no sistema quitinolítico.....	5
1.5 Transformação genética de <i>Trichoderma</i>	7
2 OBJETIVOS.....	9
2.1 Objetivo geral.....	9
2.2 Objetivos Específicos.....	9
3 METODOLOGIA.....	10
3.1 Manutenção dos fungos.....	10
3.2 Construção do vetor de superexpressão <i>pLTEF-nag</i> e transformação de genética de <i>T. harzianum</i> via biobalística.....	10
3.3 <i>Southern Blot</i>	12
3.4 Bioensaio de crescimento.....	12
3.5 Ensaio enzimático para detecção da atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAGase).....	12
3.6 Microcultivo em lâmina (técnica de Ridell modificada) e microscopia de fluorescência com <i>Calcofluor White</i> (CFW).....	13
3.7 Bioensaio de atividade antagonista sobre fitopatógenos.....	14
3.8 Análise da expressão de genes indicadores do micoparasitismo e síntese de parede celular por PCR em tempo real (RT-qPCR).....	14
3.9 Análise estatística.....	15
4. RESULTADOS.....	16
4.1 Construção do vetor <i>pLTEF-nag</i> e obtenção de transformantes de <i>T. harzianum</i>	16
4.2 Bioensaios de crescimento.....	18
4.3 Atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAGase) em <i>T. harzianum</i> selvagem (WT) e transformantes.....	19
4.4 Microscopia de fluorescência com <i>Calcofluor White</i> (CFW).....	20

4.5 Atividade antagonista sobre fitopatógenos.....	22
4.6 Análise da expressão de genes (RT-qPCR) indicadores do micoparasitismo e síntese de parede celular.....	24
5. DISCUSSÃO.....	27
6. CONCLUSÃO.....	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1: Representação esquemática da catálise enzimática da quitina, modificado de Sahai e Manocha (1993)	4
Figura 2. Esquema representativo da construção do vetor <i>pLTEF-nag</i>	12
Figura 3. A - Mapa do <i>pLTEF-nag</i> linearizado. B – Confirmação do vetor.....	16
Figura 4. A - Detecção dos transformantes de <i>T. harzianum</i> . B - Confirmação dos transformantes após seleção de esporo único. C - <i>Southern Blot</i>	17
Figura 5. Crescimento micelial médio de <i>T. harzianum</i> WT e transformantes ao longo do tempo de avaliação.....	18
Figura 6. Morfologia de <i>T. harzianum</i> WT e transformantes.....	19
Figura 7. Atividade de NAGase de <i>T. harzianum</i> WT e transformantes em glicose 1% e glicerol 1%.....	20
Figura 8. Análise microscópica das paredes celulares e hifas de <i>T. harzianum</i> WT e transformantes. A - WT (controle); B - transformante Thnag1. C - transformante Thnag2. D - transformante Thnag3.....	21
Figura 9. A - Espessura da parede celular de <i>T. harzianum</i> WT e transformantes. B. Largura das hifas de <i>T. harzianum</i> WT e transformantes.....	22
Figura 10. Bioensaios de antagonismo <i>in vitro</i> ao fitopatógeno <i>Fusarium moniliforme</i>	23
Figura 11. Bioensaios de antagonismo <i>in vitro</i> ao fitopatógeno <i>Rhizoctonia solani</i>	23
Figura 12. Bioensaios de antagonismo <i>in vitro</i> ao fitopatógeno <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	24
Figura 13. Análise de expressão gênica em linhagens de <i>T. harzianum</i> . A - Nível de expressão de <i>chit42</i> em WT e transformantes. B - Nível de expressão de <i>chit37</i> em WT e transformantes. C - Nível de expressão de <i>bgn13.1</i> em WT e transformantes. D - Nível de expressão de <i>quitina sintase</i> em WT e transformantes.....	25

LISTA DE QUADROS

	Páginas
Quadro 1. Enzimas quitinolíticas purificadas de <i>Trichoderma harzianu</i>	4 e 5
Quadro 2. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação de RT-PCR.....	15

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

BDA – Batata, dextrose e ágar

bgn13.1 - β -1, 3-glucanase

CFW - *Calcofluor White*

Ct - Cycle Threshold

FAPEG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás

GH - Glicosil hidrolases

GlcNAc - N-acetilglicosamina

JGI - *Joint Genome Institute*

NAGase - N-acetil- β -D-glicosaminidase

ORF- (*Open reading frame*) - Fase de leitura aberta

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PNP - p-nitrofenol

RT-qPCR – PCR quantitativo em tempo real

WT – *Trichoderma harzianum* selvagem

RESUMO

O sistema quitinolítico de *Trichoderma* spp. é composto pelas enzimas quitinases e N-acetil- β -D-glicosaminidases (NAGases). Estas podem estar relacionadas com processos de remodelação de parede celular fúngica e degradação da quitina de fitopatógenos durante o biocontrole. Neste trabalho foi realizada a clonagem do gene codificador de uma N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG1) e sua superexpressão em *Trichoderma harzianum*. Para isso, foi construído um vetor de superexpressão contendo o referido gene (*nag1*) sob controle de um promotor constitutivo e realizada a transformação genética de *T. harzianum* via biobalística. Três transformantes foram caracterizados em análises moleculares e atividade enzimática, sendo confirmadas a inserção do vetor e a expressão constitutiva do gene. Os bioensaios de crescimento revelaram que a superexpressão de *nag1* em *T. harzianum* reduziu o crescimento dos transformantes e atividade antagonista dos fitopatógenos *R. solani* e *S. sclerotium*. Em análise por microscopia eletrônica de fluorescência foi detectado que os transformantes contendo cópia única do gene apresentaram espessamento da parede celular e diminuição da largura das hifas. E ainda, a análise de expressão por PCR em tempo real revelou que os transformantes exibiram uma maior expressão dos genes de micoparasitismo, tanto em condições controle quanto em confronto com fitopatógeno. Dessa maneira, foi possível observar que a superexpressão de *nag1* interferiu no processo de remodelação de parede celular em *T. harzianum* e na atividade antagonista de fitopatógenos.

Palavras-chave: Enzima quitinolítica; Micoparasitismo; Fitopatógeno; Microscopia eletrônica de fluorescência; Parede celular.

ABSTRACT

The chitinolytic system of *Trichoderma* spp. is composed by the enzymes chitinases and N-acetyl- β -D-glucosaminidases (NAGases). These may be relate to processes of fungal cell wall remodeling and phytopathogenic chitin degradation during biocontrol. In this work was performed the cloning of the gene encoding an N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG1) and its overexpression in *Trichoderma harzianum*. For this, an overexpression vector containing the gene (NAG1) was construct under the control of a constitutive promoter and was performed the genetic transformation of *T. harzianum* via biobalistic. Three transformants were characterize in molecular analyses and enzymatic activity, confirming the insertion of the vector and the constitutive expression of the gene. Growth bioassays revealed that NAG1 overexpression in *T. harzianum* reduced the growth of the transformants and antagonistic activity of the phytopathogens *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotirum*. Fluorescence microscopy analysis revealed that transformants containing single copy of the gene showed thickening of the cell wall and decreased hyphae width. Furthermore, the expression analysis by real-time PCR revealed that the transformants exhibited a greater expression of mycoparasitism genes, both under control and in phytopathogenic conditions. Thus, it was possible to observe that the overexpression of NAG1 interfered the *T. harzianum* cellular wall remodeling process and in phytopathogen antagonist activity.

Key words: Chitinolytic enzyme; Mycoparasitism; Phytopathogen; Fluorescence electron microscopy; Cell wall.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Prejuízos econômicos na agricultura causados por doenças fúngicas

Os fungos fitopatogênicos são responsáveis por grandes prejuízos à produção agrícola mundial, resultando em redução da qualidade e da produção de alimentos. Dentre os fungos patogênicos causadores de doenças severas, destacam-se os gêneros *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Pythium* e *Botrytis* (YU et al., 2015; GHAG et al., 2014). Estes são responsáveis, por danos em várias culturas de interesse econômico, tais como: soja, feijão, milho, trigo, algumas hortaliças e fruteiras (PRANEETVATAKUL et al., 2013).

Estes fungos patogênicos apresentam alta capacidade reprodutiva, bem como, estruturas de resistência como esporos e escleródios, essenciais para sua sobrevivência, propagação e difusão. Tais características são entraves que dificultam o controle destes patógenos no campo (GLIESSMAN, 2014; PRASAD et al., 2013). Dessa forma, a principal estratégia de controle mundialmente utilizada, ainda é a aplicação de fungicidas químicos (DELONGE; MILES; CARLISLE, 2016; LÓPEZ-MONDÉJAR; ROS; PASCUAL, 2011).

A aplicação de fungicidas comerciais, apesar de eficiente, é um processo oneroso, conduz à seleção de fitopatógenos resistentes e favorece o surgimento de pragas secundárias (CARVALHO et al., 2015). Além disso, os produtos químicos utilizados são tóxicos e poluentes, impactam o meio ambiente e comprometem a saúde dos produtores agrícolas e consumidores (DUDLEY et al., 2017). Outra desvantagem no uso de fungicidas está relacionada à inespecificidade destes, que eliminam microrganismos benéficos e assim, aumentam a suscetibilidade dos cultivares aos patógenos (TOMASETTO et al., 2017; CARVALHO et al., 2015).

As pressões impostas pelas leis de impacto ambiental e a crescente preocupação da população com meio ambiente e saúde foram responsáveis pela demanda por estratégias de controle com ações mais específicas e menores danos (DELONGE; MILES; CARLISLE, 2016). Nesse sentido, novas alternativas já são utilizadas, como o controle biológico, que se baseia no uso de microrganismos antagonistas (VOS et al., 2014). Este controle pode ser direto quando os antagonistas são aplicados vivos nas culturas, ou indireto, através da aplicação de outras moléculas bioativas (CARVALHO et al., 2015; PRANEETVATAKUL et al., 2013). Dessa forma, agentes biocontroladores representam uma valiosa estratégia para combate de

patógenos e redução do uso de produtos químicos na agricultura (TOMASETTO et al., 2017; YUAN et al., 2016).

1.2 *Trichoderma* como agente de controle biológico

O uso de microrganismos biocontroladores que atuam na defesa de plantas em seu próprio *habitat* é uma alternativa promissora para o controle de fungos patogênicos e outras pragas (NICOLÁS et al., 2014). Nesse sentido, diversos gêneros de bactérias e fungos são intensamente estudados como agentes de controle biológico (MALLIKHARJUNA RAO; SIVA RAJU; RAVISANKAR, 2016). Dentre esses microrganismos, os fungos filamentosos apresentam como vantagem um mecanismo especializado de infecção, através da penetração ativa nos hospedeiros e parasitismo (MUKHERJEE, et al., 2013; LÓPEZ-MONDÉJAR; ROS; PASCUAL, 2011).

Os fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* compreendem um grupo de saprófitas e micoparasitas, capazes de utilizar diferentes compostos como fonte de carbono e nitrogênio (DARYAEI et al., 2016). As espécies deste gênero possuem como características um rápido crescimento, resistência a metabólitos e tolerância a diferentes tipos fungicidas (HAN et al., 2016). Essas características tornam os fungos desse gênero agentes antagonistas capazes de competir, colonizar e proteger plantas hospedeiras contra o ataque de fitopatógenos (HARTL; ZACH; SEIDL-SEIBOTH, 2012).

Nesse sentido, espécies de *Trichoderma* correspondem a 90% dos agentes de controle biológicos empregados em campo contra doenças de origem fúngica, bacteriana e nematoides (SARAVANAKUMAR et al., 2016; YOUSSEF; TARTOURA; ABDELRAOUF, 2016). E ainda, a espécie *Trichoderma harzianum* corresponde à maioria dos formulados comercializados e utilizados mundialmente no biocontrole de fungos patogênicos (YUAN et al., 2016; PRANEETVATAKUL et al., 2013)

A eficiência antagonista de *T. harzianum* combina alguns mecanismos tais como: competição por nutrientes; produção de metabólitos antimicrobianos e fungistáticos; micoparasitismo e indução de mecanismos de defesa em plantas (ZEILINGER et al., 2016; DE JAEGER et al., 2011; MONTEIRO et al., 2010). No entanto, o micoparasitismo é o principal mecanismo de ação realizado pelo *T. harzianum*, sendo o processo mais estudado por estar

relacionado com seleção de linhagens de agentes biocontroladores (DRUZHININA et al., 2011).

O mecanismo de micoparasitismo é caracterizado pelo crescimento do *T. harzianum* em direção ao fitopatógeno, reconhecimento e interação das hifas, seguidos da secreção de uma série de enzimas líticas que degradam a parede celular, limitando o crescimento e atividade dos fungos patogênicos (STEINDORFF et al., 2012; DRUZHININA, 2011). Durante esse processo, as enzimas líticas são liberadas de acordo com a composição da parede celular dos fitopatógenos, que são ricas em quitinas, glucanas e outras proteínas (FREE, 2013; ORLEAN, 2012).

Nesse sentido, glucanases, enzimas quitinolíticas e proteases têm papel significativo no biocontrole de fitopatógenos por espécies de *Trichoderma* (KUBICEK et al., 2015; DAGUERRE et al., 2014). Por isso, a caracterização dessas enzimas é de extrema importância para a compreender o processo de biocontrole, bem como, selecionar novas linhagens para bioprodutos com aplicação agrícola (LATGÉ, 2010).

1.3 *Trichoderma* e o sistema quitinolítico

O sistema quitinolítico é o grupo mais bem estudado de enzimas líticas de parede celular em *Trichoderma* spp., pois estão relacionadas a processos celulares de crescimento, autólise, remodelação, síntese de parede celular e degradação de paredes de fitopatógenos (HAN et al., 2016; YAO et al., 2016; KARTHIK et al., 2014). As enzimas quitinolíticas coordenam a degradação total de quitina, principal constituinte da parede celular de fungos (GRUBER; SEIDL-SEIBOTH, 2012). Este polímero é formado por unidades de N-acetilglicosamina (GlcNAc) unidas por ligações tipo β -1,4 (PATEL; GOYAL, 2017).

As enzimas quitinolíticas são classificadas com base no seu mecanismo de ação durante a hidrólise de quitina (SAIPRASAD et al., 2009). Dessa forma, endoquitinases (EC 3.2.1.14) clivam ligações glicosídicas aleatoriamente em locais internos do polímero de quitina, originando oligômeros de baixo peso molecular, como: quitotetraoses, quitotrioses e diacetilquitobioses. Já as exoquitinases (EC 3.2.1.14) clivam a cadeia de quitina, a partir da extremidade não redutora e liberam diacetilquitobioses. Posteriormente, N-acetil- β -D-glicosaminidases (EC 3.2.1.52) clivam oligômeros produzidos pela atividade de endo e

exoquitinases em monômeros de GlcNAc (Figura 1) (LANGNER; GÖHRE, 2016; HARTL; ZACH; SEIDL-SEIBOTH, 2012).

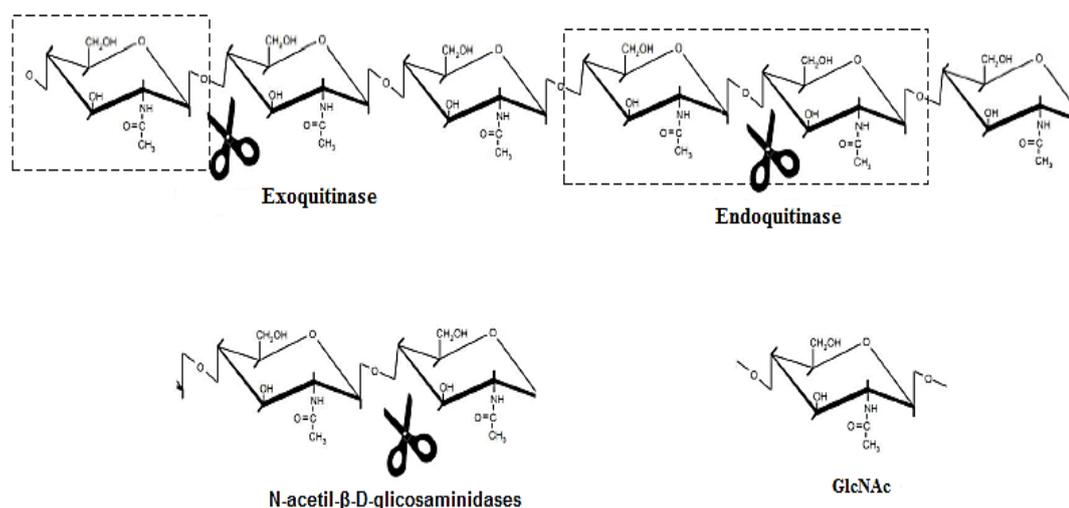


Figura 1: Representação esquemática da catálise enzimática da quitina, modificado de Sahai e Manocha (1993).

As quitinases e N-acetil-β-D-glicosaminidases (NAGases) do sistema quitinolítico de *Trichoderma* spp. são glicosil hidrolases (GH) pertencentes as famílias 18 e 20 (BAZAFKAN; TISCH; SCHMOLL, 2014). A família GH18 é evolutivamente diversa compreendendo as quitinases de bactérias, fungos, vírus, animais e algumas quitinases de plantas (SEIDL, 2008). Já a família GH20 inclui as NAGases de bactérias, fungos, estreptomicetos e humanos (KOPPARAPU et al., 2013). O sistema quitinolítico de *Trichoderma* spp. pode conter mais de seis enzimas hidrolíticas de quitina, sendo estas: duas NAGases e várias quitinases (LANGNER; GÖHRE, 2016; DAGUERRE et al., 2014). Em *T. harzianum* foram descritas duas NAGases e oito quitinases constituintes do sistema quitinolítico, apresentada no Quadro 1.

Quadro 1. Enzimas quitinolíticas purificadas de *Trichoderma harzianum*.

ENZIMA	GENE	ATIVIDADE	REFERÊNCIA
CHIT102	NI	NAGase	Ulhoa e Peberdy (1991)
CHIT73	NI	NAGase	Haran et al.(1995)

CHIT40	<i>chit40</i>	Exoquitinase	Harman et al. (1993) continua
CHIT52	NI	Endoquitinase	Haran et al. (1995)
CHIT42	<i>chit42</i>	Endoquitinase	Ulhoa e Peberdy (1992)
CHIT36	<i>chit36</i>	Endoquitinase	Viterbo et al. (2002)
CHIT37	<i>chit37</i>	Endoquitinase	De La Cruz et al. (1992)
CHIT31	<i>chit31</i>	Endoquitinase	De La Cruz et al. (1992)
CHIT33	<i>chit33</i>	Endoquitinase	De La Cruz et al. (1992)
CHIT46	<i>chit46</i>	Endoquitinase	Lima et al. (1997)

Quadro 1, Cont.

NI – Não identificado

Devido ao fato do genoma *Trichoderma* spp. abrigar um número muito maior de quitinases, essas têm sido intensamente investigadas (SAIPRASAD et al., 2009). Nesse sentido, muitos genes codificadores da quitinases foram clonados e avaliados quanto a participação na atividade antagonista de diferentes patógenos de plantas (SEIDL, 2008; ZAMANI; MOTALLEBI, 2008; BOER et al., 2007). Dessa forma, o volume de trabalhos na literatura concentra-se em quitinases especializadas no micoparasitismo, enquanto caracterização de NAGases encontra-se limitado a estudos físico-químicos (SLÁMOVÁ et al., 2010; RAMOT et al., 2004).

1.4 Papel funcional de N-acetil- β -D-glicosaminidases (NAGases) no sistema quitinolítico

Enzimas NAGases, também conhecidas como hexosaminidases ou quitobiosidases, atuam no sistema quitinolítico catalisando a liberação de monômeros de N-acetilglicosamina (GlcNAc) durante a hidrólise de quitina (CHEN et al., 2015). Algumas NAGases de fungos foram caracterizadas, apresentando massa molecular variável entre 27 a 190 kDa, ponto isoelétrico (pI) de 3 a 8 e atividade ótima em pH de 4 a 7 (TAYLOR et al., 2002; PETERBAUER et al., 1996; HARMAN et al., 1993; ULHOA; PEBERDY, 1993).

A maioria das espécies de *Trichoderma* apresenta dois genes codificadores de NAGases em seu sistema quitinolítico (DAGUERRE et al., 2014). Ulhoa e Peberdy (1991), descreveram uma quitobiosidase de *T. harzianum* com massa molecular de 64 kDa (determinada por gel

filtração), atividade enzimática ótima em pH 5,5 e temperatura de 50°C. Além disso, a síntese dessa NAGase foi observada em presença de quitina e N-acetilglicosamina (GlcNAc), além de reprimida em concentrações crescentes de glicose e GlcNAc (ULHOA; PEBERDY, 1993).

Outros compostos foram relatados como reguladores da síntese de NAGases em *Trichoderma spp.*, sendo elas α -glucanas como, glicogênio, dextrina e maltotriose, e vários oligossacarídeos, particularmente aqueles contendo D-galactose (SEIDL; DRUZHININA; KUBICEK, 2006). Em contraste, essa síntese pode ser reprimida por compostos como: glicose, GlcNAc e glicosamina. Dessa forma, a produção de NAGases em *Trichoderma* está sujeita a induções e repressões catabólicas (SLÁMOVÁ et al., 2010). Silva et al. (2004) apontam uma regulação a nível transcricional da síntese de NAGases em *T. harzianum*, em que aumentos dos níveis intracelulares de AMPc, induzidos por moduladores como cafeína, tetrafluoreto de alumínio e dinitrofenol, podem reprimir a expressão gênica de NAGases. Nesse sentido, progressos importantes foram realizados sobre a regulação e expressão de NAGases em espécies de *Trichoderma* (BRUNNER et al., 2003; PETERBAUER et al., 2002; ULHOA et al., 2001)

Estudos apontam que enzimas hidrolisantes de quitina, incluindo NAGases, podem estar relacionadas com o desenvolvimento de células fúngicas, autólise, destruição de patógenos, síntese e remodelação de paredes celulares (LANGNER; GÖHRE, 2016; GRUBER; SEIDL-SEIBOTH, 2012; ROGG et al., 2012; SLÁMOVÁ et al., 2010). Nesse sentido, foi proposto um modelo bioquímico para a função de NAGases no crescimento e síntese de parede celular em fungos (HORSCH et al., 1997). Neste modelo, NAGases compõem um complexo integrado com quitinases e sintases, disponibilizando o produto final da degradação de quitina na forma de monômeros de N-acetilglicosamina (GlcNAc). Este monômero induz a expressão de quitinases especializadas na remodelação de paredes e ativam por modulação alostérica sintases de quitina (HORSCH et al., 1997).

Em seguida, estas quitina sintases catalisam a formação das cadeias de quitina a partir de UDP-N-acetilglicosamina, em que cada unidade é adicionada a extremidade do novo polímero nascente (CABIB; ARROYO, 2013). Logo, estas cadeias são ligadas covalentemente com glucanas por ação de quitinases especializadas, processo conhecido como reticulação, e assim originam uma nova parede celular. Dessa forma, NAGases apresentam um papel como mediadoras da hidrólise e síntese de quitina durante o crescimento de fungos (ROGG et al., 2012; HORSCH et al., 1997).

Alguns trabalhos sugerem a participação de NAGases no biocontrole de fitopatógenos, através da liberação de indutores dos genes do micoparasitismo (DUBEY et al., 2012; HARTL; ZACH; SEIDL-SEIBOTH, 2012). E ainda, trabalhos de análise de expressão identificaram as NAGases como diferencialmente expressas em *T. harzianum* em cultivos com parede celulares de patógenos (STEINDORFF et al., 2012, 2014).

Com intuito de compreender a participação de NAGases nestes processos, genes codificadores dessas enzimas já foram clonados e caracterizados funcionalmente em *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma hamatum* (RYDER et al., 2012; CHEN et al., 2015; RAMOT et al., 2004; PETERBAUER et al., 2002). A partir desses estudos, foi possível analisar um envolvimento de NAGases no micoparasitismo e reciclagem da parede celular fúngica durante a inanição. Além disso, NAGases foram essenciais para o metabolismo de quitina e outras fontes de carbono como nutrientes (RYDER et al., 2012; LÓPEZ-MONDÉJAR et al., 2009; PETERBAUER et al., 2002).

Entretanto, o uso das ferramentas moleculares para caracterização de NAGases em *T. harzianum* é pouco explorada. Assim como, NAGases não foram estudadas na mesma proporção que quitinases especializadas no micoparasitismo desse fungo. Dessa forma, a transformação genética de *T. harzianum* surge como uma excelente ferramenta para análise funcional de NAGase.

1.5 Transformação genética de *Trichoderma*

Ao longo dos últimos anos, a transformação genética têm sido uma ferramenta indispensável para caracterização funcional de genes de interesse biotecnológico (KARTHIK et al., 2014; DUBEY et al., 2012; KIM et al., 2002). Nesse sentido, a disponibilização do genomas de espécies *Trichoderma* tem permitido a análise funcional de genes envolvidos no biocontrole e outros processos biológicos (KUBICEK et al., 2011; MASSART; JIJAKLI, 2007).

As propostas úteis para essa análise funcional de genes, incluem deleção, silenciamento e superexpressão da transcrição do gene alvo (GHAG; SHEKHAWAT; GANAPATHI, 2014; HERMOSA et al., 2011). A ferramenta de superexpressão baseia-se na construção de vetores em que a sequência do gene de interesse é flanqueada por promotor e terminador, para obtenção

de um gene expresso constitutivamente ou altamente expresso em uma determinada condição (CHEN et al., 2015; NICOLÁS et al., 2014). Já as técnicas de transformação genética utilizadas incluem: biobalística, PEG (polietilenoglicol), eletroporação e transformação via *Agrobacterium* (MASSART; JIJAKLI, 2007).

O uso das ferramentas moleculares permitem comparar propriedades de biocontrole dos transformantes com as do fungo selvagem, observar resultados diretos confrontando o organismo transformado e o patógeno, detectar alterações morfológicas e também medir atividades enzimáticas em caldos de cultura (SHARMA et al., 2016; KARTHIK et al., 2014). Dentro dessa abordagem, a transformação genética de *T. harzianum* com um vetor de superexpressão, representa uma estratégia inovadora para caracterização funcional da N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG1).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Clonar e caracterizar funcionalmente o gene codificador de uma N-acetil- β -D-glicosaminidase (*nag1*) de *T. harzianum*.

2.2 Objetivos Específicos

- Construir um vetor de superexpressão do gene *nag1*, identificado durante o biocontrole de *T. harzianum*;
- Realizar a transformação genética de *T. harzianum* e selecionar os transformantes positivos;
- Avaliar o crescimento dos fungos transformados
- Avaliar a atividade enzimática de NAGase;
- Avaliar estruturas microscópicas (parede celular e hifas) dos transformantes;
- Avaliar a atividade antagonista dos transformantes;
- Avaliar a expressão de genes do micoparasitismo e da síntese de parede celular nos transformantes superexpressando *nag1*.

3 METODOLOGIA

3.1 Manutenção dos fungos

Trichoderma harzianum (ALL42) da coleção do Laboratório de Enzimologia (UFG/ICBII) e os fitopatógenos *Fusarium moniliforme*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani* (EMBRAPA-ARROZ/FEIJÃO) foram mantidos em 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 28°C no laboratório de Biotecnologia (Labiotec) do Instituto Federal Goiano (IFG) – Campus Urutaí.

3.2 Construção do vetor de superexpressão *pLTEF-nag* e transformação de genética de *T. harzianum* via biobalística

O gene *nag1* foi sintetizado quimicamente pela Epoch Life Science Inc. (Sugar Land, TX, USA), de acordo com a sequência codificadora da NAGase de *T. harzianum* disponível no *Joint Genome Institute* JGI (ID76397) e na base de dados *Genbank* (AAB47060.1). A sequência sem íntrons foi mutagenizada com códons preferenciais de *Arabidopsis* e possui uma ORF (*open reading frame*) de 1738 pb. Para construção do vetor de superexpressão *pLTEF-nag*, a sequência foi amplificada com os *primers* Over NAG_F' (5'-TCTTTATCGATATGGGACCTAAGGCTATTATTGC-3'), Over NAG_R' (5'-TTCTTCCTGCAGGCTCAAAAAGTGTACAAGCTGTAG-3') e inserida no plasmídeo pLHhph1-tef1 (AKEL *et al.*, 2009), previamente linearizado com as enzimas de restrição SdaI/ClaI, sob controle do promotor constitutivo *tef-1 α* .

Para confirmar a clonagem do gene no vetor este foi digerido com a endonuclease EcoR1, e o perfil de bandas obtidos analisados em gel de agarose 1%. A estratégia para a construção do vetor é apresentada na Figura 2.

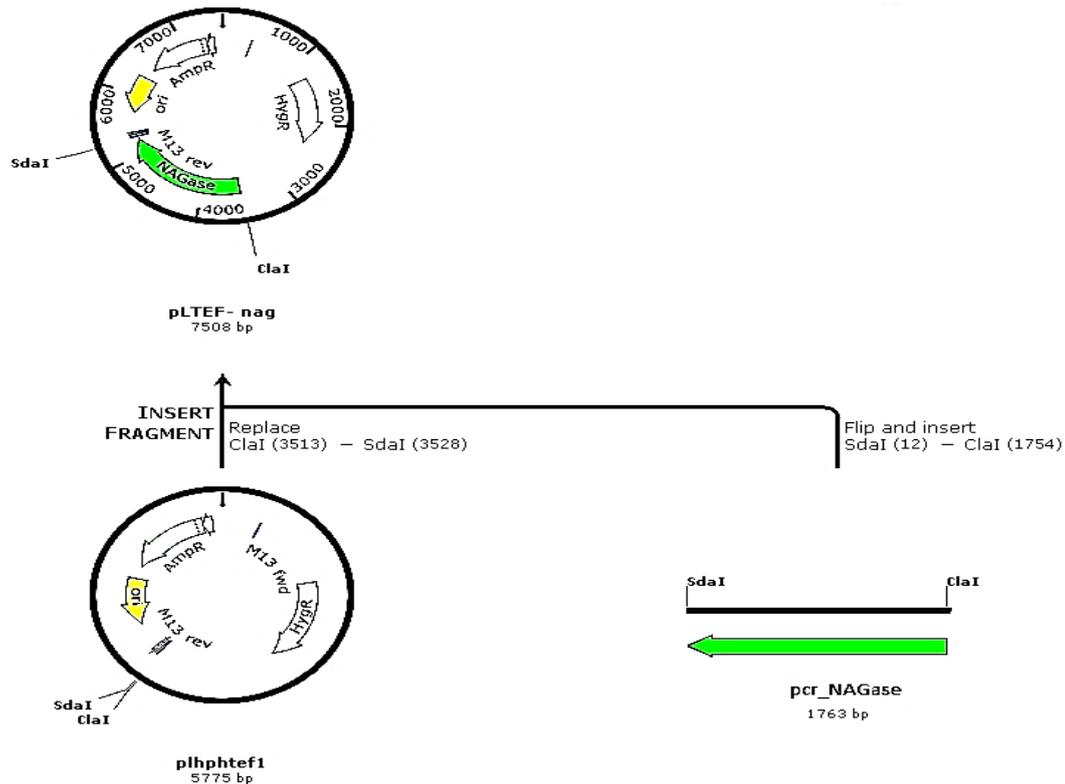


Figura 2. Esquema representativo da construção do vetor *pLTEF-nag*. Fonte: *SnapGene*.

Para a transformação genética de *T. harzianum* ALL42, placas contendo meio BDA (batata 20%, glicose 2% e ágar 2%) foram inoculadas com 100 μ L de uma solução de esporos (cerca de 10^7 esporos) e deixadas secar por 15 minutos. Em seguida, as placas foram posicionadas sobre aparelho de alta pressão de gás hélio e submetidas ao bombardeamento de micropartículas de tungstênio M5 (recobertas com 10 μ g do vetor *pLTEF-nag*), sendo estas preparadas de acordo com Aragão et al. (1996). As placas da transformação foram incubadas a 28°C por 24 horas e, posteriormente, recobertas com o agente seletivo higromicina (100 μ g/mL).

Cada transformante obtido foi isolado em uma placa contendo agente seletivo, e confirmado como positivo utilizando *primers* que se alinham dentro da sequência codificadora da *NAGase* *Nag F'* (5'-CTGCTAACGCTCTTTGGCCT-3') e *Nag R'* (5'-TCCAGCAAGATCAGCAGGTG-3'). No intuito de checar a estabilidade do gene e purificar os transformantes positivos, três etapas de alternância de conídios foram realizadas em meio (BDA - 0.1% Triton X-100/higromicina), seguidas de isolamento de esporo único em meio (BDA/higromicina). Logo após essas etapas, os fungos foram validados novamente com

primers para o gene *nagI* (Nag F' e Nag R') e para o vetor TEF-hyg F' (5'-CGAAGTCCGGCACCTCGTG-3') e TEF-hyg R' (5'-GAAGGGTGC GACTTGCCAGAAATTC-3'). Os experimentos de construção do vetor *pLTEF-nag*, transformação genética, seleção e análises moleculares dos transformantes de *T. harzianum* foram realizados no laboratório de Engenharia Genética da EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEM).

3.3 Southern Blot

A metodologia de *Southern Blot* foi realizada, de acordo com Romano e Viana (2015), com algumas modificações. Primeiramente, 10 µg dos DNAs dos fungos transformados e *T. harzianum* tipo selvagem (WT) foram digeridos com a endonuclease XhoI (37°C; *overnight*), e submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% (*overnight*; 20 v). Após a eletroforese, os DNAs foram despurinados (HCl 0,2 M por 10 minutos), desnaturados (NaOH 0,5 M por 15 minutos) e neutralizados (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M pH 7,2; EDTA 1 mM por 30 minutos). Em seguida, os DNAs foram transferidos *overnight* para uma membrana de Nylon em solução (*UltraPure*TM 20X SSC), e fixados utilizando o sistema *Ultraviolet Crosslinker* (por 12 segundos). A membrana foi hibridizada com uma sonda de 358 pb específica para marca de seleção do vetor (higromicina), e marcada com [α -P32] dATP.

3.4 Bioensaio de crescimento

Para os bioensaios de crescimento, plugues contendo micélio dos fungos foram crescidos em placas contendo meio MYG. Estas placas foram incubadas a temperatura de 28°C e o crescimento radial do micélio foi observado nos tempos de 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. Todos os experimentos foram realizado em triplicatas biológicas.

3.5 Ensaio enzimático para detecção da atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAGase)

Esporos (1×10^7) de *T. harzianum* WT e dos transformantes foram inoculados em *erlenmeyers* de 125 mL contendo 50 mL de meio TLE (CaCl₂ 0,1gL⁻¹, KH₂PO₄ 7,0 g L⁻¹, K₂HPO₄ 2,0 gL⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 0,1 gL⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,1 gL⁻¹, bactopectona 1 gL⁻¹, 0,1 mL da

solução de elementos traços). Essas culturas, em meio TLE foram suplementadas com as fontes de carbono glicose 1% e glicerol 1%. Os frascos foram incubados em agitador rotatório (28°C; 180 rpm por 48 horas). Em seguida, os sobrenadantes foram separados dos micélios em sistema de filtração a vácuo, aliquotados em volumes variados e armazenados a -80°C. Para a atividade de NAGase utilizou-se a metodologia descrita por Ulhoa e Peberdy (1993).

A atividade foi determinada pela liberação de p-nitrofenol (PNP) do substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminide (pNP-GlcNAc - Sigma). Para isso, 10 μL de amostra foram incubados com 100 μL de tampão acetato de sódio (50 mM pH 5,5) e 40 μL do substrato pNP-GlcNAc (5 mM), a 37 °C por 15 minutos em um termociclador. A reação foi parada com a adição de 100 μL de NaOH (0,1 M). Em seguida, os volumes de reação foram transferidos para uma placa de ELISA e a absorbância obtida a 405 nm em um leitor de microplacas. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para a produção de 1 μmol de (PNP), por minuto de reação.

3.6 Microcultivo em lâmina (técnica de Ridell modificada) e microscopia de fluorescência com *Calcofluor White* (CFW)

A técnica de microcultivo consiste em utilizar lâminas como suporte para pequenos blocos de ágar MEX (3% de extrato de malte e 2% de ágar), acondicionados no interior de placas de *Petri*. Esporos dos fungos selvagem e transformantes foram inoculados nas extremidades desses microcultivos, recobertos com lamínulas e incubados a temperatura de 28°C por sete dias. A técnica empregada permite a caracterização e comparação entre *T. harzianum* WT e os transformantes, através da visualização integrada das estruturas filamentosas (hifas) e parede celular. Após crescimento dos fungos, as lamínulas foram vertidas sobre lâminas de microscopia contendo uma solução de *Calcofluor White* (0,01% - Sigma®) que cora o polissacarídeo quitina, permitindo assim a visualização das estruturas celulares desses microrganismos (RYDER et al., 2012). As lamínulas coradas foram analisadas na objetiva de (100x) em microscópio de fluorescência (Olympus - BX63). Após a aquisição das imagens, a espessura de parede celular e largura das hifas foram obtidas através da intensidade de fluorescência emitida. As medidas foram realizadas no programa *Image-Pro Plus 6.0*, com n= 46 para cada linhagem avaliada.

3.7 Bioensaio de atividade antagonista sobre fitopatógenos

A atividade antagonista dos transformantes foi avaliada pelo método de culturas pareadas, conforme descritos por Mello et al. (2007). Plugues de ágar contendo micélio dos fungos antagonistas e dos fitopatógenos (*S. sclerotiorum*, *R. solani* e *F. moniliforme*) foram retirados de colônias após três dias de cultivo, e depositados simultaneamente em extremidades opostas das placas contendo meio (MYG) solidificado. As placas foram expostas a temperatura de 28°C e fotoperíodo de 12 horas. O crescimento dos antagonistas e dos patógenos foram avaliados durante sete dias consecutivos.

3.8 Análise da expressão de genes indicadores do micoparasitismo e síntese de parede celular por PCR em tempo real (RT-qPCR)

Foram extraídos RNAs de *T. harzianum* WT e dos fungos transformados durante o crescimento isolado dos fungos (condição controle) em placa contendo meio MYG, e após o estágio de contato com o patógeno *S. sclerotiorum*. Alíquotas de 5 µg de RNA total foram tratadas com (DNase I), segundo as recomendações do fabricante (Sigma - Aldrich). Após o tratamento, cada alíquota de RNA foi submetida à transcrição reversa em cDNA na presença de oligo(dT) e da enzima (SuperScript III - Reverse Transcriptase), conforme especificações do fabricante (Invitrogen). As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o sistema iQ5 Real Time PCR (BioRad). Cada reação (20 µL), continha MAXIMA® SYBR-green (PCR Master mix - Fermentas), *primers* iniciadores 5' e 3' (500 nM 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 (40 ciclos). Foi feita, também, a curva de anelamento nas seguintes condições: 1 minuto a 95°C, seguida por 30 segundos a 55°C e uma rampa final a 95°C com a coleta contínua de dados (1 ciclo) para observação da formação de dímeros de *primers* e amplificação inespecífica. O transcrito de β -actina (HS576338) foi usado como controle endógeno e normalizador da expressão em cada reação. Cada ensaio foi realizado em triplicata. O nível de expressão absoluta dos genes foi calculado, de acordo com o Ct pelo método Δ Ct (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Os *primers* utilizados nas reações de qRT-PCR, pertencem ao banco de dados do *T. harzianum* (ALL42) da biblioteca de cDNA do Laboratório de Enzimologia (UFG) e estão listados no Quadro 2.

Quadro 2. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação de RT-PCR

GENES	PRIMERS PARA RT-PCR (5' TO 3')	
	SENDO	ANTISENDO
<i>bgn13.1</i>	TCAACATCGCCAACGTCAACGAC	TGCCAATACGGGAACCAGTGATC
<i>quitina sintase</i>	GGCTATAGGCGTTATCCTCATC	CCAGACCATGGCCGAATAAA
<i>chit42</i>	AAGGGTTACTACAGCTACAACGCC	ACTTGAGGTAGGCAACCTTGGTGT
<i>chit37</i>	TGTCCACGTCGCAGGCCAAC	TGCCACCTGTCACATACGCCG
<i>β-actina</i>	CGACAATGGTTCCGGTATGTGCAA	ACGTAGGAGTCCTTCTGACCCATA

3.9 Análise estatística

Para análise dos dados obtidos, inicialmente estes foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) com auxílio do *software* estatístico *Assistat*, constatada uma diferença significativa foram aplicados os testes de média. Em que, o teste de Tukey ($\alpha = 1\%$) foi empregado para comparar as médias da atividade de NAGase de *T. harzianum* WT e transformantes. Enquanto, o teste de Dunnett ($\alpha = 1\%$) foi aplicado para comparar médias de espessura de parede celular, largura das hifas, crescimento isolado, antagonismo e expressão dos genes em tempo real de *T. harzianum* WT e transformantes.

4. RESULTADOS

4.1 Construção do vetor *pLTEF-nag* e obtenção de transformantes de *T. harzianum*.

A sequência do gene codificador da NAGase de *T. harzianum* apresenta 1738 pb, ausência dos íntrons e códons otimizados para clonagem. Essa sequência foi comparada quanto a sua homologia com proteínas de outros fungos, segundo a ferramenta *Blastx*. Foram observadas identidades com: *Trichoderma saturnisporum* (99%), *Trichoderma virens* (90%), *Trichoderma reesei* (88%), *Trichoderma atroviride* (86%) e *Fusarium oxysporum* (62%). Além disso, a sequência codificadora da NAGase apresentou 100% de identidade com N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG1), codificada pelo gene *nag1* de *T. harzianum*, sob número de acesso (AAB47060.1) no *Gebank*.

Para a construção do vetor *pLTEF-nag*, a sequência codificadora da NAGase foi clonada no plasmídeo pLHhph1-tef1, sob controle do promotor constitutivo *tef-1 α* . O mapa do vetor linearizado é apresentado na (Figura 3 A). O padrão de bandas obtidos da digestão de *pLTEF-nag* com a enzima *EcoRI* confirmaram a clonagem e construção do vetor de superexpressão (Figura 3 B).

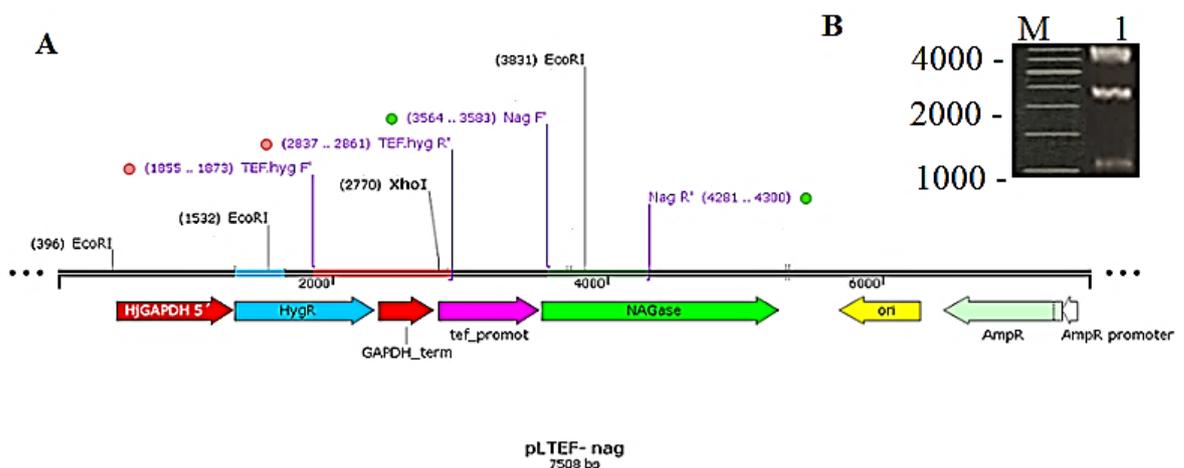


Figura 3. A - Mapa do *pLTEF-nag* linearizado. O vetor contém, além da sequência codificadora da NAGase, o gene (*hph*) marcador seletivo de resistência a higromicina (HygR), sob controle do promotor constitutivo *tef-1 α* . As enzimas de restrição (*EcoRI* e *XhoI*) e os *primers* utilizados nas análises moleculares estão representados no mapa. Fonte: *SnapGene*. **B - Confirmação do vetor.** M - Marcador molecular 1 kb plus. Os produtos da digestão são

apresentadas na linha 1. As bandas obtidas (1136, 2299 e 4073 pb) comprovam a clonagem da sequência codificadora da NAGase, assim como a construção de *pLTEF-nag* (7508 pb).

O plasmídeo *pLTEF-nag* foi utilizado para a transformação genética de *T. harzianum* via biobalística. Dentre os transformantes obtidos em meio seletivo, seis foram confirmados como positivos para o gene *nagI* codificador da NAGase (Figura 4 A). Após três etapas de alternância de conídios em meio contendo agente seletivo, todos os transformantes apresentaram estabilidade do gene.

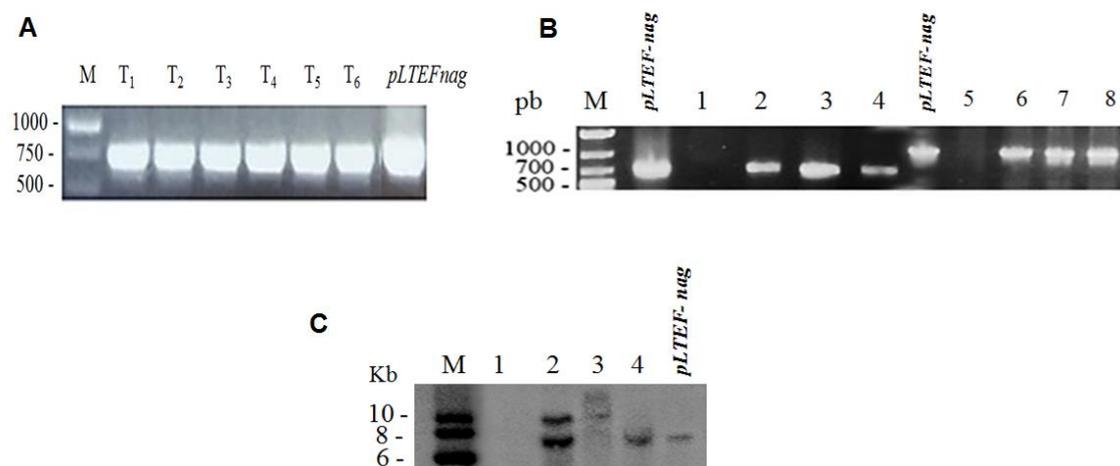


Figura 4. A - Detecção dos transformantes de *T. harzianum*. M - Marcador molecular 1 kb plus. T1 a T6: transformantes positivos contendo o gene *nagI*. Controle positivo, vetor *pLTEF-nag*. **B - Confirmação dos transformantes após seleção de esporo único.** M - Marcador molecular 1 kb plus. Controle positivo, vetor *pLTEF-nag*; linhas 1 e 5: *T. harzianum* WT; linhas 2, 3, 4 – transformantes contendo o gene *nagI* e linhas 6, 7 e 8 os mesmos transformantes contendo marca de seleção. **C - Southern Blot.** M - Marcador molecular *Gene Ruler* 1 kb. Linha 1: *T. harzianum* WT; linhas 2, 3 e 4 transformantes (Thnag1, Thnag2 e Thnag3) e linha 5: vetor *pLTEF-nag*.

Três transformantes foram selecionados por exibirem as porções do vetor correspondentes ao gene *nagI* e a marca de seleção (Figura 4 B). Esses transformantes foram nomeados como: Thnag1, Thnag2 e Thnag3 e utilizados para os ensaios seguintes. Nestes, a análise por *Southern blot* revelou a inserção de duas cópias do vetor no transformante Thnag1 e uma única cópia do vetor nos transformantes Thnag2 e Thnag3 (Figura 4 C). Dessa forma, a aleatoriedade da integração do vetor foi constatada pelo número de cópias apresentadas no *Southern blot* dos transformantes.

4.2 Bioensaios de crescimento

No intuito de comparar o crescimento de *T. harzianum* WT e transformantes em condições ótimas, esses foram crescidos em placas contendo meio MYG e avaliados durante seis dias consecutivos. Nossos resultados demonstraram que os transformantes contendo *nag1* apresentaram as menores médias de crescimento, quando comparados ao WT, em ao menos um dos tempos avaliados (Figura 5). De fato, nos transformantes Thnag1 e Thnag2 foi observado um menor crescimento que o fungo selvagem em todos os tempos intermediários avaliados (Figura 5).

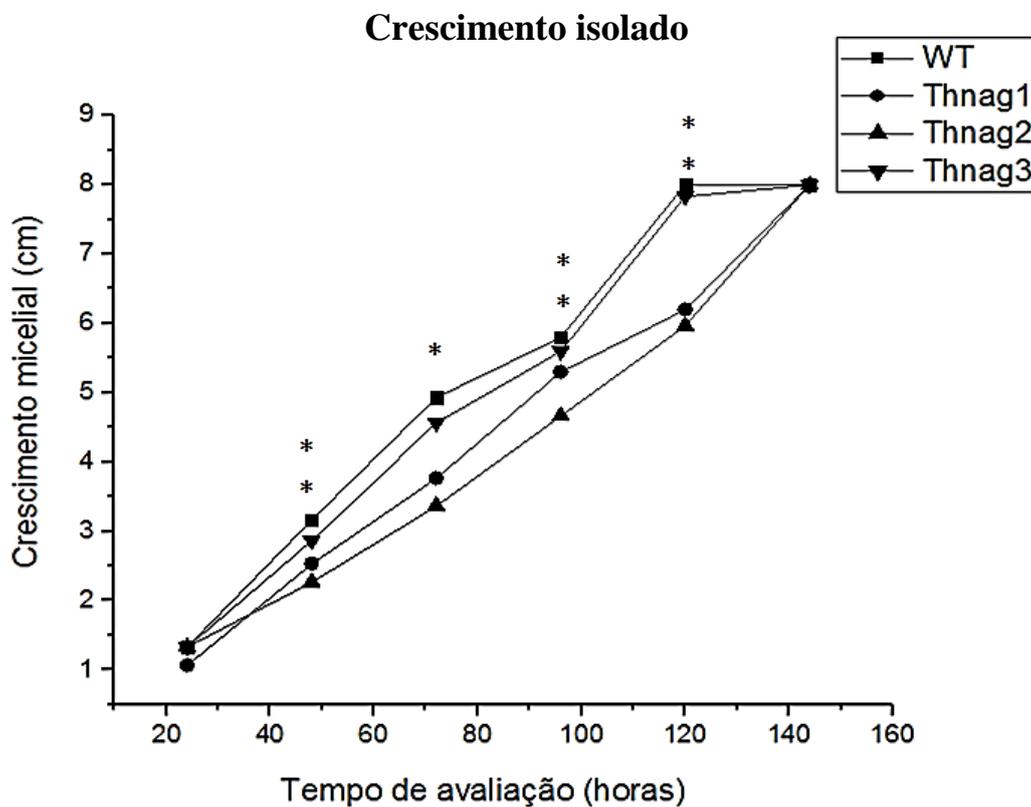


Figura 5. Crescimento micelial médio de *T. harzianum* WT e transformantes ao longo do tempo de avaliação. * Médias diferem estatisticamente, segundo o teste de Dunnett ($P \leq 0,01$).

Foi observado após 6 dias de crescimento que todas as linhagens apresentaram crescimento máximo, com a cobertura total da placa de *Petri* e início da esporulação (Figura 6).

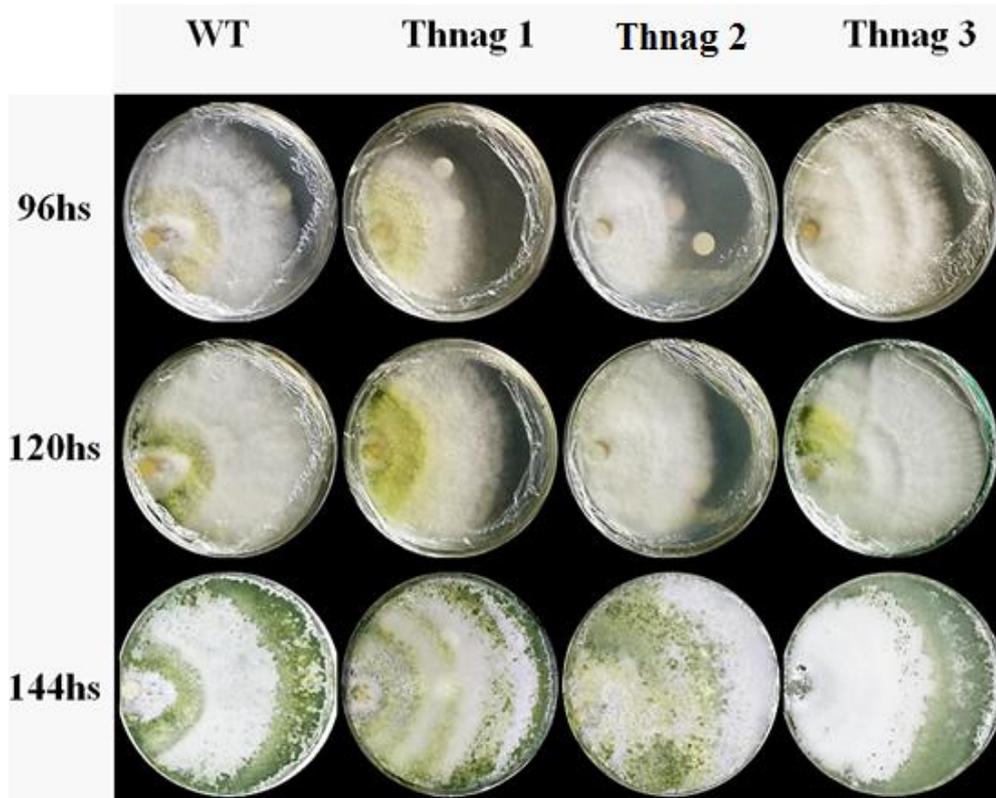


Figura 6. Morfologia de *T. harzianum* WT e transformantes. Imagem representativa das linhagens WT, Thnag1, Thnag2, Thnag3 após 96, 120 e 144 horas da inoculação.

Sendo assim, em condições ótimas de crescimento, todos os transformantes exibiram uma redução do crescimento médio, apesar da morfologias semelhante ao fungo selvagem.

4.3 Atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAGase) em *T. harzianum* selvagem (WT) e transformantes

A sequência de 578 aminoácidos da NAGase correspondente a tradução do gene *nag1* apresentou massa de 64,2 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 5,72, determinados através do *ProtParam* (GASTEIGER *et al.*, 2005). De acordo com a literatura, NAGases podem ser encontradas parcialmente ligadas a parede celular e/ou excretadas para o meio extracelular (LÓPEZ-MONDÉJAR *et al.*, 2009; BRUNNER *et al.*, 2003). Segundo análises no banco de dados *Uniprot*, NAG1 de *T. harzianum* apresenta um peptídeo sinal de 19 aminoácidos, que permite a secreção dessa para o meio. Assim, com o propósito de avaliar a atividade de NAGase

de *T. harzianum* WT e transformantes, os fungos foram crescido em meio TLE em presença de glicose 1% e glicerol 1% como fontes de carbono (Figura 7).

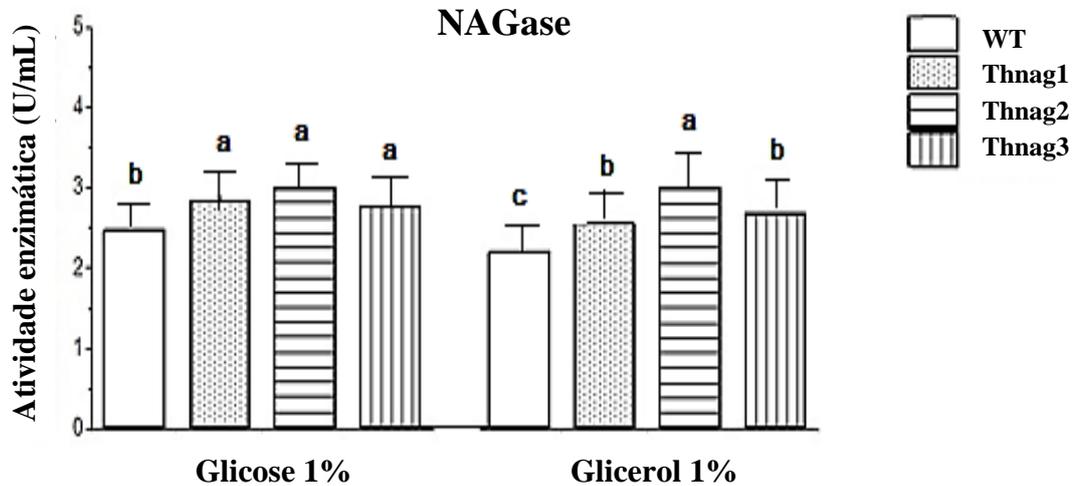


Figura 7. Atividade de NAGase de *T. harzianum* WT e transformantes em glicose 1% e glicerol 1%. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, segundo o teste de Tukey ($P \leq 0,01$).

Foi possível observar que todos os transformantes (Thnag1, Thnag2 e Thnag3) apresentaram as maiores atividades enzimáticas nos meios contendo glicose (2,85 U/mL; 3,00 U/mL e 2,77 U/mL) e glicerol (2,56 U/mL; 2,99 U/mL e 2,67 U/mL), quando comparado com o fungo selvagem (2,48 U/mL e 2,21 U/mL). E ainda, o transformante Thnag2 exibiu a maior atividade enzimática em glicerol 1% em comparação com as demais linhagens (Figura 7). Dessa forma, foi possível constatar que o gene codificador da NAGase está superexpresso e demonstrou atividade em todos os transformantes obtidos.

4.4 Microscopia de fluorescência com *Calcofluor White* (CFW)

Para avaliar a espessura de parede celular e largura das hifas, *T. harzianum* WT e os transformantes foram corados com o fluorocromo *Calcofluor White* e analisados em microscópio de fluorescência (Figura 8 A, B, C e D).

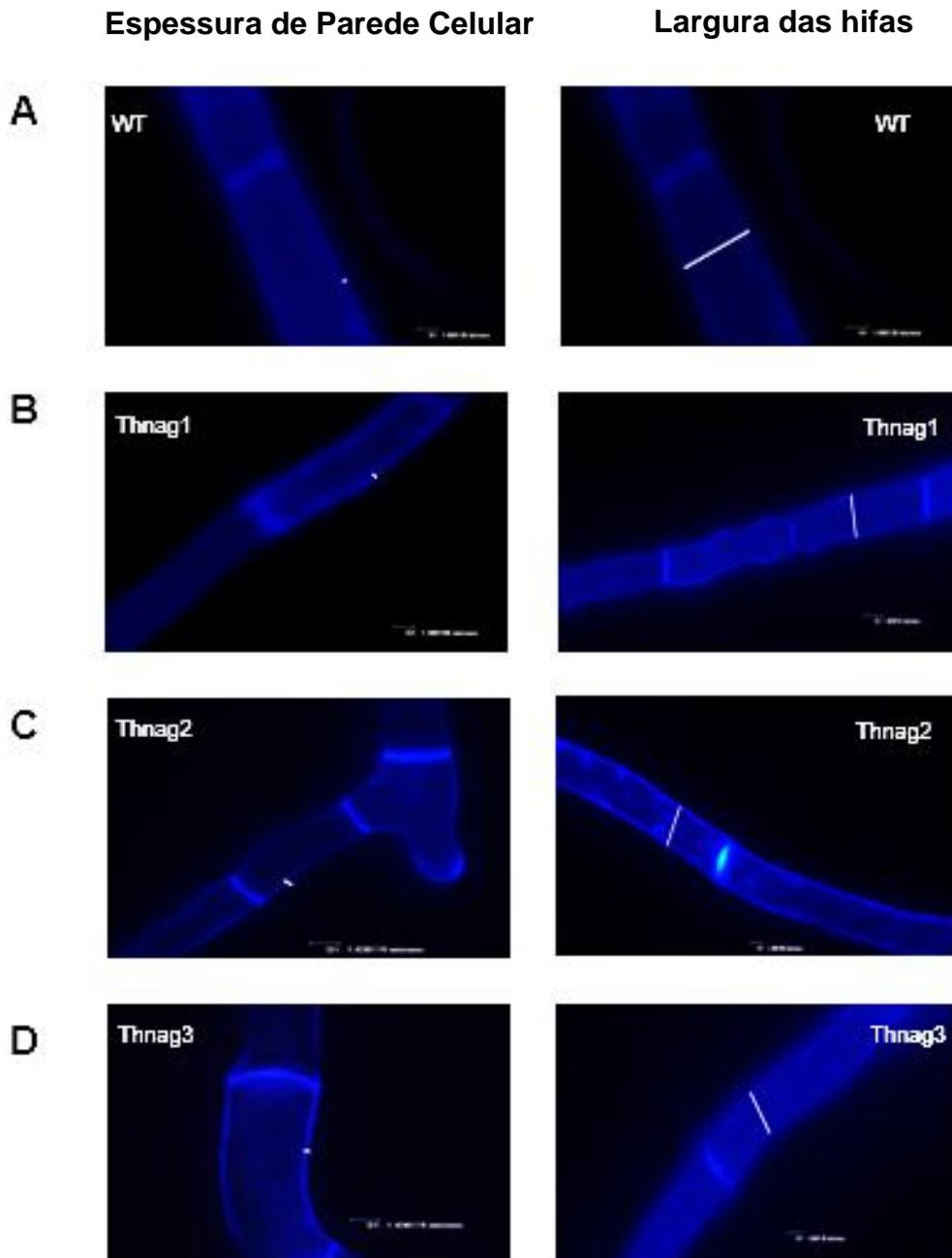


Figura 8. Análise microscópica das paredes celulares e hifas de *T. harzianum* WT e transformantes. A - WT (controle); B - transformante Thnag1. C - transformante Thnag2. D - transformante Thnag3.

Foi possível observar um aumento da espessura da parede celular nos transformantes Thnag2 (0,37 μm) e Thnag3 (0,36 μm) quando comparados as linhagens selvagem WT (0,33 μm) e Thnag1 (0,34 μm) (Figura 8 A e 9 A).

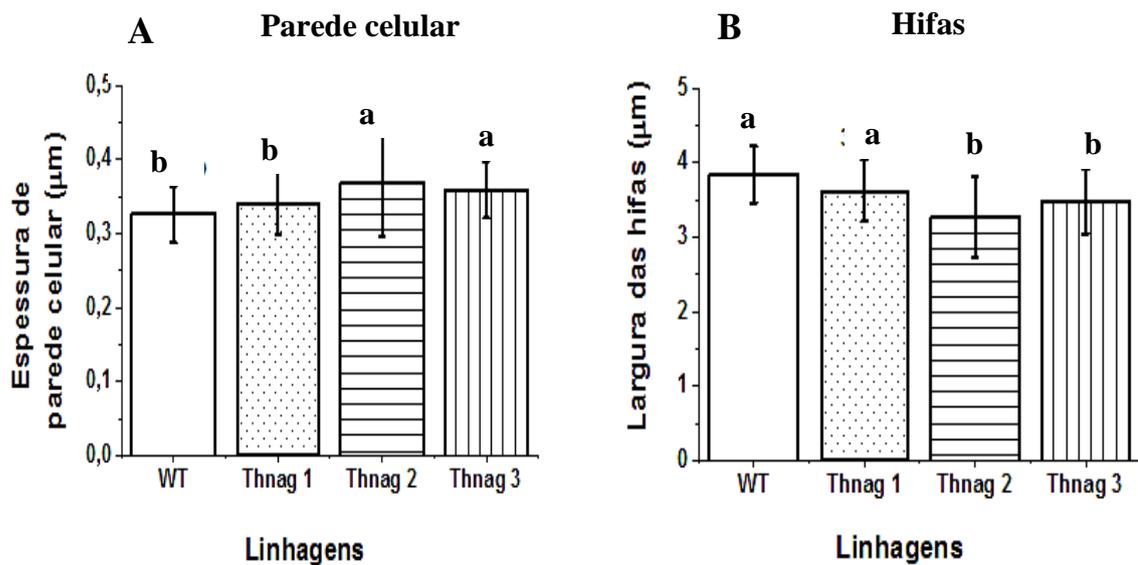


Figura 9. A - Espessura da parede celular de *T. harzianum* WT e transformantes. B - Largura das hifas de *T. harzianum* WT e transformantes. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, segundo o teste de Dunnett ($P \leq 0,01$).

E ainda, Thnag2 e Thnag3 exibiram as menores médias de largura das hifas ($3,27 \mu\text{m}$ e $3,48 \mu\text{m}$) em comparação aos fungos WT ($3,84 \mu\text{m}$) e Thnag1 ($3,62 \mu\text{m}$) (Figura 8 B e 9 B). Assim, os transformantes (Thnag2 e Thnag3) cópia única para o gene *nag1* apresentaram um aumento da parede celular e redução na largura das hifas (Figura 9 A e B).

4.5 Atividade antagonista sobre fitopatógenos

As linhagens de *T. harzianum* WT e os transformantes foram avaliadas quanto a atividade antagonista aos fitopatógenos de *F. moniliforme*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*. Os resultados dos bioensaios de confronto com *F. moniliforme* demonstraram que os transformantes Thnag1 e Thnag2 apresentaram tanto o crescimento quanto a atividade antagonista semelhantes ao fungo selvagem (Figura 10). Já o transformante Thnag3, apesar de exibir um menor crescimento que os demais fungo, demonstrou mesma atividade antagonista ao patógeno (Figura 10).

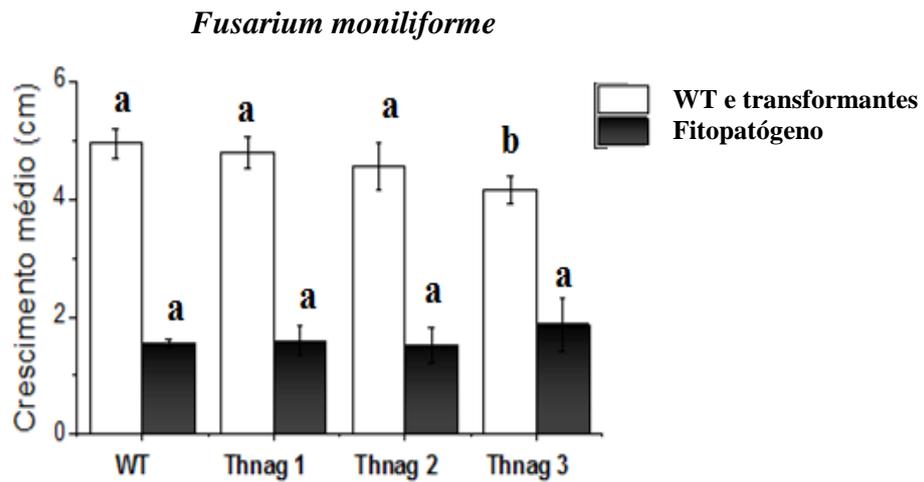


Figura 10. Bioensaios de antagonismo *in vitro* ao fitopatógeno *F. moniliforme*. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, segundo o teste de Dunnett ($P \leq 0,01$).

Em relação ao ensaio de antagonismo ao fitopatógeno *R. solani*, todos os fungos transformados apresentaram crescimento médio semelhantes ao WT (Figura 11).

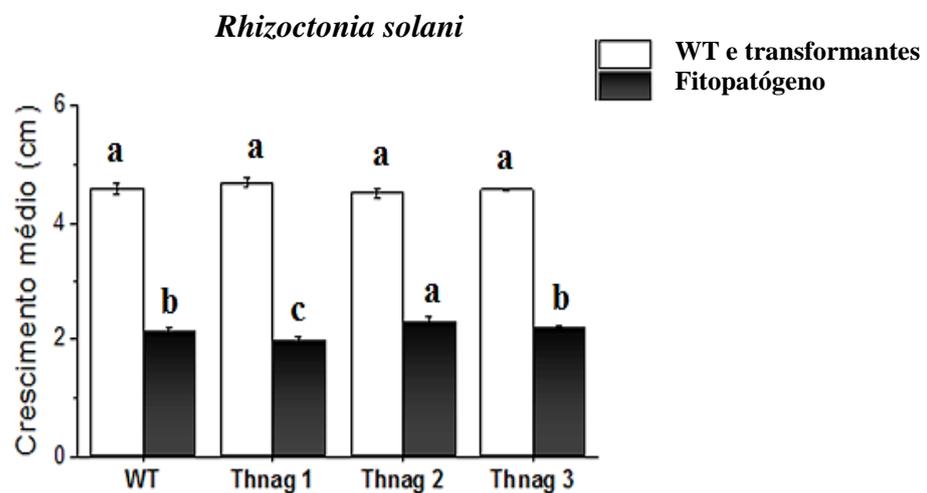


Figura 11. Bioensaios de antagonismo *in vitro* ao fitopatógeno *R. solani*. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, segundo o teste de Dunnett ($P \leq 0,01$).

No entanto, foi observado nos transformantes Thnag1 e Thnag2 respectivamente, uma maior e menor capacidade antagonista ao patógeno quando comparados as demais linhagens

(Figura 11). Os ensaios de confronto com o fitopatógeno *S. sclerotiorum*, todos os transformantes apresentaram crescimento igual ao fungo selvagem (Figura 12).

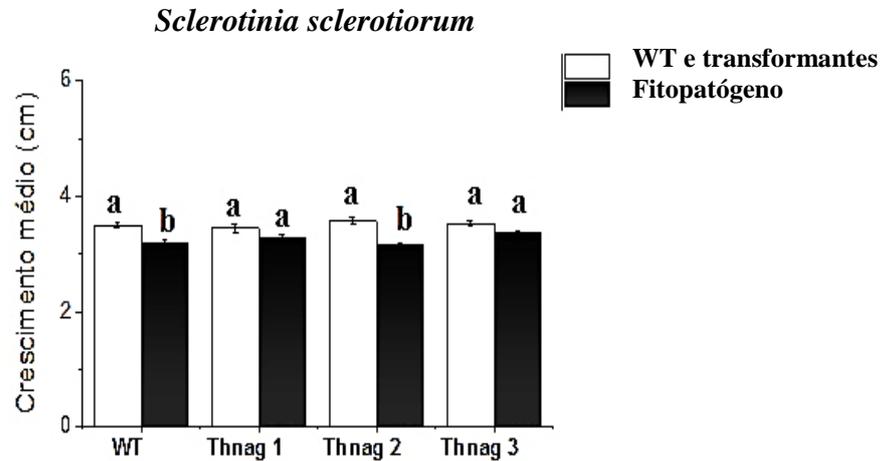


Figura 12. Bioensaios de antagonismo *in vitro* ao fitopatógeno *S. sclerotiorum*. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, segundo o teste de Dunnett ($P \leq 0,01$).

No entanto, os transformantes Thnag1 e Thnag3 exibiram uma menor atividade antagonista para este fitopatógeno em relação as demais linhagens (Figura 12). Assim, apesar dos transformantes superexpressando *nag1* demonstrarem crescimento semelhante ao fungo selvagem durante o confronto com fitopatógenos, a atividade antagonista dos transformantes foi reduzida em contato com *R. solani* e *S. sclerotiorum*.

4.6 Análise da expressão de genes (RT-qPCR) indicadores do micoparasitismo e síntese de parede celular

Diversas moléculas estão envolvidas durante o processo de biocontrole realizado por *Trichoderma* spp., dentre estas se destacam as enzimas glucanases e quitinases líticas da parede celular dos patógenos. Neste trabalho, foi analisada a expressão de genes que codificam para proteínas reconhecidas envolvidas no micoparasitismo (STEINDORFF et al., 2014), sendo estas, duas quitinases (CHIT42, CHIT37) e uma glucanase (β -1,3-glucanase). Além disso, foi avaliada uma *quitina sintase* relacionada com a síntese de cadeias de quitina e remodelação da parede celular (CHAUDHARY; TUPE; DESHPANDE, 2013; ROGG et al.,

2012). A expressão destes genes é amplamente analisada para uma maior compreensão do processo de micoparasitismo e crescimento fúngico (KUBICEK et al., 2015; COHEN, 2001).

A análise quantitativa da expressão dos genes do micoparasitismo (*chit42*, *chit37*, *bgn13.1*) e de síntese de parede (*quitina sintase*), no crescimento isolado (controle), demonstrou que todos os transformantes apresentaram uma maior expressão desses genes comparados ao fungo selvagem. E ainda, foi possível observar que os genes do micoparasitismo estavam reprimidos apenas no fungo selvagem na condição controle (Figura 12 A, B, C e D).

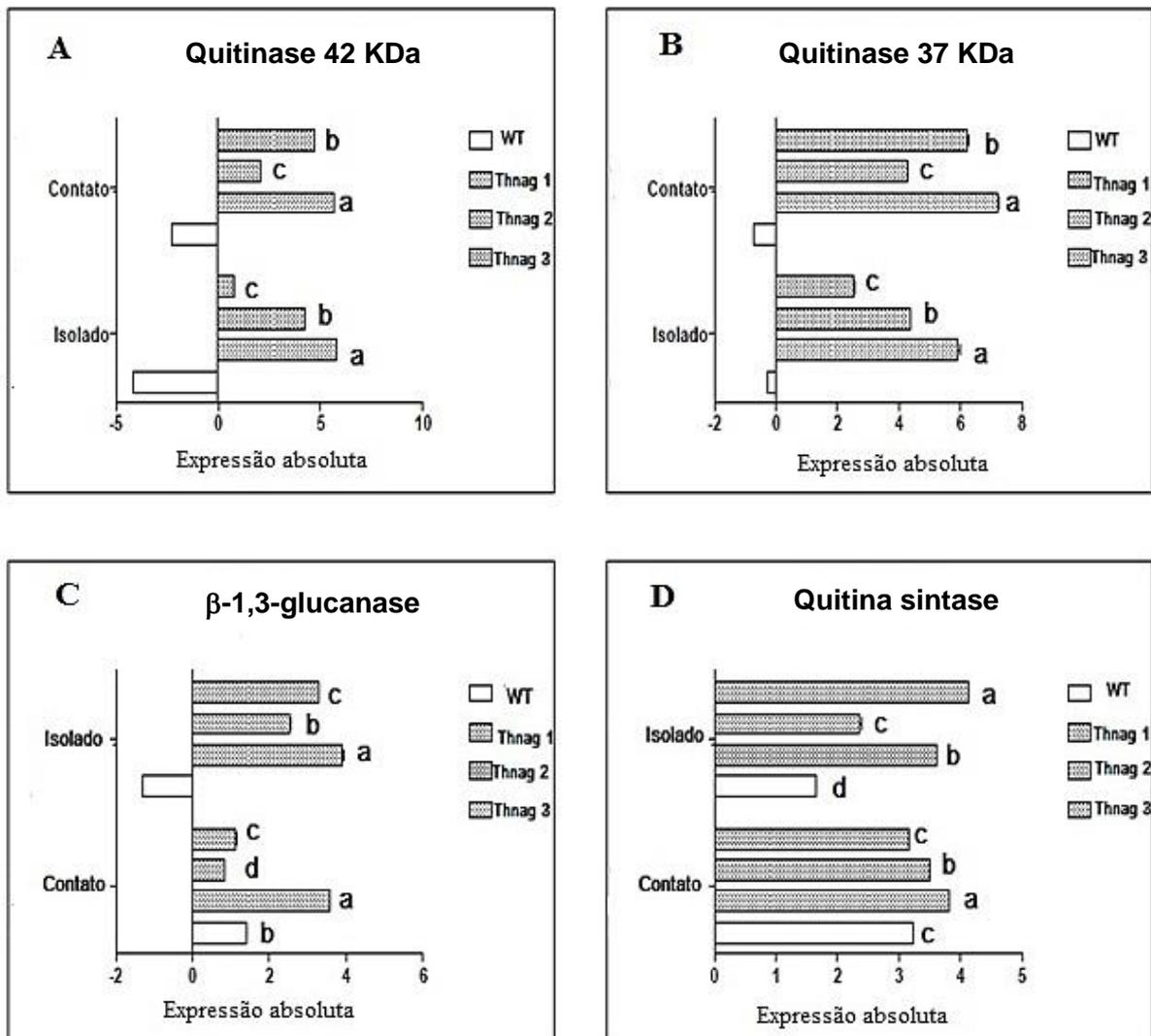


Figura 13. Análise de expressão gênica em linhagens de *T. harzianum*. A - Nível de expressão de *chit42* em WT e transformantes. B - Nível de expressão de *chit37* em WT e transformantes. C - Nível de expressão de *bgn13.1* em WT e transformantes. D - Nível de expressão de *quitina sintase* em WT e transformantes. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, segundo o teste de Dunnett ($P \leq 0,01$).

A análise quantitativa da expressão desses genes, também foi realizada durante o contato com o fitopatógeno *S. sclerotiorum*. Foi observado alta expressão das quitinases *chit42*, *chit37* nos transformantes e repressão destes genes no fungo selvagem (Figura 13 A e B). Em relação ao gene *bgn13.1*, apenas o transformante Thnag1 apresentou uma maior expressão que *T. harzianum* WT (Figura 13 C).

E ainda, uma maior expressão da quitina sintase foi observada em contato com o fitopatógeno nos transformantes Thnag1 e Thnag2 (Figura 13 D). Nesse contexto, o gene *nag1* interferiu na expressão de quitinases do micoparasitismo tanto no crescimento isolado (controle) de *T. harzianum* quanto em condições de confronto com patógeno.

5. DISCUSSÃO

As enzimas N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAGases), membros indispensáveis do sistema quitinolítico de fungos, catalisam a liberação dos monômeros de N-acetilglicosamina (GlcNAc) a partir da extremidade não redutora do polímero de quitina (LANGNER; GÖHRE, 2016; CHEN et al., 2015). Em espécies do fungo biocontrolador *Trichoderma*, estas podem estar envolvidas em processos de nutrição, remodelação, síntese de parede celular, autólise e micoparasitismo (SARAVANAKUMAR et al., 2016). Dessa forma, a caracterização de NAGases é de grande importância para compreender o papel destas em processos morfofisiológicos e no controle biológico.

Nesse sentido, através da metodologia de transformação genética, ferramenta indispensável para a análise funcional de genes, foram avaliados transformantes de *T. harzianum* superexpressando o gene *nag1*, codificador de uma NAGase (NAG1) identificada durante o biocontrole desse microrganismo.

Todas as linhagens de *T. harzianum* (selvagem e transformantes) apresentaram atividade enzimática em condições controle, sendo que os fungos transformados exibiram as maiores atividades para esta enzima nas diferentes fontes de carbono avaliadas. Sabe-se que a glicose em altas concentrações é repressora da síntese de NAGases em *T. harzianum* (SEIDL, 2008; SLÁMOVÁ et al., 2010). No entanto, a concentração de glicose 1% utilizada no presente trabalho não promoveu efeitos inibitórios na atividade de NAGase do fungo selvagem e demais linhagens. Ulhoa e Peberdy (1991), também não observaram efeitos inibitórios da atividade de NAGase de *T. harzianum* em baixas concentrações de glicose.

A expressão do gene *nag1* em transformantes de *T. harzianum* está sob controle de promotor *tef-1*, sendo assim, regulada constitutivamente. O nível de expressão enzimática da NAGase, parece não estar relacionada com o número de cópias do gene *nag1* nos transformantes, uma vez que, *Thnag2* com cópia única exibiu a maior atividade de NAGase que os demais transformantes em glicerol 1%. Dessa forma, entre os fungos transformados foi possível verificar diferentes níveis de atividade enzimática de NAGase, tal observação provavelmente está correlacionada com a expressão do gene *nag1*.

A análise do fenótipo dos transformantes indicou que a presença de *nag1* não alterou o desenvolvimento e morfologia dos micélios, embora resultou em uma redução do crescimento em condições ótimas. Estudos funcionais com gene *nag1* deletado em *T. atroviride*, *T.*

asperellum e superexpresso em *T. reesei*, também não promoveram alterações das linhagens mutantes quanto a morfologia, germinação, esporulação e crescimento comparadas aos fungos selvagens (CHEN et al., 2015; LÓPEZ-MONDÉJAR et al., 2009; RAMOT et al., 2004; PETERBAUER et al., 2002).

Alguns trabalhos postularam que enzimas degradantes de quitina, incluindo NAGases, estão envolvidas na síntese e remodelação da parede celular durante o crescimento das hifas de fungos filamentosos (SLÁMOVÁ et al., 2010; RAMOT et al., 2004; BRUNNER et al., 2003). Com intuito de manter a plasticidade, paredes celulares fúngicas necessitam de remodelação contínua que envolve síntese, reticulação e degradação dos polissacarídeos de parede (glucanas e quitinas) (ARANDA-MARTINEZ; LOPEZ-MOYA; LOPEZ-LLORCA, 2016; RYDER et al., 2012). Em fungos filamentosos, o polímero de quitina é amplamente encontrada na parede celular, havendo uma maior deposição deste nas hifas e septos (FREE, 2013; ROGG et al., 2012).

Uma ferramenta útil para estudos da localização de quitina em fungos é a microscopia de fluorescência com *Calcofluor White* (CFW) (KRUSZEWSKA; PIŁSYK, 2013; RYDER et al., 2012). A análise de microscopia de fluorescência revelou para Thnag2 e Thnag3 um espessamento da parede e diminuição da largura das hifas. Sabendo que o CFW utilizado na microscopia cora a quitina (RYDER et al., 2012), esse espessamento pode resultar do aumento desse polímero na parede celular dos transformantes contendo cópia única do gene. E ainda, a diminuição da largura das hifas destes transformantes pode ser resultado do depósito de quitina nessas estruturas. Como Thnag1 apresentou espessura de parede e hifas iguais ao *T. harzianum* selvagem, a relação de *nag1* com processos de desenvolvimento e síntese de parede pode estar relacionado ao maior número de cópias do gene nesse transformante.

Sabe-se que a síntese de quitina durante a remodelação parede celular é realizada por uma interação de sintases associadas a membrana plasmática e enzimas hidrolíticas (ARANDA-MARTINEZ; LOPEZ-MOYA; LOPEZ-LLORCA, 2016; CHAUDHARY; TUPE; DESHPANDE, 2013). A análise de expressão da *quitina sintase* revelou um aumento da expressão desta em todos os transformantes de *T. harzianum*. No entanto, a maior expressão desta sintase parece não estar diretamente relacionada ao aumento de quitina nos transformantes (Thnag2 e Thnag3), já que Thnag1 apresentou parede celular e hifas iguais ao fungo selvagem.

Diversos trabalhos investigaram a participação de NAGases na morfologia da parede celular e crescimento das hifas de espécies de *Trichoderma*. Em *T. atroviride* (NAG1 e NAG2)

não foram essenciais para estes processos em mutantes com genes *nag1* e *nag2* deletados, já que a análise do desenvolvimento das hifas e paredes celulares não revelaram diferenças entre linhagens transformadas e selvagem (LÓPEZ-MONDÉJAR et al., 2009; PETERBAUER et al., 2002). No entanto, análises microscópicas com *Calcofluor White* revelaram uma deposição de quitina nas pontas das hifas do mutante de *T. hamatum* com gene *nag* deletado. Assim, sugerindo uma participação dessa NAGase na biogênese da parede celular de *T. hamatum* (RYDER et al., 2012)

Acredita-se que NAGases estejam envolvidas na destruição de patógenos através da liberação de N-acetilglicosamina (GlcNAc), monômero indutor de genes do micoparasitismo (DUBEY et al., 2012; HARTL; ZACH; SEIDL-SEIBOTH, 2012). Além disso, foi identificada a expressão diferencial de NAG1 em *T. harzianum* durante o crescimento com parede celular de *S. sclerotiorum*, *Fusarium solani* (STEINDORFF et al., 2012, 2014). E ainda, a atividade enzimática e expressão de NAGases foram observadas em cinco isolados de *T. harzianum* em contato com parede celular de *Fusarium oxysporum*. Entretanto, o papel de NAGases no biocontrole de patógenos ainda é pouco esclarecido. (LÓPEZ-MONDÉJAR; ROS; PASCUAL, 2011).

Como NAG1 foi identificada em *T. harzianum* durante a interação com um fitopatógeno, seu papel no biocontrole também foi investigado. Nossos resultados em confronto direto em placa revelaram que todos os transformantes mantiveram a atividade antagonista sobre *F. moniliforme*. No entanto, foi possível observar uma redução da atividade antagonista aos patógenos *R. solani* e *S. sclerotiorum*. Além disso, as análises de RT-qPCR dos genes do micoparasitismo revelaram uma alta expressão de *chit42*, *chit37* e *bgn13.1* nos transformantes em confronto com *S. sclerotiorum*, fato não observado no fungo selvagem. Os baixos níveis de expressão destes genes em *T. harzianum* selvagem deve-se ao fato que quitinases e glucanases exibem menores níveis de expressão durante o estágio de contato com fitopatógenos. Logo, os maiores níveis de expressão destas enzimas no fungo selvagem durante a interação com patógenos pode ser observada no estágio de pós-contato para quitinases, e durante o pré-contato para glucanases (DAGUERRE et al., 2014; STEINDORFF et al., 2012).

Sugere-se, a participação de NAG1 como disponibilizadora de monômeros de N-acetilglicosamina indutores de enzimas do micoparasitismo e sintases de quitina. No entanto, mesmo os transformantes exibindo alta expressão das enzimas líticas dos polímeros de parede celular dos fitopatógenos, sua atividade de micoparasitismo foi reduzida. Tal fato pode estar

relacionado com o espessamento da parede celular de *Thnag2* e *Thnag3*, que possivelmente esteja dificultando a liberação de enzimas e outros compostos envolvidos no micoparasitismo.

O papel de NAGases no micoparasitismo também foi investigado em mutantes de *Trichoderma* spp. com genes codificadores de NAGases deletados. Mutantes de *T. atroviride* com *nag1* e *nag2* interrompidos apresentaram a mesma eficiência que a linhagem selvagem para controlar os fitopatógenos *R. solani*, *S. sclerotiorum* e *Botrytis cinerea* (LÓPEZ-MONDÉJAR et al., 2009; BRUNNER et al., 2003;). E ainda, um mutante de *T. asperellum* com gene *nag2* deletado exibiu mesmo potencial antagonista a patógenos quando comparado com o fungo selvagem (RAMOT et al., 2004). Dessa forma, NAG1 e NAG2 nessas espécies de *Trichoderma* não foram essenciais para o biocontrole de fitopatógenos (LÓPEZ-MONDÉJAR et al., 2009; RAMOT et al., 2004).

Um sistema biomimético detectou uma NAGase como a primeira enzima formada quando *Trichoderma* entra em contato com patógeno, sinalizando a expressão de outros genes do micoparasitismo (BRUNNER et al., 2003; INBAR; CHET, 1995). De fato, neste trabalho, os transformantes de *T. harzianum* superexpressando *nag1* apresentaram uma alta expressão das enzimas indicadoras do micoparasitismo. O aumento da expressão *chit42*, *chit37*, *bgn13.1* e *quitina sintase* durante o crescimento isolado dos transformantes pode indicar que os monômeros de N-acetilglicosamina estejam sendo liberados, através da degradação de quitina endógena durante o crescimento isolado (condição controle). Sugere-se portanto, um papel de NAG1 na autólise de *T. harzianum*. Um estudo na literatura corrobora com essa hipótese, em que NAG1 apresenta um grande impacto na indução de quitinases em *T. atroviride* através da degradação de quitina endógena, sendo que sua deleção praticamente bloqueia a síntese de quitinases (BRUNNER et al., 2003)

Este trabalho é pioneiro na utilização da ferramenta molecular de transformação genética para obtenção de transformantes de *T. harzianum* superexpressando uma NAGase. Sendo assim, o presente estudo alcançou progressos na transformação desse fungo com *nag1*, e ainda, indicou a participação desta em paredes celulares e na indução de genes do micoparasitismo.

6. CONCLUSÃO

Foi possível clonar e caracterizar funcionalmente o gene codificador de uma NAGase (NAG1) através da transformação genética de *T. harzianum*, e obtenção de transformantes superexpressando *nag1*. Como resultado, a superexpressão deste gene nos fungos transformados promoveu um espessamento da parede celular e hifas, bem como uma redução do crescimento médio e atividade antagonista aos fitopatógenos *R. solani* e *S. sclerotiorum*. Além disso, a superexpressão de *nag1* interferiu na expressão dos genes do micoparasitismo e síntese de parede celular. Assim, foi possível identificar a participação de NAG1 na síntese de paredes celulares e na indução de genes do micoparasitismo em *T. harzianum*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKEL, E. et al. Molecular regulation of arabinan and Larabinose metabolism in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Eukaryotic cell**, v. 8, n.3, p. 1837- 44, 2009.
- ALMEIDA, F. B. D. R. et al. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: Evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 8, p. 1189-1193, 2007.
- ARAGÃO, F. J. L. et al. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L) co-transformed via particle bombardment. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, n.2, p.142-150, 1996.
- ARANDA-MARTINEZ, A.; LOPEZ-MOYA, F.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Cell wall composition plays a key role on sensitivity of filamentous fungi to chitosan. **Journal of Basic Microbiology**, v. 56, n. 10, p. 1059–1070, 2016.
- BAEK, J. M.; HOWELL, C. R.; KENERLEY, C. M. The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. **Current genetics**, v. 35, n. 1, p. 41–50, 1999.
- BARANSKI, R.; KLOCKE, E.; NOTHNAGEL, T. Chitinase CHIT36 from *Trichoderma harzianum* Enhances Resistance of Transgenic Carrot to Fungal Pathogens. **Journal of Phytopathology**, v. 156, n. 9, p. 513–521, 2008.
- BAZAFKAN, H.; TISCH, D.; SCHMOLL, M. Regulation of Glycoside Hydrolase Expression in *Trichoderma*. **Elsevier**, v. 32, n. 6, p. 13–21, 2014.
- BOER, H. et al. Heterologous expression and site-directed mutagenesis studies of two *Trichoderma harzianum* chitinases, CHIT33 and CHIT42, in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 51, n. 2, p. 216–226, 2007.
- BRUNNER, K. et al. The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. **Current Genetics**, v. 43, n. 4, p. 289–295, 2003.
- CABIB, E.; ARROYO, J. How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 648–655, 2013.
- CARVALHO, D. D. C. et al. Biological control of white mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 50, n. 12, p. 1220–1224, 2015.
- CHAUDHARY, M. P.; TUPE, G. S.; DESHPANDE, V. M. Chitin Synthase Inhibitors as Antifungal Agents. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 222–236, 2013.
- CHEN, F. et al. Characterization and homologous overexpression of an N-

acetylglucosaminidase Nag1 from *Trichoderma reesei*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 459, n. 2, p. 184–188, 2015.

COHEN, E. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. **Pest Management Science**, v. 57, n. 10, p. 946–950, 2001.

DAGUERRE, Y. et al. Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: A review. **Fungal Biology Reviews**, v. 28, n. 4, p. 97–125, 2014.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G. S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 6, p. 773–782, 2006.

DARYAEI, A. et al. Effects of temperature, light and incubation period on production, germination and bioactivity of *Trichoderma atroviride*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 4, p. 999–1009, 2016.

DE LA CRUZ, J. et al. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. **European Journal of Biochemistry**. v.206, n.4, p.859–867, 1992.

DE JAEGER, N. et al. *Trichoderma harzianum* might impact phosphorus transport by arbuscular mycorrhizal fungi. **Microbiology ecology**, v. 77, n. 3, p. 558–67, 2011.

DELONGE, M. S.; MILES, A.; CARLISLE, L. Investing in the transition to sustainable agriculture. **Environmental Science & Policy**, v. 55, n.2, p. 266–273, 2016.

DRUZHININA, I. S. et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749–759, 2011.

DUBEY, M. K. et al. Disruption of the Eng18B ENGase Gene in the Fungal Biocontrol Agent *Trichoderma atroviride* Affects Growth, Conidiation and Antagonistic Ability. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 36-152, 2012.

DUDLEY, N. et al. How should conservationists respond to pesticides as a driver of biodiversity loss in agroecosystems. **Biological Conservation**, v. 209, n.3, p. 449–453, 2017.

FREE, S. J. Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis. **Advances in Genetics**. v. 81, n.3, p. 33–82, 2013.

GASTEIGER, E. et al. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**. v. 31, n. 2, p. 3784-3788, 2005.

GHAG, S. B.; SHEKHAWAT, U. K. S.; GANAPATHI, T. R. Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against *Fusarium* wilt in banana. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 5, p. 541–553, 2014.

GRUBER, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. **Microbiology**, v. 158, n. 2, p. 26–34, 2012.

- HAN, P. et al. Identification and characterization of a novel chitinase with antifungal activity from ‘Baozhu’ pear (*Pyrus ussuriensis* Maxim.). **Food Chemistry**, v. 196, n. 3, p. 808–814, 2016.
- HARAN, S. et al. New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum* **Phytopathology**. v. 99, n. 4, p. 441-446, 1995.
- HARMAN, G.E. et al. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. **Phytopathology Journal**, v. 83, n. 6, p. 313–318, 1993.
- HARTL, L.; ZACH, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 533–43, 2012.
- HERMOSA, R. et al. The overexpression in *Arabidopsis thaliana* of a *Trichoderma harzianum* gene that modulates glucosidase activity, and enhances tolerance to salt and osmotic stresses. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 11, p. 1295–1302, 2011.
- HORSCH, M. et al. b-N-acetylhexosaminidase: A target for the design of antifungal agents. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 76, n. 1–3, p. 187–218, 1997.
- INBAR, J.; CHET, I. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, v. 141, n. 11, p. 2823–2829, 1995.
- KARTHIK, N. et al. Production, purification and properties of fungal chitinases. A review. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 52, n. 11, p. 1025–1035, 2014.
- KIM, D. J. et al. Cloning and characterization of multiple glycosyl hydrolase genes from *Trichoderma virens*. **Current Genetics**, v. 40, n. 6, p. 374–384, 2002.
- KRUSZEWSKA, J. S.; PIŁSYK, S. Altering the fungal cell wall integrity and practical aspects. **Nova Science Publishers**, v. 11, n. 5, p. 1-12, 2013.
- KUBICEK, C. et al. *Trichoderma* : from genes to biocontrol. **Journal of Plant Pathology**, v. 83, n. 2001, p. 11–23, 2015.
- KUBICEK, C. P. et al. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. **Genome biology**, v. 12, n. 4, p. 29-40, 2011.
- KUMAR, A. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Overlapping and distinct functions of two *Trichoderma virens* MAP kinases in cell-wall integrity, antagonistic properties and repression of conidiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 398, n. 4, p. 765–770, 2010.
- LANGNER, T.; GÖHRE, V. Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. **Current genetics**, v. 62, n. 2, p. 243–54, 2016.
- LATGÉ, J.-P. Tasting the fungal cell wall. **Cellular microbiology**, v. 12, n. 7, p. 863–872,

2010.

LIMA, L.H.C. et al. Purification of chitinase from *Trichoderma* sp. Its action on *Sclerotinia rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell wall. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.43, p.322-327, 1997.

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 2, p.402-408, 2001.

LÓPEZ-MONDÉJAR, R. et al. The β -N-acetylglucosaminidases NAG1 and NAG2 are essential for growth of *Trichoderma atroviride* on chitin. **Federation of European Biochemical Societies Journal**, v. 276, n. 18, p. 5137–5148, 2009.

LÓPEZ-MONDÉJAR, R.; ROS, M.; PASCUAL, J. A. Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. **Biological Control**, v. 56, n. 1, p. 59–66, 2011.

MALLIKHARJUNA RAO, K. L. N.; SIVA RAJU, K.; RAVISANKAR, H. Cultural conditions on the production of extracellular enzymes by *Trichoderma* isolates from tobacco rhizosphere. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 25–32, 2016.

MASSART, S.; JIJAKLI, H. M. Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal biocontrol agents: A review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n. 2, p. 229–241, 2007.

MATROUDI, S.; ZAMANI, M. R.; MOTALLEBI, M. Molecular cloning of chitinase 33 (CHIT33) gene from *Trichoderma atroviride*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 39, p. 433–437, 2008.

MELLO, S.C.M., ÁVILA, Z.R., BRAÚNA, L.M., PÁDUA, R.R., GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotinia rolfsii* Sacc. **Fitosanidad**.v.11, n.6, p.3-9. 2007.

MONTEIRO, V. N. et al. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. **Current microbiology**, v. 61, n. 4, p. 298–305, 2010.

MUKHERJEE, M. et al., cAMP signalling is involved in growth, germination, mycoparasitism and secondary metabolism in *Trichoderma virens*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 153, n.6, p. 1734–42, 2007.

NICOLÁS, C. et al. *Trichoderma* genes in plants for stress tolerance-status and prospects. **Plant Science**, v. 228, n. 2, p. 71–78, 2014.

ORLEAN, P. Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Genetics**, v. 192, n. 3, p. 775–818, 2012.

PATEL, S.; GOYAL, A. Chitin and chitinase: Role in pathogenicity, allergenicity and health. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, n. 3, p. 331–338, 2017.

- PETERBAUER, C. et al. Identification of the N-acetyl-D-glucosamine-inducible element in the promoter of the *Trichoderma atroviride* nag1 gene encoding N-acetyl-glucosaminidase. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 267, n. 2, p. 162–170, 2002.
- PETERBAUER, C. K. et al. Molecular cloning and expression of the nag1 gene (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase-encoding gene) from *Trichoderma harzianum* P1. **Current Genetics**, v. 30, n. 4, p. 325–331, 1996.
- PRANEETVATAKUL, S. et al. Pesticides, external costs and policy options for Thai agriculture. **Environmental Science & Policy**, v. 27, n. 9, p. 103–113, 2013.
- PRASAD, K.; BHATNAGAR-MATHUR, P.; WALIYAR, F.; SHARMA, K. K. . Overexpression of a chitinase gene in transgenic peanut confers enhanced resistance to major soil borne and foliar fungal pathogens. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 222-233, 2013.
- RAMOT, O. et al. Regulation of two homodimer hexosaminidases in the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum* by glucosamine. **Current Genetics**, v. 45, n. 4, p. 205–213, 2004.
- ROGG, L. E. et al. Regulation of expression, activity and localization of fungal chitin synthases. **Medical Mycology**, v. 50, n. 1, p. 2–17, 2012.
- ROMANO, E.;VIANNA, G. R. Análise da integração de transgenes pela técnica de *Southern blot*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. (Ed.). Manual de transformação genética de plantas. 2.ed. Rev. e Ampl. Brasília, 2015.
- RYDER, L. S. et al. Saprotrophic competitiveness and biocontrol fitness of a genetically modified strain of the plant-growth-promoting fungus *Trichoderma hamatum* GD12. **Microbiology (Reading, England)**, v. 158, n. 1, p. 84–97, 2012.
- SAIPRASAD, G. V. S. et al. Development of *Trichoderma harzianum* endochitinase gene construct conferring antifungal activity in transgenic tobacco. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 199–206, 2009.
- SARAVANAKUMAR, K. et al. Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumerinum. **Biological Control**, v. 94, n. 2, p. 37–46, 2016.
- SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 36–42, 2008.
- SEIDL, V.; DRUZHININA, I. S.; KUBICEK, C. P. A screening system for carbon sources enhancing b-N-acetylglucosaminidase formation in *Hypocrea atroviridis* (*Trichoderma atroviride*). **Microbiology**, v. 152, n. 7, p. 2003–2012, 2006.
- SAHAI, A. S.; MONOCHA, M. S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **Federation of European Biochemical Societies Microbiol**, v. 11, n. 2, p. 317-338, 1993.

- SHARMA, V. et al. Molecular cloning and characterization of ech46 endochitinase from *Trichoderma harzianum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, n. 6, p. 615–624, 2016.
- SILVA, R. N. et al. Regulation of N-acetyl-b-D-glucosaminidase produced by *Trichoderma harzianum*: Evidence that cAMP controls its expression. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 8, p. 667–671, 2004.
- SLÁMOVÁ, K. et al. β -N-Acetylhexosaminidase: What's in a name? **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 682–693, 2010.
- STEINDORFF, A. S. et al. *Trichoderma harzianum* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in mycoparasitism against *Fusarium solani*. **Biological Control**, v. 61, n. 2, p. 134–140, 2012.
- STEINDORFF, A. S. et al. Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. **BMC Genomics**, v. 15, n. 3, p. 204, 2014.
- TAYLOR, G. et al. Purification and characterization of an extracellular exochitinase, β -N-acetylhexosaminidase, from fungal mycoparasite *Stachybotrys elegans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 311–319, 2002.
- TOMASETTO, F. et al. Intensified agriculture favors evolved resistance to biological control. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 15, p. 3885–3890, 2017.
- ULHOA, C. J. et al. Effect of tunicamycin on N -acetyl- L-D-glucosaminidase produced by *Trichoderma harzianum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1528, n. 2, p. 7–10, 2001.
- ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F. Effect of carbon sources on chitobiase production by *Trichoderma harzianum*. **Mycological Research**, v. 97, n. 1, p. 45–48, 1993.
- ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 3, p. 236–241, 1992.
- ULHOA, C. J.; PEBERDY, J.F. Purification and characterization of an extracellular chitobiase from *Trichoderma harzianum*. **Current Microbiological**, v. 23, n. 2, p. 285–289, 1991.
- VITERBO, A. et al., Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. **Antonie von Leewenhoek**, v. 81, n.2, p. 549–556, 2002.
- VOS, C. M. et al. The toolbox of *Trichoderma* spp. in biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. **Molecular plant pathology**, v. 43, n. 4, p. 1–31, 2014.
- YAO, L. et al. Isolation and expression of two polyketide synthase genes from *Trichoderma harzianum* during mycoparasitism. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 468–479, 2016.

YOUSSEF, S. A.; TARTOURA, K. A.; ABDELRAOUF, G. A. Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Serratia proteamaculans* effect on disease suppression, stimulation of ROS-scavenging enzymes and improving tomato growth infected by *Rhizoctonia solani*. **Biological Control**, v. 100, n. 3, p. 79–86, 2016.

YUAN, S. et al. Biological control of tobacco bacterial wilt using *Trichoderma harzianum* amended bioorganic fertilizer and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae*. **Biological Control**, v. 92, n. 3, p. 164–171, 2016.

YU, Y. et al. Enhanced resistance to *Botrytis cinerea* and *Rhizoctonia solani* in transgenic broccoli with a *Trichoderma viride* endochitinase gene. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 3, p. 430–437, 2015.

ZAMANI, M. S. MOTALLEBI, M. R. Molecular cloning of chitinase 33 (chit33) gene from *Trichoderma atroviride*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 433–437, 2008.

ZEILINGER, S. et al. Chitinase Gene Expression during Mycoparasitic Interaction of *Trichoderma harzianum* with Its Host. **Fungal Genetics and Biology**, v. 26, n. 2, p. 131–140, 1999.

ZEILINGER, S. et al. Secondary metabolism in *Trichoderma* - Chemistry meets genomics. **Fungal Biology Reviews**, v. 30, n. 2, p.74-90, 2016.