



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CÂMPUS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS (CCET)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE

GERCI APRIJO FERREIRA

**ANÁLISE COMPARATIVA DE GLICANAS E QUITINAS DA PAREDE
CELULAR DE ESPÉCIES DE *Trichoderma* E A RELAÇÃO DESSES
POLISSACARÍDEOS NO PAREAMENTO COM FITOPATÓGENOS**

ANÁPOLIS - GO
2018

GERCI APRIJO FERREIRA

**ANÁLISE COMPARATIVA DE GLICANAS E QUITINAS DA PAREDE
CELULAR DE ESPÉCIES DE *Trichoderma* E A RELAÇÃO DESSES
POLISSACARÍDEOS NO PAREAMENTO COM FITOPATÓGENOS**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências aplicadas a produtos da saúde da Universidade Estadual de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dra. Valdirene Neves Monteiro

ANÁPOLIS – GO
2018

Elaborada pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UEG com os dados fornecidos pelo (a) autor (a)

A654a	<p>Aprijo Ferreira, Gerci Análise comparativa de glicanas e quitinas da parede celular de espécies de <i>Trichoderma</i> e a relação desses polissacarídeos no pareamento com fitopatógenos / Gerci Aprijo Ferreira; orientador Valdirene Neves Monteiro. -- Anápolis, 2018. 60 p.</p>
	<p>Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Mestrado Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) -- Câmpus-Anápolis CET, Universidade Estadual de Goiás, 2018.</p>
	<p>1. Fungos filamentosos. 2. Polissacarídeos da parede celular. 3. <i>Trichoderma</i>. 4. Fitopatógenos. I. Neves Monteiro, Valdirene, orient. II. Título.</p>

GERCI APRIJO FERREIRA

**ANÁLISE COMPARATIVA DE GLICANAS E QUITINAS DA PAREDE
CELULAR DE ESPÉCIES DE *Trichoderma* E A RELAÇÃO DESSES
POLISSACARÍDEOS NO PAREAMENTO COM FITOPATÓGENOS**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro
Universidade Estadual de Goiás

Profa. Dra. Priscila da Silva Delabona
Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Aline Raquel Voltan
Universidade Federal de Goiás

Aprovado em: ____/____/____

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, que me sustentou e guardou por toda esta caminhada, cumprindo os teus propósitos na minha vida e tornando este sonho possível.

À minha família pelo apoio nas adversidades, principalmente meus amados pais e minha querida irmã. Vocês fazem parte desta conquista!

À minha orientadora Professora Dra. Valdirene Neves Monteiro, pela confiança, paciência e conhecimento compartilhado.

Aos professores Dr. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino e Dr. Cláudia Cristina Garcia Martin Didonet, por disponibilizarem seus laboratórios na UEG - Universidade Estadual de Goiás, tornando este trabalho ainda mais interessante. E a pesquisadora Dra. Karina Nogueira pela paciência em compartilhar conhecimento e auxílio no laboratório e por sua contribuição no exame de qualificação!

Ao professor Dr. Cirano José Ulhoa, por disponibilizar o laboratório de Enzimologia na UFG - Universidade Federal de Goiás. Agradeço principalmente as pesquisadoras Stephanie Naoum e Aline Voltan pelo auxílio nas análises. E a Dra. Priscila da Silva Delabona pela sua valiosa contribuição no exame de qualificação e defesa.

Ao Professor Dr. Roberto Nascimento Silva, e toda sua equipe pela receptividade em seu laboratório na USP - Universidade de São Paulo.

A Professora Msc. Renata Silva Brandão, e toda sua equipe no Laboratório da Saúde, da FMB - Faculdade Montes Belos, pelo carinho e auxílio com a pesquisa.

Aos meus colegas de Mestrado Marielly Carvalho, Kássia Roberta, Mônica e Oswaldo, pelo apoio, desabafos e incentivo para realização do trabalho.

Aos meus amigos Uádi Santana, João Pedro Oliveira e Danielle Milany pelo carinho e apoio, sempre me motivando e incentivando a seguir em frente.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	11
1.1 - Parede celular de fungos	11
1.2 – Composição da parede celular de fungos	12
1.3 – O gênero <i>Trichoderma</i>	15
1.4 – Os fungos fitopatógenos	21
2 – JUSTIFICATIVA	24
3– OBJETIVO	25
3.1 - Objetivo geral.....	25
3.2 – Objetivos específicos	25
4 – METODOLOGIA	26
4.1 - Isolados e condições de cultivo dos fungos	26
4.2 – Obtenção dos micélios	26
4.3 – Pareamento dos isolados de <i>Trichoderma</i> com os fitopatógenos	26
4.4– Obtenção do extrato protéico da parede celular	27
4.5 – Extração dos carboidratos da parede celular.....	27
4.5.1 – Extração da quitina da parede celular	28
4.6 – Determinação de carboidratos da parede celular.....	28
4.6.1 - Determinação de carboidratos da parede por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	28
4.6.2 – Determinação de açúcares totais da parede celular	28
4.6.3 – Determinação de glicana da parede celular	29
4.6.4 – Determinação de quitina da parede celular	29
4.7 – Determinação de proteínas da parede celular	29
4.8 – Determinação das enzimas da parede celular	30
4.8.1 – Determinação das Exo - β -1,3 - glicanases.....	30
4.8.2 – Determinação das Endo - β -1,3 - glicanases.....	30
4.8.3 – Determinação das quitinases	30
5 – RESULTADOS	31
5.1 – Composição de glicanas e quitinas da parede celular de isolados de <i>Trichoderma</i> e de fitopatógenos e análise comparativa de glicanas e quitinas da parede de <i>Trichoderma</i> em pareamento por CLAE	31
5.2 – Determinação da concentração de açúcares totais.....	34

5.3 – Determinação da concentração de glicanas e quitinas	35
5.4 - Determinação de proteínas totais da parede celular	37
5.5 -Determinação enzimática dos componentes da parede celular	39
5.5.1 - Determinação β -1,3 – glicanases	39
5.5.2 - Determinação de quitinase	41
6 - DISCUSSÃO.....	43
7 – CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	47
ANEXOS.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura geral da parede celular dos fungos	12
Figura 2 – Esquema de um polímero de glicana. Cadeias lineares de glicose unidas por ligações do tipo β -1,3.....	13
Figura 3 - Esquema de um polímero de quitina. Cadeias lineares de N-acetilglicosamina unidas por ligações do tipo β -1,4.....	15
Figura 4 –Característica macro e microscópica de <i>Trichoderma harzianum</i>	16
Figura 5 – Isolado de <i>Trichoderma harzianum</i> mutante Δ EPL1.....	17
Figura 6 – Isolado de <i>Trichoderma asperellum</i>	17
Figura 7 - Isolado de <i>Trichoderma reesei</i>	18
Figura 8 –MEV mostrando o modo de enrolamento de <i>Trichoderma harzianum</i> sobre a hifa de <i>Rhizoctonia solani</i>	19
Figura 9 - Isolado de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . A estrutura apontada pela seta vermelha é o escleródio.....	22
Figura 10 - Isolado de <i>Fusarium oxysporum</i>	23
Figura 11 - Isolado de <i>Rhizoctonia solani</i>	23
Figura 12 –Comparação dos açúcares totais da parede celular de <i>Trichoderma</i>	35
Figura 13 -Comparação dos açúcares totais da parede celular de <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>T. asperellum</i> e <i>T. reesei</i> em pareamento com fitopatógenos.....	35
Figura 14 -Determinação da concentração de glicanas e quitinas da parede celular de <i>Trichoderma</i>	38
Figura 15 - Determinação da concentração de glicanas e quitinas da parede celular de <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>T. asperellum</i> e <i>T. reesei</i> em pareamento com fitopatógeno..	39
Figura 16 -Determinação da concentração de proteínas totais em <i>Trichoderma</i>	42
Figura 17 -Determinação da concentração de proteínas totais em <i>T. harzianum</i> , <i>T. reesei</i> e <i>T. asperellum</i> em pareamento com fitopatógenos.....	42
Figura 18 -Determinação enzimática de glicanases na parede de <i>Trichoderma</i>	45
Figura 19 -Determinação enzimática de glicanases de <i>T. harzianum</i> , <i>T. asperellum</i> e <i>T. reesei</i> em pareamento com fitopatógenos.....	46
Figura 20 - Determinação enzimática de quitinases na parede de <i>Trichoderma</i>	48
Figura 21 -Determinação enzimática de quitinases de <i>T. harzianum</i> em pareamento....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação da quantidade de glicana e quitina (%) na parede celular de fungos.....	12
Tabela 2 – Concentração de glicanas e quitinas (%) na parede celular dos isolados de <i>Trichoderma</i> e dos fitopatógenos.....	32
Tabela 3 - Concentração de glicanas e quitinas (%) na parede celular dos isolados de <i>Trichoderma harzianum</i> (ALL42), <i>T. harzianum</i> mutante (Δ EPL1), <i>T. asperellum</i> (T00) e <i>T. reesei</i> (9414) em pareamento com os fitopatógenos <i>Fusarium oxysporum</i> (FO), <i>Rhizoctonia solani</i> (RS) e <i>Sclerotinea sclerotiorum</i> (SS).....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ALL42 - *Trichoderma harzianum*

Δ EPL1-*Trichoderma harzianum* Mutante

T00 – *T. asperellum*

9414 – *T. reesei*

FO –*Fusarium oxysporum*

RS –*Rhizoctonia solani*

SS – *Sclerotinia sclerotiorum*

BDA – Meio de Cultura (Batata; Dextrose e Agar)

PMSF – Inibidor de protease (Fluoreto de fenilmetilsulfonil)

ADNS – Ácido Dinitrosalicílico

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DMAB - Dimetilaminobenzaldeído

PNP – p-Nitrofenol

NAG – N-acetilglicosamina

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

RESUMO

A parede celular fúngica é responsável pela proteção, formato e comunicação intracelular. As suas variedades de funções estão relacionadas com sua composição. A parede celular é composta principalmente de polissacarídeos e proteínas. Dentre os polissacarídeos mais importantes para a célula fúngica estão as glicanas e quitinas, sendo que as quantidades desses polissacarídeos podem variar de acordo com cada espécie e gênero de fungos. Os fungos do gênero *Trichoderma* estão entre os mais estudados atualmente, devido sua importância para a agricultura. É conhecido principalmente por seu mecanismo de combate a fitopatógenos principalmente *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*. Esse mecanismo de ataque a fitopatógenos está intimamente ligado com a composição da parede fúngica, por isso a necessidade do estudo da composição da parede do *Trichoderma* e dos fitopatógenos. Nesse trabalho serão estudadas a composição da parede celular dos isolados de *Trichoderma harzianum*, *T. harzianum* mutante (Δ EPL1), *T. asperellum* e *T. reesei*. Os isolados foram cultivados em meio BDA por 7 dias, onde os mesmos foram crescidos sozinhos e em antagonismo com fitopatógenos. Os polissacarídeos da parede celular foram extraídos e fracionados a partir dos micélios de *Trichoderma*. As análises dos açúcares de parede foram realizadas em CLAE, onde foram detectadas principalmente frações de glicose e N-acetilglicosamina, respectivamente glicanas e quitinas. Além disso, foram realizadas análises para detecção de glicanas e quitina diretamente, por glicox e DMAB. Os açúcares e proteínas totais também foram quantificadas, além das enzimas glicanases e quitinases. Foram observadas variações nas quantidades de glicanas e quitinas na parede fúngica, onde detectou-se que os fungos *Trichoderma harzianum* e *T. asperellum* possui uma quantidade de glicanas e quitina superiores ao fungo *Trichoderma reesei*, isso pode ser explicado pelo fato do *T. reesei* possuir uma baixa atividade micoparasitária quando comparados com outras espécies de *Trichoderma*. Quando foram analisadas as paredes do *Trichoderma* em contato com fitopatógenos observou-se que a quantidade de açúcares e sua composição enzimática aumentaram, podendo concluir que a mudança de composição da parede fúngica revela que a mesma é bastante dinâmica e está diretamente relacionada com o processo de micoparasitismo.

Palavras-chave: Glicanas, quitinas, controle biológico, micoparasitismo.

ABSTRACT

The fungal cell wall is responsible for intracellular protection, shape and communication. Its varieties of functions are related to its composition. The cell wall is composed primarily of polysaccharides and proteins. Among the polysaccharides most important to the fungal cell are glucans and chitins, and the amounts of these polysaccharides may vary according to each species and genus of fungi. The fungi of the genus *Trichoderma* are among the most studied currently, due to their importance for agriculture. It is known mainly for its mechanism of combat to phytopathogens mainly *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*. This mechanism of attack to phytopathogens is closely linked with the composition of the fungal wall, therefore the need to study the composition of the wall of *Trichoderma* and phytopathogens. In this work the species will be studied the composition of the cell wall of *Trichoderma harzianum*, *T. harzianum* mutant (Δ EPL1), *T. asperellum* and *T. reesei*. The fungi were cultivated in BDA medium for 7 days, where they were grown alone and in antagonism with phytopathogens. Cell wall polysaccharides were extracted and fractionated from *Trichoderma* mycelium. The analysis of the wall sugars were performed in HPLC, where glucose and N-acetylglucosamine, respectively, glucans and chitins were detected. In addition, analyzes were performed for the detection of glucans and chitin directly by glucox and DMAB. Total sugars and proteins were also dosed, in addition to the enzymes glucanases and chitinases. It was observed that the fungi *Trichoderma harzianum* and *T. asperellum* have an amount of glucans and chitin higher than the fungus *Trichoderma reesei*, which can be explained by the fact that *T. reesei* possesses a low mycorrhizal activity when compared with other *Trichoderma* species. When the *Trichoderma* walls were analyzed in contact with phytopathogens, it was observed that the amount of sugars and their enzymatic composition increased significantly, and it can be concluded that the change in composition of the fungal wall reveals that it is very dynamic and is directly related to the process of myoparasitism.

Keywords: Glucans, chitin, biological control, mycoparasitism.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Parede Celular de Fungos

Os fungos são seres eucarióticos que podem ser diferenciados pela sua estrutura celular. A célula fúngica é constituída por uma membrana plasmática e por organelas que se encontram dispersas no citoplasma, além disso, é revestida por uma camada protetora externa denominada parede celular, que além de proteção, é responsável pelo formato e comunicação intercelular (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). Dentre todas as estruturas celulares fúngicas a parede celular é considerada a mais importante devido sua composição e complexidade (FREE, 2013).

A parede fúngica possui uma estrutura rígida e ao mesmo tempo dinâmica, que participa de uma variedade de processos biológicos que são extremamente essenciais à célula (MAGNELLI; CIPOLLO; ROBBINS, 2005). Na célula fúngica a parede corresponde cerca de 20 a 30% do seu peso seco (SMITH et al., 1999), dependendo das condições ambientais e/ou de cultivo sua composição química, estrutural e dimensional sofrem consideráveis variações (KLIS; BOORSMA; DE GROOT, 2006).

As variedades de funções da parede fúngica estão relacionadas com a estrutura celular desses organismos e sua composição (LOPES, 2011). A parede celular fúngica é composta por multicamadas e se torna muito importante para a sua viabilidade e patogenicidade. Apesar da generalização dos constituintes da parede, os componentes químicos da mesma, como exemplo polissacarídeos, principalmente glicanas e quitinas (Tabela 1) e proteínas, diferem entre as espécies de fungos de modo que a parede celular possa ser utilizada como marcador taxonômico para determinar gêneros, daí a importância do estudo dos componentes da parede (CANTU et al., 2009; FONTAINE et al., 2000).

Tabela 1: Comparação da quantidade de glicana e quitina (%) na parede celular de fungos.

Isolados	Glicana (%)	Quitina (%)	Referência bibliográfica
<i>Streptococcus mutans</i>	38	-	EBISU et al., 1975
<i>Ustilago maydis</i>	52,2	16,4	RUIZ-HERRERA, 1999
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	27,4	6,2	FRANÇOIS, 2006
<i>Pisolithus microcarpus</i>	46,5	26,1	SANTOS, 2007
<i>Pisolithus tinctorius</i>	48	23,5	SANTOS, 2007
<i>Botrytis cinerea</i>	48	11	CANTU et al., 2009
<i>Fusarium oxysporum</i>	23	11	SCHOFFELMEER et al., 2009

1.2 – Composição da Parede Celular de Fungos

A parede celular dos fungos é constituída basicamente de polissacarídeos e proteínas (Figura 1). Dentre os polissacarídeos as glicanas (α -1,3-glicana, β -1,3- e β -1,6- glicanas) e quitinas (β - 1,4 –N-acetilglicosamina) estão presentes em maior concentração na célula fúngica. As proteínas encontradas na parede são ligadas a moléculas de manose, formando assim as manoproteínas (FREE, 2013; CANTU et al., 2009; FRANÇOIS, 2006; SCHOFFELMER et al., 1999).

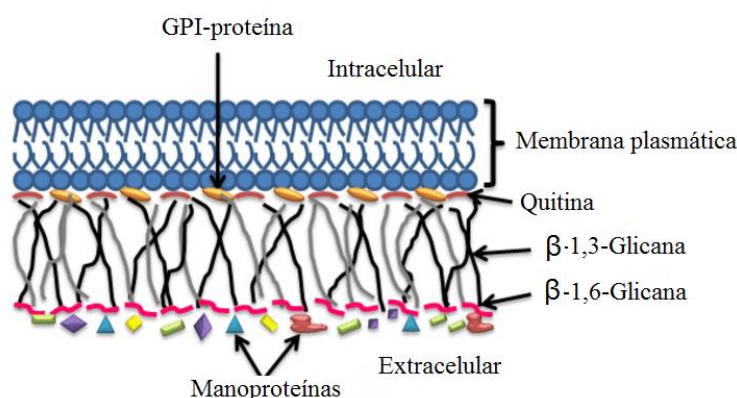


Figura 1: Estrutura geral da parede celular dos fungos. Fonte: ALVES (2017) – com modificações.

Polissacarídeos são biopolímeros produzidos por todos os organismos, formados a partir de moléculas de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas. Os polissacarídeos podem ser encontrados sozinhos em sua forma livre ou conjugados com proteínas ou lipídeos, sendo que ambos apresentam uma variedade de funções biológicas. Dentre as principais funções dos polissacarídeos para os fungos estão a estrutural e energética (NELSON; COX, 2014). Além de fornecerem suporte para hifas e contribuírem para a proteção extracelular formando uma espécie de “capa” protegendo a célula de possíveis agressores (FUKUDA et al., 2009).

As glicanas estão entre os polissacarídeos mais encontrados da parede celular fúngica, em geral estima-se que compreenda cerca de 20 a 50% do peso seco da parede celular. É predominantemente composta por polímeros de glicose que estão interligadas pelos carbonos 1 e 3 através de ligações glicosídicas com configurações alfa(α) e beta(β) (Figura 2). Estudos realizados em alguns fungos filamentosos demonstraram que as glicanas são responsáveis por oferecer força e integridade mecânica a parede celular (BOWMAN; FREE, 2006).

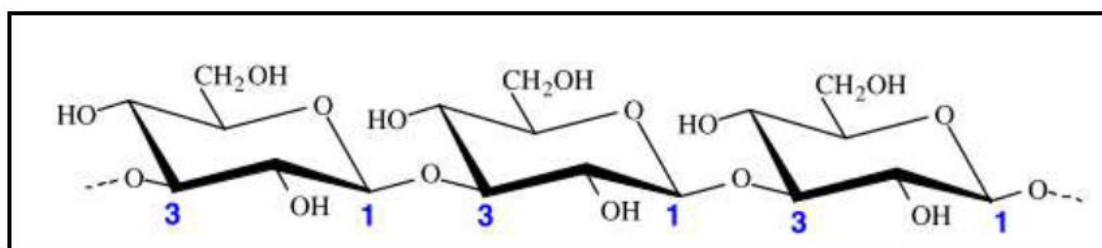


Figura 2: Esquema de um polímero de glicana. Cadeias lineares de glicose unidas por ligações do tipo β -1,3. Fonte: MARTIN et al., (2007).

As α -glicanas são pouco descritas na literatura, apresentando uma menor predominância na parede fúngica. São polissacarídeos formados por monômeros de D-glicose, ligados entre si por ligações glicosídicas de configuração α . Contém ligações do tipo α -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 6). Alguns autores acreditam que a proporção de ligações α -(1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 6) possa variar em função da linhagem fúngica estudada (SEVIOUR et al., 1992). Alguns trabalhos envolvendo a α -1,3-glicana demonstram sua ação na patogenicidade fúngica, além de atuarem na viabilidade de alguns fungos e desempenharem funções adesivas na interação entre hifas. Em alguns fungos como

Saccharomyces cerevisiae e *Candida albicans* observou-se a ausência de α -glicanas (FUJIKAWA et al., 2012; HENRY; LATGÉ; BEAUVAIS, 2012).

β -glicanas são as mais predominantes na parede fúngica. Conferindo cerca de 30 a 60% do peso seco da parede celular. Podendo ser encontrados tanto na sua forma livre como na forma conjugada com proteínas, lipídeos ou outros polissacarídeos (ORLEAN, 2012; WILLIAMS, 1997). A principal função das β -glicanas na parede celular é promover uma maior rigidez e integridade, porém alguns estudos demonstram atividade desse polímero relacionado com a patogenicidade dos fungos e uma possível interação planta-microorganismo, promovendo uma proteção adicional a célula microbiana contra a dessecação e ataques de outros microrganismos patogênicos. β -glicanas são divididas em duas frações β -1,3-glicanas e β -1,6-glicanas (BAUERMEISTER et al., 2010; SUTHERLAND, 1999).

As β -1,3 glicanas formam uma estrutura principal aonde os outros componentes da parede celular irão se ligar covalentemente (BLANCO et al., 2015). Compõe cerca de 35% do peso seco da parede celular, possuindo uma fração insolúvel em ácido e álcalis (ORLEAN, 2012). Além de compor a estrutura da parede celular, as β -1,3-glicanas atuam como moduladoras do sistema de defesa de mamíferos e plantas (FESEL; ZUCCARO, 2016).

As β -1,6-glicanas são polímeros que também estão presentes na parede celular dos fungos, porém em menor quantidade. Apesar de serem essenciais para a viabilidade do fungo, a síntese de β -1,6-glicanas ainda é pouco entendida por ser considerada mais complexa ao comparar com a síntese de outros polissacarídeos (ORLEAN, 2012; SHAHINIAN; BUSSEY, 2000; LUSSIER et al., 1998).

Outro componente existente na parede celular de fungos é a quitina, um homopolímero de cadeia linear, longo, formado por resíduos de N-acetilglicosamina unidos por ligações β -1,4 (Figura 3). Em leveduras compreendem cerca de 1 a 2% da parede celular, considerada relativamente baixa quando comparada com a presença na parede de fungos filamentosos, onde podem ser encontradas em maior proporção cerca de 10 a 20% (BOWMANN; FREE, 2006). As quitinas se encontram em três formasdiversas na parede celular fúngica: a quitina livre, a quitina ligada a β -1,3-glicana e a quitina ligada a β -1,6-glicana que conseqüentemente é ligada a manana e também a β -1,3-glicana (ORLEAN, 2012). A quitina é insolúvel em meio aquoso e na maioria de solventes orgânicos, por isso tem uma baixa reatividade química (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

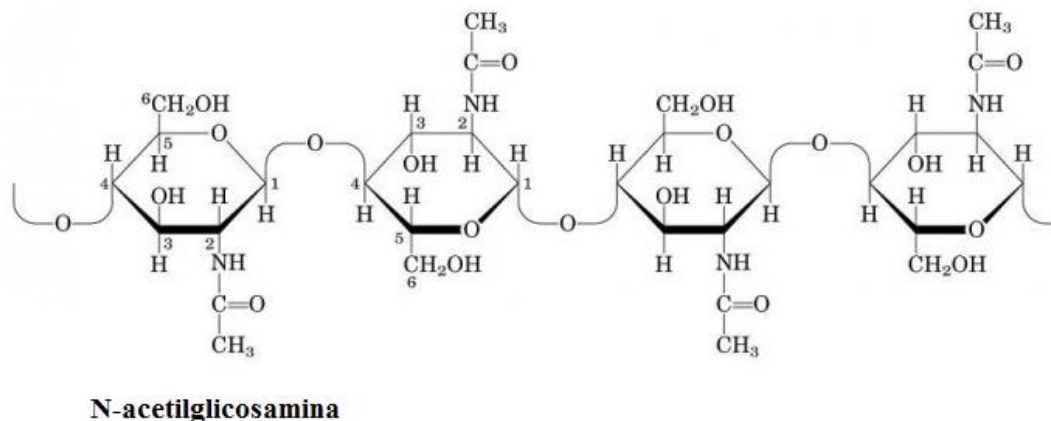


Figura 3: Esquema de um polímero de quitina. Cadeias lineares de N-acetilglicosamina unidas por ligações do tipo β -1,4. Fonte: RIBEIRO (2017).

Outro constituinte com significativa importância para a parede celular fúngica é a manana, basicamente uma molécula de manose ligada a uma proteína sendo assim chamada de manoproteínas. As manoproteínas possuem em sua cadeia principal unidades de manose ligada em α - (1 \rightarrow 6). Suas cadeias laterais são unidades de manose ligadas a cadeias centrais de α -(1 \rightarrow 2) e em menor proporção ligada a cadeias de α -(1 \rightarrow 3) (ORLEAN, 2012). Têm sido atribuídas a esse glicoconjugado as funções de adesão entre células, habilidades imunomoduladoras e variabilidade antigênica (LIŽIČÁROVÁ et al., 2007).

1.3 –O gênero *Trichoderma*

Os fungos do gênero *Trichoderma*, foram reconhecidos como potenciais agentes de controle biológico inicialmente por Weindling, no começo da década de 1930, quando o autor relatou a ação micoparásita de *Trichoderma* contra os fungos fitopatogênicos do gênero *Rhizoctonia* e *Sclerotinia*. Com esse relato houve um estímulo para o desenvolvimento de várias pesquisas nessa área e hoje algumas espécies vêm sendo utilizadas com sucesso, inclusive comercialmente no controle biológico de fungos fitopatogênicos de interesse na agricultura (DRUZHININA et al., 2010). Em 2015 um trabalho na *International Mycological Association* descreveu 254 espécies de *Trichoderma* (BISSET et al., 2015) juntamente com a descrição de todas as espécies e suas respectivas nomenclaturas. Dentre as espécies de *Trichoderma* podemos destacar os *T. harzianum*, *T. asperellum* e *T. reesei*.

Trichoderma harzianum compreende um grupo de fungos filamentosos saprófitos 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. Suas características macroscópicas (Figura 4A) incluem crescimento rápido em cultura, rede micelial aérea hialina, septada, bastante ramificada e conídios de cor esverdeada. Microscopicamente (Figura 4B) apresentam conidióforos com ramos emparelhados em forma de pirâmide, produzem conídios com tamanho de 5 μm de diâmetro, sua forma varia em elipsoidal, oblonga, globosa ou subglobosa. Seus conídios podem estar soltos ou compactados em tufo, formando aglomerações (CARRERAS-VILLASEÑOR et al., 2012; KULLNING et al., 2000; SAMUELS, 1996).

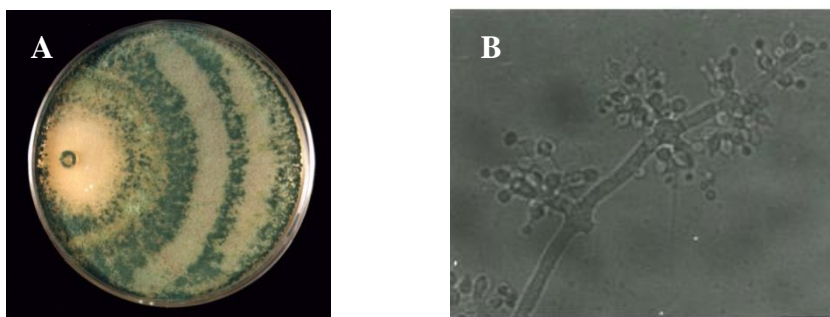


Figura 4: Característica macro e microscópica de *Trichoderma harzianum*. Em (A) característica macroscópica cultura apresentando conídios em abundância. Em (B) característica microscópica apresentando uma porção do conidióforo com fiálides. Fonte: LIMA (2002).

Nos últimos anos alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos com isolados de *Trichoderma harzianum* envolvendo mutações em sua célula (RIBEIRO, 2017; GOMES et al., 2017; GOMES et al., 2015). Um dos mutantes do *T. harzianum* é o (ΔEPL1), onde houve deleção da proteína Epl1 (Figura 5). A proteína epl1 pertence à família das Cerato-Plataninas, sendo liberadas no estágio inicial de desenvolvimento de fungos filamentosos, são ligadas a parede celular dos fungos e são capazes de induzir respostas de defesas em plantas, tais como a produção de fitoalexinas (BODDI et al., 2004). Apesar de não ser totalmente elucidado estudos demonstram que o *Trichoderma* mutante (ΔEPL1) possui grande atuação micoparasitária, redução da virulência de fungos patogênicos e associação simbiótica com plantas, na qual *Trichoderma* induziu

um efeito permitindo que a planta responda prontamente contra patógenos. O *T. harzianum* (Δ EPL1) gerou uma boa adaptação do *Trichoderma* a possíveis agressores como os fitopatógenos. Além disso, observou-se que *T. harzianum* deletado com a proteína Epl-1 está envolvida no reconhecimento de hifa e no processo de enovelamento de fitopatógenos (GOMES et al., 2017; GOMES et al., 2015).



Figura 5: Isolado de *Trichoderma harzianum* mutante Δ EPL1. Fonte: Próprio autor (2018).

O *Trichoderma asperellum* possui características como conídios de tom verde escuro, formato globoso ou ovóide (Figura 6). Conidióforos férteis, simétricos, medindo (em média) 3,3 micrômetros de largura, com aspecto de pluma. Cada conidióforo tem ramos laterais emparelhados, com duas ou mais fiáldes retas na extremidade. A espécie forma colônias de aspecto cotonoso, coloração esverdeada (mais escura no centro) e pode ter tons mais claros, formam anéis concêntricos. Estudos demonstram a atividade do *Trichoderma asperellum* no controle biológico em doenças na semente do arroz, combatendo vários fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* (TRILLAS et al., 2006; WATANABE et al., 2006; COTXARRERA et al., 2001).



Figura 6: Isolado de *Trichoderma asperellum*. Fonte: Próprio autor (2018).

Trichoderma reesei está entre os fungos do gênero *Trichoderma* mais estudados durante anos (Figura 7). Tem a capacidade de secretar grandes quantidades de enzimas celulolíticas (celulases e hemicelulases). As celulases microbianas têm aplicação industrial na conversão de celulose, um dos principais componentes da biomassa vegetal, em glicose (SEHNEM et al., 2006; LEJEUNE; NIELSEN; BARON, 1995). Sua atividade micoparasita é pouco entendida portanto é interessante a comparação dos componentes da parede dessa espécie de *Trichoderma* com outra como por exemplo o *T. harzianum* e *T. asperellum*.



Figura 7: Isolado de *Trichoderma reesei*. Fonte: Próprio autor (2018).

Algumas características tornam os fungos *Trichoderma* bastante únicos, os mesmos caracterizam-se por utilizar uma grande variedade de compostos como fonte de carbono e nitrogênio, além de características de tolerância a vários tipos de fungicidas diferentes e resistentes a inibidores produzidos por outros microrganismos (KULLNING et al., 2000). Sua principal característica baseia-se no controle biológico de fitopatógenos que é estudado por vários pesquisadores (DIAZ; GONZALES, 2017; QUALHATO et al., 2013; LOPES et al., 2012; MONTEIRO et al., 2010).

O controle biológico é baseado no uso de microrganismos antagonistas, sendo uma das alternativas no combate a fitopatógenos (BENÍTEZ et al., 2004). Devido a essa característica espécies de *Trichoderma* tem papel fundamental na agricultura favorecendo o crescimento de plantas, aumentando a disponibilidade de nutrientes, produzindo e aumentando a resistência a doenças, além de ser utilizado no controle biológico como uma alternativa natural, reduzindo a utilização de pesticidas químicos (WOO et al., 2014; HARMAN et al., 2004). O controle biológico de fitopatógenos pode ocorrer através de vários mecanismos, dentre os quais os mais relevantes são:

micoparasitismo, antibiose, indução de resistência, competição e produção de enzimas hidrolíticas capaz de hidrolisar parede celular do fitopatógeno (KUBICEK et al., 2001).

O micoparasitismo é sem dúvida o evento mais característico das espécies de *Trichoderma*. 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 (Figura 8); (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 que hidrolisam a parede celular do fungo hospedeiro, dentre elas destacam-se as β -1,3-glicanases, quitinases e proteases (VINALE et al., 2008)



Figura 8: MEV mostrando o modo de enrolamento de *Trichoderma harzianum* sobre a hifa de *Rhizoctonia solani*. Fonte: ELAD; BARAK; CHET (1983).

Antibiose é um mecanismo pelo qual certos microrganismos respondem à presença de outros, secretando compostos ou metabólitos capazes de inibir ou impedir o seu desenvolvimento, esses metabólitos secretados são denominados antibióticos (MARQUES; MARTINS; MELLO, 2018; AMORIM; REZENDE; BERGAMIN, 2011). A antibiose se enquadra dentro dos efeitos diretos do mecanismo geral de biocontrole de *Trichoderma* sobre os fitopatógenos, produzindo antibióticos voláteis e não-voláteis (VITERBO et al., 2002).

Um mecanismo de controle biológico indireto é a indução de resistência, onde os fungos ajudam às plantas através de mecanismos latentes de resistência a agressão de

patógenos. Esse processo ocorre quando as plantas têm seu mecanismo de defesa ativado pelo *Trichoderma*, quando expostas a agentes indutores, bióticos ou abióticos (TROIAN, 2014). A indução de resistência é provavelmente um mecanismo de regulação que levam em conta as vias de sinalização, onde os hormônios das plantas ocupam um importante papel. Estudos demonstram que as vias de sinalização podem ser alteradas após a colonização do *Trichoderma*, induzindo respostas eficientes e mais rápidas a infecções patogênicas (MARTINÉZ-MEDINA et al., 2013)

Outra forma de defesa para os agentes de controle biológico é a competição, considerada pré-requisito para qualquer controlador biológico, ou seja, o agente controlador deve crescer de maneira mais eficiente que o patógeno, fazendo assim um controle adequado (AMORIM, REZENDE; BERGAMIN, 2011). Segundo Bettiol e Ghini (1995), competição, refere-se à interação entre dois ou mais organismos que estão empenhados numa mesma ação, disputando recursos específicos, tais como espaço, nutrientes, água e luz. Um dos maiores exemplos de competição são espécies de *Trichoderma* capazes de mobilizar e absorver os nutrientes a sua volta, além de utilizarem diferentes fontes de carbono, fazendo com que se multipliquem mais rapidamente e colonizem a rizosfera (HARMAN et al., 2004).

Trichoderma secreta enzimas degradadoras de parede celular como β -1,3-glicanases, quitinases e proteases, durante o processo de micoparasitismo. Essas enzimas hidrolisam a parede celular do fungo hospedeiro liberando oligômeros da parede celular do patógeno, ativando a expressão de genes envolvidos no micoparasitismo (MARCELLO, 2008). Essas secreções de enzimas relacionadas ao processo de micoparasitismo variam de acordo com a composição da parede dos fitopatógenos. Em geral a parede desses fungos é composta por β -1,3-glicanas, quitinas e algumas proteínas (ALMEIDA et al., 2007; FONTAINE et al., 2000).

As β -1,3-glicanases são enzimas que catalisam a hidrólise da cadeia de β -1,3-glicana, polímero constituído de resíduos de D-glicose ligados em uma configuração β -1,3. Podem ser encontrados na forma de Exo- β -1,3-glicana e Endo- β -1,3-glicana. Suas principais funções estão relacionadas com a autólise celular. Para os fungos micoparasíticos, servem como uma arma bioquímica primária para a degradação da parede celular do parasita (RIBEIRO, 2017; BAUERMEISTER et al., 2010).

Quitinases são endoglicosil-hidrolases que clivam ligações glicosídicas da quitina, que é um polissacarídeo linear, formado por unidades de N-acetilglicosamina unidas por ligações do tipo β -1-4. Na agricultura é muito utilizada na

produção de biopesticidas e na inibição de fitopatógenos. As quitinases são bastante produzidas por isolados de *Trichoderma* em diferentes meios de cultivo, que servem como meio de crescimento e indução para a produção dessas enzimas (TING; CHAI, 2015).

Devido a todas essas características como agente de biocontrole o fungo *Trichoderma* e seus mecanismos de controle, se tornaram objetos dos mais variados estudos para a área agrícola. Principalmente sua característica antagonista contra os mais variados tipos de fungos como *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* (QUALHATO et al., 2013; LOPES et al., 2012; MONTEIRO et al., 2010).

1.4 – Os Fungos Fitopatógenos

Atualmente um grande problema que acomete as lavouras no Brasil são as doenças provocadas pelos fungos fitopatogênicos “de solo”, sendo que anualmente milhões de dólares são gastos no seu controle (PERIPOLLI; MARTINELLI; DELATORRE, 2018). Nas lavouras brasileiras, infecções causadas por patógenos “de solo” como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*, causam perdas de até 100% na produção principalmente de feijão e batata, cultivadas nos cerrados (FREIRE, 2015; CAFÉ FILHO; LOBO, 2000; HALL; NASSER, 1996). Estes fungos são grandes parasitas, em geral polífagos, que apresentam uma alta capacidade colonizadora de resíduos vegetais no solo, além de utilizarem matéria orgânica como substrato (POLETTTO et al., 2006).

Os fitopatógenos podem causar doenças em plantas como a Fusariose, que são causadas por fungos do gênero *Fusarium*, sendo uma das principais pragas do trigo e promovem uma grande perda na produção destes grãos em várias áreas da China e no Brasil (PANISSON; REIS; BOLLER, 2003; JIANXIN et al., 2002). Levando em conta os requerimentos nutricionais os fungos fitopatogênicos podem ser divididos em dois grupos: biotróficos e necrotróficos. Os biotróficos são fungos que retiram nutrientes de tecidos vivos. Os fungos necrotróficos têm habilidades de extrair nutrientes de tecidos mortos diferentemente dos biotróficos, sua ação se dá pela produção de enzimas e toxinas (REIS; ZOLDAN; GERMANO, 2018).

O fungo filamentoso *Sclerotinia sclerotiorum* se desenvolve no solo e causa doenças conhecidas como mofo branco e podridão mole, que atinge várias espécies de plantas como feijão e soja (BATISTA et al., 2011). Característica como a formação de

escleródios tornam esse fungo bastante patogênico para as plantas (Figura 9). O escleródio consiste em uma massa compacta de hifa hialina entrelaçada, envolvida por uma camada de células com pigmentos negros. O escleródio possui estrutura dura e resistente. Possui em seu interior uma medula rica em glicanas e proteínas, revestidas por uma casca que contém pigmentos de melanina, os quais são resistentes a degradação. Devido a esse processo de formação de escleródio pesquisadores vem buscando alternativas para combatê-lo, dessa maneira tem-se observado a atuação do *Trichoderma* como inibidor de crescimento deste fungo (ABDULLAH; ALI; SULEMAN, 2008). O fungo apresenta uma distribuição mundial em regiões temperadas, tropicais e subtropicais. No Brasil está predominante no estado de Goiás, sendo responsáveis por inúmeros prejuízos na lavoura de feijão e soja (BETTIOL; MORANDI, 2009; LEITE, 2005).



Figura 9: Isolado de *Sclerotinia sclerotiorum*. A estrutura apontada pela seta vermelha é o escleródio. Fonte: Próprio autor (2018).

Os fungos do gênero *Fusarium* possuem uma distribuição mundial, prevalecendo em regiões mais tropicais, podendo estar presentes em todos os tipos de solos (Figura 10). Os fungos desse gênero podem ser patogênicos ou não-patogênicos, sendo que ambos são colonizadores extremamente eficientes da rizosfera (GORDON; MARTYN, 1997). Esse fungo pode viver de maneira saprófita por vários anos, ou seja, sem colonizar um hospedeiro específico. Esse gênero tem em seu histórico ataques a diversas culturas de grande relevância econômica, como tomate, banana, pimenta, berinjela, feijão, girassol, trigo e milho (FORTUNATO; RODRIGUES; NASCIMENTO, 2012; PERALDI et al., 2011;). No Brasil o fungo está presente principalmente na região Sudeste e Centro Oeste, onde o plantio da cultura de feijão é intenso (TEIXEIRA et al., 2009).

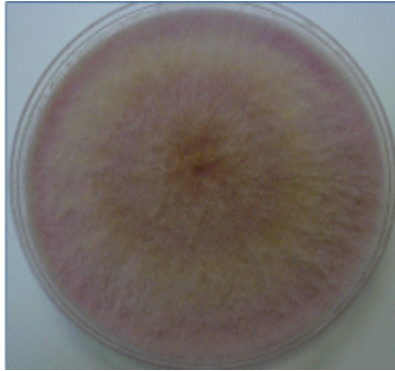


Figura 10: Isolado de *Fusarium oxysporum*. Fonte: Próprio autor (2018).

Rhizoctonia solani é uma espécie de fungo saprófita que pode viver no solo sob a forma de micélio ou sob a forma de escleródio (Figura 11). É extremamente patogênico para plantas e podem atacar culturas de repolho, batata, feijão e eucalipto. Dentre os principais danos causados estão o aparecimento de cancrios na superfície do caule, manchas negras e podridão radicular. Geralmente atuam em ambientes com temperatura elevada e com alto teor de umidade. Pesquisadores têm demonstrado que o gênero *Trichoderma* pode ser utilizado em programas de biocontrole, parasitando hifas e escleródios de *Rhizoctonia*, podendo reduzir sua sobrevivência (QUALHATO, 2013; LUCON et al., 2009; CHET, 1987).

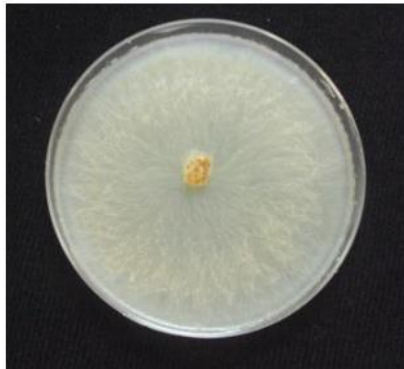


Figura 11: Isolado de *Rhizoctonia solani*. Fonte: Próprio autor (2018).

2 – JUSTIFICATIVA

Uma das principais preocupações na área agrícola é o controle de doenças de plantas, que é realizado predominantemente por uso de pesticidas químicos. Porém vários estudos têm demonstrado os efeitos negativos ao ecossistema gerado por essa prática, além da toxicidade gerada com esses produtos, com isso a agricultura moderna vem buscando tecnologias sustentáveis e efetivas no manejo de cultura, buscando cada vez mais soluções naturais para combater essas fitopatologias. Uma alternativa que tem crescido nos últimos anos é a utilização de fungos como controle biológico, que se mostra bastante eficiente no combate desses patógenos (WOO et al., 2014).

Estudos com o fungo *Trichoderma* têm demonstrado que o mesmo tem potencial como agente de controle biológico, capaz de atuar contra fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* através da produção de enzimas líticas e antibióticos voláteis e não-voláteis. Sabe-se que a produção dessas enzimas e antibióticos está diretamente relacionada com a constituição natural dos fungos, principalmente a constituição da parede celular (TROIAN, 2014).

Nos últimos anos vários pesquisadores se dedicaram ao estudo da parede celular de algumas espécies de fungos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Neurospora crassa* (BOWMAN; FREE, 2006; FRANÇOIS, 2006).

O estudo dos componentes da parede celular de *Trichoderma* e de fitopatógenos contribuirá para uma melhor compreensão dos constituintes da parede celular destes, bem como, a dinâmica dos componentes da parede celular de espécies de *Trichoderma* no mecanismo de micoparasitismo.

3 - OBJETIVO

3.1 – Objetivo geral

- Analisar glicanas e quitinas das paredes celulares de espécies de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. reesei*, do mutante de *T. harzianum* Δ EPL1) bem como análise da relação desses açúcares no pareamento com fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

3.2 – Objetivos específicos

- Obter os micélios dos fungos;
- Realizar o pareamento dos fungos *Trichoderma* com fitopatógenos;
- Extração das proteínas das paredes fúngicas;
- Extração dos polissacarídeos das paredes dos fungos;
- Analisar a composição de polissacarídeos das paredes dos fungos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Determinar os açúcares totais da parede celular;
- Determinar quitina da parede celular;
- Determinar glicana da parede celular;
- Determinar proteínas totais da parede celular;
- Determinar enzimas glicanases e quitinases da parede celular;

4 - METODOLOGIA

4.1 – Isolados e condições de cultivo dos fungos

Os fungos *T. harzianum* selvagem (ALL42), *T. harzianum* mutante (Δ EPL1), *T. asperellum* (T00) e *T. reesei* (9414) foram obtidos da coleção do Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Goiás (UFG) e do laboratório de Biotecnologia Molecular da Universidade de São Paulo (USP). Os fungos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* (FO), *Sclerotinia sclerotiorum* (SS) e *Rhizoctonia solani* (RS) foram obtidos da coleção da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Arroz e Feijão (Santo Antônio - Goiás). Os fungos foram mantidos em repiques periódicos em meio de cultura BDA, e crescido em estufa incubadora BOD, a 28°C por 7 dias e armazenados em geladeira a 4°C.

4.2 – Obtenção dos micélios

Os micélios foram obtidos com adição de um disco de 5 mm de cada isolado em uma placa de petri contendo meio BDA recoberto com papel celofane. As culturas foram incubadas em estufa BOD por 7 dias a 28°C. Após o crescimento dos fungos, os micélios foram raspados e armazenados em freezer -20°C para análises posteriores.

4.3- Pareamento dos isolados de *Trichoderma* com os fitopatógenos

O pareamento entre os isolados de *Trichoderma* e os fitopatógenos foi realizado colocando discos de 5 mm das culturas em lados opostos em placas de petri contendo meio BDA recoberto com membranas estéreis de celofane como descrito por Bell et al., (1992). Assim, as placas continham de um lado da margem da placa de petri um dos isolados de *Trichoderma* e na outra margem da placa de petri um dos isolados dos fitopatógenos. As placas de petri foram incubadas em estufa BOD a 28°C e após o encontro das duas culturas, o que ocorreu em aproximadamente 72 horas, o micélio de cada um dos isolados de *Trichoderma* foi raspado e armazenado em freezer -20°C para análises posteriores.

4.4 - Obtenção do extrato protéico das paredes celulares

A 6 gramas de micélio, foram adicionados 1 mL de solução de PMSF 1mM. Macerados com nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo. Em seguida foi adicionado uma solução de uréia 8 M. Os extratos da parede foram centrifugados por 20 minutos sob rotação de 10.000 rpm. O sobrenadante foi recolhido e o precipitado lavado com uma solução de hidróxido de amônio 1 M. Os micélios foram centrifugados por 30 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante foi recolhido. O precipitado da última lavagem foi ressuspenso em ácido fórmico 0,5 M e novamente centrifugado por 15 minutos a 10.000 rpm, e o sobrenadante recolhido. O precipitado obtido nessa última fase foi utilizado para extração de carboidratos. Todos os sobrenadantes recolhidos de cada etapa foram reunidos em uma única fração e armazenados em freezer -20°C para análises protéica e enzimática.

4.5 - Extração dos Carboidratos da parede celular

A etapa de extração de carboidratos foi realizada de acordo com metodologia descrita por Cantu et al, 2009, com modificações. Um grama de micélio seco foi adicionado em 25 mL de etanol 100%, o material foi fervido por 30 minutos. Em seguida o material foi centrifugado por 30 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 20 mL de clorofórmio: metanol (1:1 v/v) e 20 mL de acetona, obtendo a fração AIS (Sólidos Insolúveis em Álcool). O AIS foi seco durante a noite a 37°C. A extração alcalina a quente foi realizada fervendo 100 mg de AIS em 25 mL de NaOH 1M a 65°C por 30 minutos. O material foi centrifugado a 6000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi guardado (ALS – Sólidos solúveis em Alcalis) e o precipitado foi novamente aquecido com NaOH 1M e centrifugado, obtendo ao final o ALI (Sólidos Insolúveis em Alcalis).

Uma segunda extração de carboidratos foi realizada de acordo com metodologia descrita por François (2006). O micélio seco foi pesado e umedecido com ácido sulfúrico 72%. Em seguida o tubo contendo a amostra foi mantido em temperatura ambiente por 3 horas. Após essa etapa o tubo foi diluído com ácido sulfúrico 2 M e incubado por 4 horas em banho Maria a 100 °C. O tubo foi lavado com água Mili-Q. A Neutralização da solução ácida foi realizada pela adição de hidróxido de bário na concentração de 40g/L. A solução foi deixada em completa precipitação durante a noite a 4°C.

No final o conjunto de todas as extrações foram unidas e liofilizadas para a realização das análises de posteriores.

4.5.1 - Extração de Quitina da parede celular

A extração de quitina foi realizada de acordo com metodologia de François (2006). Foi pesado 25 mg de micélio seco e ressuspenso em KOH 6% e incubado a 80 °C por 90 minutos. Em seguida foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos. O pellet foi ressuspenso em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,5. Em seguida foi adicionado “Lysing Enzyme” e a amostra incubada a 37°C por 6 horas com agitação constante.

4.6 - Determinação de Carboidratos da parede celular

4.6.1 - Determinação de Carboidratos da parede por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Após a extração de carboidratos da parede celular 30 µl da amostra foi utilizado para quantificação de açúcares por CLAE. Os açúcares foram analisados num sistema da série “Young Lin” YL9100, equipado com um detector de índice de refração. As amostras foram adicionadas em uma coluna “PHENOMENEX” a 85°C e eluídas com ácido sulfúrico 50 mM a um fluxo de 1,5 mL/min. Glicanas e quitinas foram quantificadas baseadas no conteúdo de glicose e N-acetilglicosamina respectivamente. As dosagens dos carboidratos da parede foram realizadas na Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto.

4.6.2–Determinação dos açúcares totais da parede celular

Foram pesadas 0,5 g da amostra e transferidas para tubo de ensaio de vidro. Em seguida foi adicionado 2 mL de água destilada e 0,5 mL de solução de fenol 5% e agitado levemente. Foi adicionado 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado e agitado levemente. Logo após a amostra foi incubada a 15 minutos em temperatura ambiente para resfriamento da solução. Uma curva padrão foi construída utilizando glicose como padrão soluções de 0,25; 0,50; 1,0; 1,5 e 2 mM. O ensaio foi realizado em espectrofotômetro GEHAKA® no comprimento de onda de 485 nm.

4.6.3 - Determinação de glicana da parede celular

Para a dosagem de glicana foi utilizado o reagente bioquímico glicose enzimática líquida “Glucox”. O ensaio foi realizado em espectrofotômetro GEHAKA®. Para isso, a reação foi desenvolvida com a adição de 10 µl de cada uma das amostras, e em seguida foi adicionado o reagente de cor e incubado a 37°C por 5 minutos. As análises foram realizadas em triplicatas e as amostras foram lidas a 510 nm.

4.6.4 - Determinação de quitina da parede celular

O ensaio foi realizado em microplacas de elisa. Para isso, a reação foi desenvolvida com a adição de 10 µl de cada uma das amostras, e em seguida foi adicionado tetraborato de potássio pH 9,2 e incubado a 100°C por 10 minutos. As amostras foram resfriadas a 4°C por 1 minuto. Logo após foi adicionado DMAB 1X e incubada a 37°C por 20 minutos. As análises foram realizadas em triplicatas e as amostras foram lidas em uma leitora de microplacas “Expert Plus” BIOCHROM® a 585nm.

A solução de *p*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB), foi preparada pela dissolução de 1 g de DMAB em 100 mL de solução, contendo 87,5 mL de ácido acético glacial e 12,5 mL de ácido clorídrico 10 M (FRANÇOIS, 2006). Uma curva padrão foi construída tendo como padrão N-acetilglicosamina, variando de 0,25 mM a 2 mM (LOBO ET AL., 2013; KUMAR; HANSEN, 1972; REISSIG; STROMINGER; LE LOIR, 1955).

4.7 – Determinação das proteínas da parede celular

A dosagem de proteínas foi executada segundo metodologia de Bradford (1976). Em microplacas foi adicionado 10 µl da amostra e 200 µl do reagente de Bradford e o material foi incubado em temperatura ambiente por 15 minutos. Uma curva padrão de proteína com albumina de soro bovino foi construída nas concentrações entre 0–1 mg/mL. As análises foram realizadas em triplicatas e as amostras foram lidas em uma leitora de microplacas “Expert Plus” BIOCHROM® a 595nm.

4.8 – Determinação das enzimas da parede celular

4.8.1 – Determinação de Exo β -1,3-glicanase

A atividade enzimática foi determinada pela quantificação de açúcares redutores liberados pela mistura de 10 μ L da amostra com 200 μ L de tampão acetato de sódio (50 mmol L⁻¹ pH 5.0) contendo 1% de laminarina (SANTOS et al., 1977). Incubado a 40° C por 15 minutos e interrompida a reação com a adição de 100 μ L de solução de ADNS e fervido por 5 minutos. A concentração de açúcar redutor foi determinada por (MILLER, 1959) utilizando glicose como padrão. As análises foram realizadas em triplicatas e as amostras foram lidas em uma leitora de microplacas “Expert Plus” BIOCHROM® a 550nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto de reação.

4.8.2 – Determinação de Endo β -1,3-glicanase

A atividade enzimática foi determinada pela quantificação de açúcares redutores liberados pela mistura de 10 μ L da amostra com 200 μ L de tampão acetato de sódio (50 mmol L⁻¹ pH 5.0) contendo 1% de liquenana (SANTOS et al., 1977). Incubado a 40° C por 15 minutos e interrompida a reação com a adição de 100 μ L de solução de ADNS e fervido por 5 minutos. A concentração de açúcar redutor foi determinada por (MILLER, 1959) utilizando glicose como padrão. As análises foram realizadas em triplicatas e as amostras foram lidas em uma leitora de microplacas “Expert Plus” BIOCHROM® a 550nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto de reação.

4.8.3 – Determinação de quitinase

A atividade enzimática foi determinada em microplaca pela mistura de 10 μ L da amostra, 40 μ L de substrato (PNP-NAG 5mmol) e 100 μ L de tampão acetato de sódio (50 mmol L⁻¹ pH 5.0) e incubadas a 37°C por 15 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 100 μ L de carbonato de sódio. A concentração de PNP liberada foi determinada por leitora de microplacas “Expert Plus” BIOCHROM® a 405nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μ mol de PNP por minuto de reação.

5 - RESULTADOS

5.1 – Composição de glicanas e quitinas da parede celular de isolados de *Trichoderma* e de fitopatógenos e análise comparativa de glicanas e quitinas da parede de *Trichoderma* em pareamento por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizada para analisar a concentração dos polissacarídeos glicanas e quitinas dos isolados de *Trichoderma* e fitopatógenos (Tabela 2). As glicanas são polissacarídeos formados a partir de unidades de glicose. Nos cromatogramas em ANEXO, observa-se que a glicose apresentou um tempo de retenção de aproximadamente 12 minutos para todos os isolados. Em relação à quitina pode-se observar a presença de oligossacarídeos de quitobiose como pentacetil e diacetil com tempos retenção entre 6 a 8 minutos. Com tempo de retenção de 17 minutos pode-se observar a presença de N-acetilglicosamina, a quitina é um polímero de N-acetilglicosamina. Para os fitopatógenos pode-se observar que os mesmos compostos relacionados à glicanas e quitinas apresentaram os mesmos tempos de retenção, porém, a parede celular do fitopatógeno *Fusarium oxysporum* apresentou linha de base bem abaixo em relação aos outros fitopatógenos.

De acordo com (Tabela 2), observa-se que há um predomínio de glicanas e quitinas maior em fitopatógenos do que nos isolados de *Trichoderma*. Os fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani* apresentaram um valor de glicanas em torno de 50% e o *Fusarium oxysporum* uma concentração de glicana de 44%. Os valores de quitina dos fitopatógenos *Sclerotinia* e *Rhizoctonia* foram 56 e 50 % respectivamente. Os valores de quitina dos *Fusarium oxysporum* foram de 42%. Dentre os fitopatógenos o que mais apresentou quitina e glicana foi a *Sclerotinia sclerotiorum*.

Dentre os fungos *Trichoderma* observa-se que os teores de glicanas foram superiores ao conteúdo de quitinas. Sendo que o *Trichoderma harzianum* apresentou o maior conteúdo de glicana aproximadamente 28% e conteúdo de quitina de aproximadamente 20%. Dentre os isolados o que apresentou um menor conteúdo de quitina foi o *Trichoderma reesei* com concentração de glicana de aproximadamente 23% e quitina de 18%. Além de determinar a presença de glicanas e quitinas na amostra, podemos observar uma variação desses componentes da parede, indicando que

ocorre uma mudança dos constituintes quando comparado com outras espécies e gêneros.

Tabela 2: Concentração de glicanas e quitinas (%) na parede celular dos isolados de *Trichoderma* e dos fitopatógenos.

Isolados	Glicana (%)	Quitina (%)
<i>Trichoderma harzianum</i>	28	20
<i>T. harzianum</i> mutante (Δ EPL1)	25	20
<i>T. asperellum</i>	27	20
<i>T. reesei</i>	23	18
<i>Fusarium oxysporum</i>	44	42
<i>Rhizoctonia solani</i>	50	50
<i>Sclerotinea sclerotiorum</i>	50	56

Também foi analisada a composição de glicanas e quitinas no pareamento entre os isolados de *Trichoderma* e os fitopatógenos utilizados nesse estudo. Nos cromatogramas em ANEXO, observa-se que a glicose apresentou um tempo de retenção de aproximadamente 12 minutos para todos os isolados. Em relação à quitina pode-se observar a presença de oligossacarídeos de quitobiose como pentacetil e triacetil com tempos retenção entre 6 a 8 minutos. Com tempo de retenção de 17 minutos pode-se observar a presença de N-acetilglicosamina, a quitina é um polímero de N-acetilglicosamina.

Podemos observar que existe uma mudança dos componentes da parede celular dos fungos *Trichoderma* quando os mesmos são colocados em confronto com fitopatógenos (Tabela 3). O isolado de *Trichoderma harzianum* apresentou conteúdo de glicana e quitina de 50 e 48% respectivamente em confronto com a *Sclerotinea*. Quando comparados com o controle a composição de glicanas e quitinas praticamente dobram.

Observa-se que o fungo *Trichoderma harzianum* mutante (Δ EPL1) apresenta a mesma característica dos componentes de parede quando comparados com o ALL42, onde podemos observar valores de quitinas e glicanas maiores quando o mesmo está em contato com fitopatógenos. Observando uma duplicação do valor dos seus componentes

de parede quando comparados como confronto com a *Sclerotinia*, onde apresentou valores de glicanas e quitinas de 57 e 50% respectivamente.

Quando observamos os fungos *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma reesei*, nota-se que os componentes da parede se alteram quando estão em confrontos, entretanto houve um aumento maior de glicanas e quitinas quando os mesmos estavam em confrontos com *Fusarium oxysporum*. Sendo que o *Trichoderma asperellum* apresentou quantidade de glicanas e quitinas de 50 e 47% respectivamente e o *T. reesei* uma quantidade de glicanas e quitinas de 48 e 44%.

Tabela 3: Concentração de glicanas e quitinas (%) na parede celular dos isolados de *Trichoderma harzianum* (ALL42), *T. harzianum* mutante (Δ EPL1), *T. asperellum* (T00) e *T. reesei* (9414) em pareamento com os fitopatógenos *Fusarium oxysporum* (FO), *Rhizoctonia solani* (RS) e *Sclerotinea sclerotiorum* (SS).

Isolados em pareamento	Glicana (%)	Quitina (%)
ALL42 X FO	48	38
ALL42 X RS	50	47
ALL42 X SS	50	48
Δ EPL1 X FO	54	50
Δ EPL1 X RS	50	45
Δ EPL1 X SS	57	50
T00 X FO	50	47
T00 X RS	46	38
T00 X SS	45	37
9414 X FO	48	40
9414 X RS	55	48
9414 X SS	50	47

5.2 - Determinação da concentração de açúcares totais

De acordo com a (Figura 12), o isolado *Trichoderma asperellum* possui uma maior concentração de açúcares totais do que os fungos *Trichoderma harzianum* e *T. reesei*. Comparando as (figuras 12 e 13) nota-se que a composição dos açúcares totais alteram-se quando os fungos *Trichoderma* estão em contato com fitopatógenos.

Na figura 13 observa-se que o *Trichoderma harzianum* possui uma maior concentração de açúcares totais quando está em confronto com a *Sclerotinia*. Além disso, observa-se que os fungos *Trichoderma harzianum* mutante, *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma reesei* possuem uma maior concentração de açúcares totais quando estão em contato com o *Fusarium oxysporum*.

Podemos observar que os fungos *T. harzianum*, *T. harzianum* mutante e *T. reesei* possuem uma menor proporção de açúcares totais em contato com a *Rhizoctonia solani*. Dentre os isolados de *Trichoderma* o que não apresentou uma baixa concentração de açúcares totais quando em antagonismo com *Rhizoctonia* foi o *T. asperellum* (Figura 13), sugerindo uma resistência maior do *T. asperellum* ao isolado de *Rhizoctonia*.

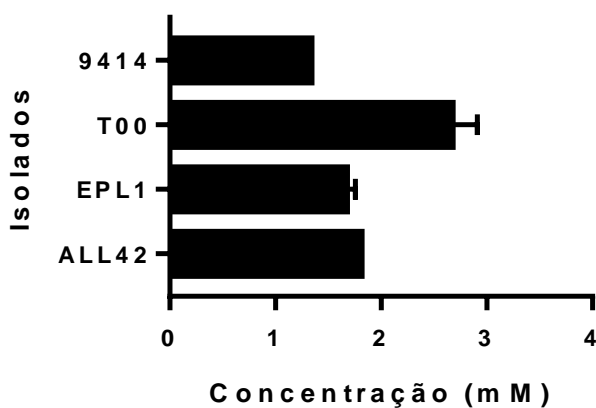


Figura 12: Comparação de açúcares totais na parede celular do *Trichoderma harzianum* (ALL42), *Trichoderma harzianum* mutante (EPL1), *Trichoderma asperellum* (T00) e *Trichoderma reesei* (9414).

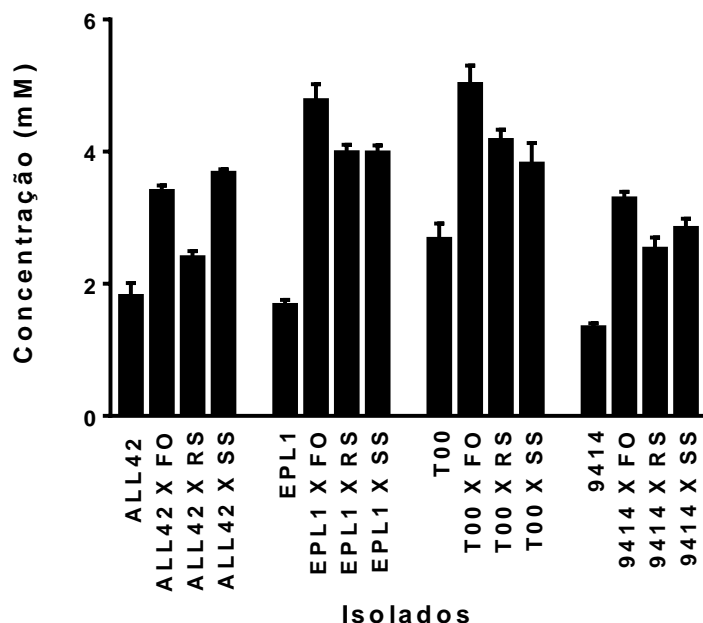


Figura 13: Comparação de açúcares totais na parede celular do *Trichoderma harzianum* (ALL42), *T. harzianum* mutante (Δ EPL1), *T. asperellum* (T00) e *T. reesei*(9414) quando o mesmo encontra-se em pareamento com os fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum* (SS), *Rhizoctonia solani* (RS) e *Fusarium oxysporum* (FO).

5.3 - Determinação da concentração de glicanas e quitina

As dosagens diretas de glicanas e quitinas, oriundas das moléculas de glicose e N-acetilglicosamina, estão descritas abaixo nas (figuras 14 e 15).

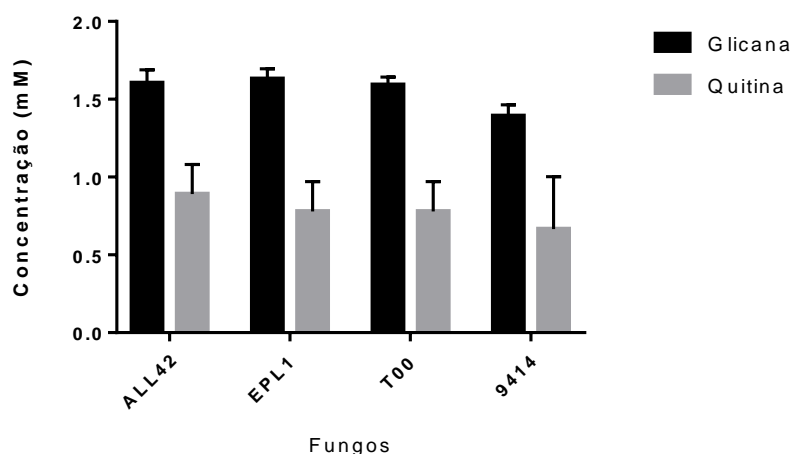


Figura 14- Determinação de concentração de glicanas e quitina na parede celular dos fungos *Trichoderma harzianum* (ALL42), *Trichoderma harzianum* mutante (EPL1), *Trichoderma asperellum* (T00) e *Trichoderma reesei* (9414).

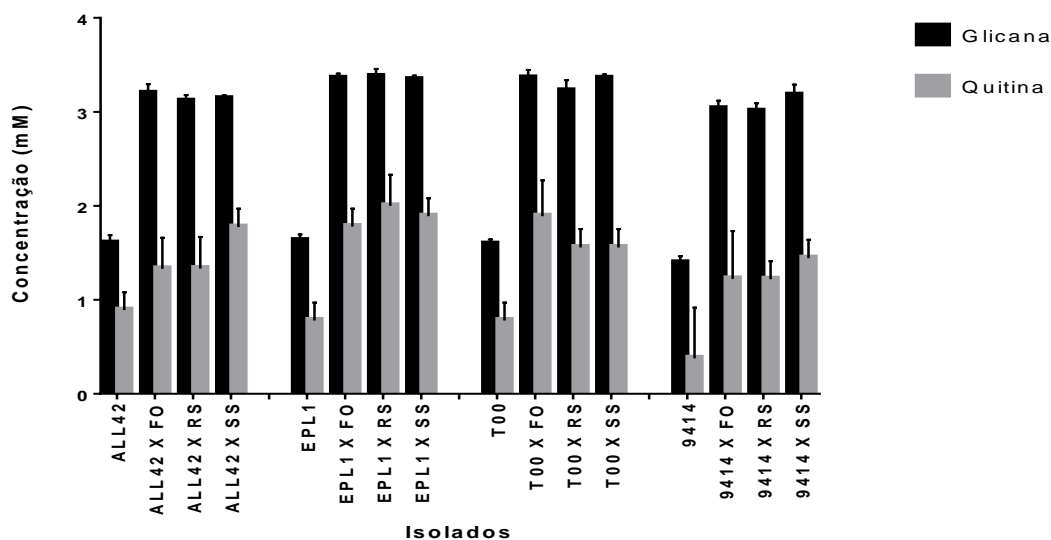


Figura 15: Determinação de concentração de glicanas e quitina na parede celular dos fungos *Trichoderma harzianum* (ALL42), *T. harzianum* mutante (Δ EPL1), *T. asperellum* (T00) e *T. reesei*(9414) quando o mesmo encontra-se em pareamento com os fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum* (SS), *Rhizoctonia solani* (RS) e *Fusarium oxysporum* (FO).

Observa-se que os isolados de *Trichoderma* utilizados nesse estudo (Figura 14) apresentam parede celular com maior conteúdo de glicanas do que quitina. O fungo *Trichoderma reesei* (9414) apresenta dentre os isolados, menor conteúdo de glicana e quitina. Variações de conteúdo de glicanas e quitinas entre diferentes espécies de fungos são encontradas e são responsáveis pelas características físicas e químicas na parede celular. Nota-se que o mutante de *Trichoderma harzianum* (Δ EPL1) apresenta ligeira queda em seu conteúdo de quitina, porém, mantendo a mesma quantidade de glicanas do selvagem (*Trichoderma harzianum* ALL42). É provável que a deleção do gene EPL-1, que codifica uma proteína conhecida como Sm1/Epl-1 liberada nos estágios iniciais do desenvolvimento de fungos filamentosos, pode ter interferido na síntese de quitinas.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 15), observou-se um crescimento dos componentes da parede celular quando os fungos *Trichoderma* estão em contato

com fitopatógenos. O aumento dos componentes na parede celular pode estar fortemente relacionado ao processo de micoparasitismo. Observamos que a quantidade de glicanas da parede celular dos isolados de *Trichoderma* quando estão em contato com fitopatógenos são semelhantes entre si, diferindo apenas na quantidade de quitina. Na figura 15, observamos que o fungo *Trichoderma harzianum* apresenta níveis de quitina maiores quando o isolado está em contato com o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Além disso, observamos que o fungo *Trichoderma harzianum* mutante aumenta os níveis de quitina da parede celular quando o fungo está em contato com o fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Observamos que o fungo *T. asperellum* quando está em contato com o fitopatógeno *Fusarium oxysporum* aumenta o nível de quitina. Quando observamos o *Trichoderma reesei* notamos que os níveis de quitinas estão iguais quando estão em contato com todos os fitopatógenos.

O aumento da concentração de quitinas e glicanas na parede, provavelmente estão relacionados com o processo de micoparasitismo, ou seja, quanto maior a concentração de quitinas e glicanas ocorrem uma maior produção de enzimas quitinases e glicanases e conseqüentemente um melhor combate a fitopatógenos.

5.4 - Determinação de proteínas totais da parede celular

A parede celular é rica em proteínas, podendo ser encontradas conjugadas com vários tipos de carboidratos formando os glicoconjugados.

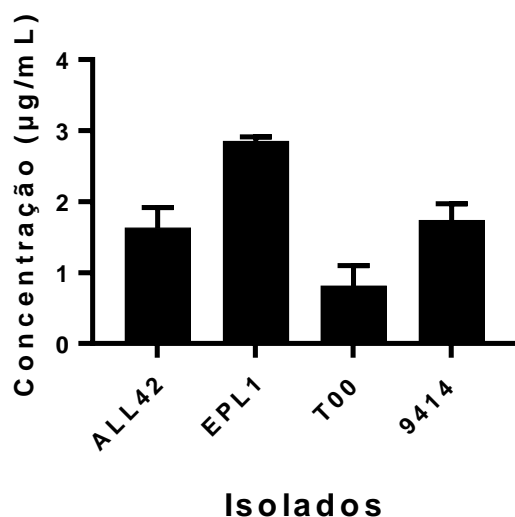


Figura 16: Determinação de concentração de proteínas totais na parede celular dos fungos *Trichoderma harzianum* (ALL42), *Trichoderma harzianum* mutante (EPL1), *Trichoderma asperellum* (T00) e *Trichoderma reesei* (9414).

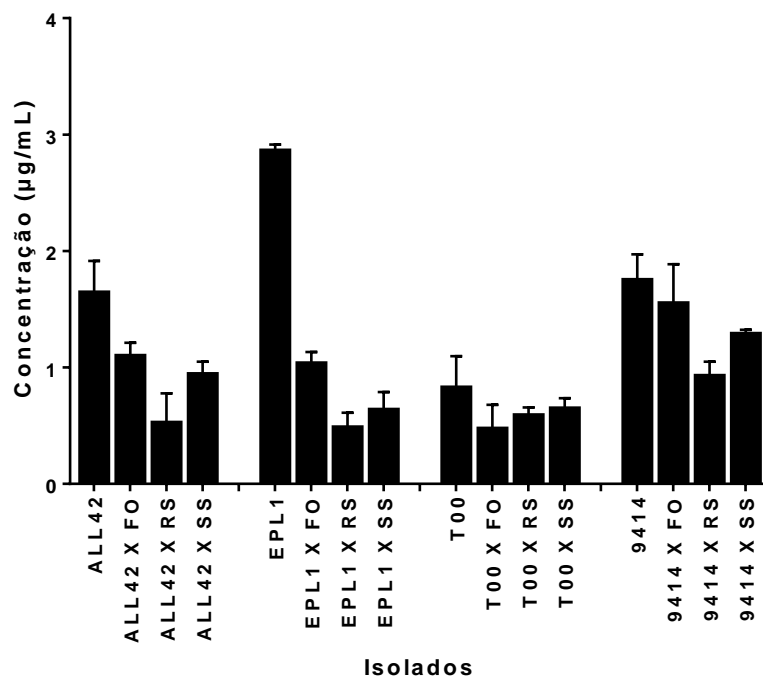


Figura 17: Determinação de concentração de proteínas totais na parede celular dos fungos *Trichoderma harzianum* (ALL42), *T. harzianum* mutante (Δ EPL1), *T. asperellum* (T00) e *T. reesei*(9414) quando o mesmo encontra-se em pareamento com os fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum* (SS), *Rhizoctonia solani* (RS) e *Fusarium oxysporum* (FO).

Dentre os fungos analisados observou-se que o fungo *Trichoderma harzianum* mutante (Figura 16), apresentou maior concentração de proteínas totais e o fungo *T. asperellum* apresentou uma menor concentração de proteínas totais.

De acordo com as figuras acima (Figura 16 e 17), observa-se que há uma diminuição das proteínas na parede celular dos fungos *Trichoderma* quando os mesmos estão em contato com fitopatógenos. Isso pode estar possivelmente relacionado com o mecanismo de defesa do fungo. Os isolados de *T. harzianum*, *T. harzianum* mutante e *T. reesei* apresentaram uma diminuição no teor de proteínas totais quando estavam em contato com a *Rhizoctonia solani* e o isolado de *T. asperellum* apresentou uma diminuição de proteínas quando em contato com *Fusarium*(Figura 17).

Observamos que os fungos *T. harzianum*, *T. harzianum* mutante e *T. reesei* apresentaram uma maior concentração de proteínas na parede quando estavam em contato com o *Fusarium oxysporum*, porém quando comparado com os controles dos isolados de *Trichoderma* observa-se uma diminuição no conteúdo de proteínas totais (Figura 17).

5.5 – Determinação enzimática dos componentes da parede celular

5.5.1 – Determinação de β -1,3- glicanases

As β -1,3- glicanases hidrolisam as ligações O-glicosídicas das β -1,3- glicanas, sendo classificadas de acordo com seu potencial de ação. As exo- β -1,3- glicanases degradam resíduos das extremidades não-redutora da molécula, tendo como produto único a glicose. As endo- β -1,3- glicanases são capazes de hidrolisar ligações do tipo β -1,3 internas em pontos específicos da cadeia polissacarídica liberando pequenos oligômeros (KULMINSKAYA et al., 2001; DE LA CRUZ et al., 1999; PITSON, 1993). Sua atuação no micoparasitismo está relacionada com a degradação da parede celular dos fitopatógenos. Portanto, quando maior a produção de β -1,3- glicanases, existe uma maior atuação contra fitopatógenos.

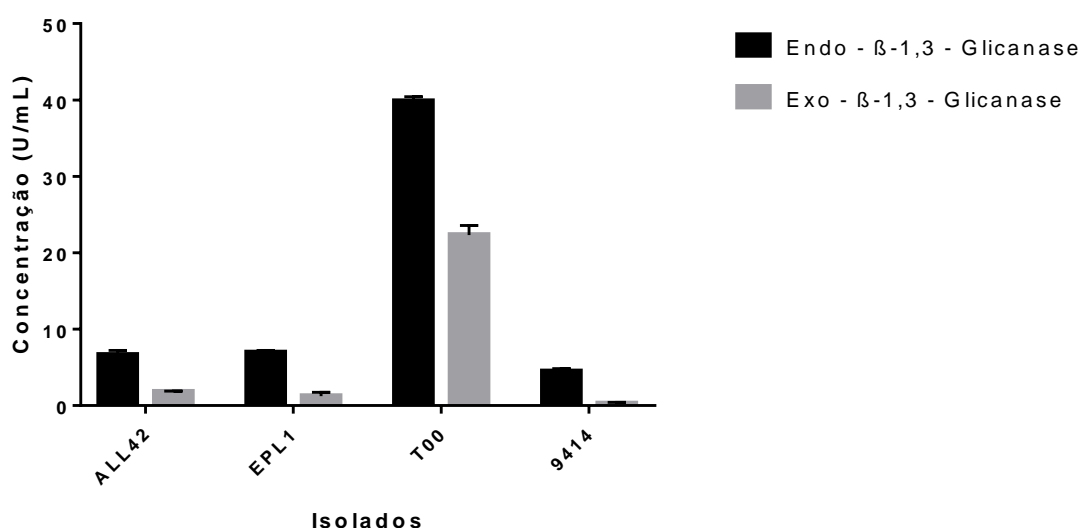


Figura 18: Determinação enzimática das β -1,3-glicanases da parede celular dos fungos *Trichoderma*. *Trichoderma harzianum* (ALL42), *Trichoderma harzianum* mutante (EPL1), *Trichoderma asperellum* (T00) e *Trichoderma reesei* (9414).

Analisando a (figura 18) observa-se uma maior produção das enzimas endo- β -1,3-glicanases. Podemos observar que a concentração de exo e endo- β -1,3-glicanases nos fungos *Trichoderma harzianum* e *T. harzianum* mutante estão praticamente no mesmo nível, porém observa-se um aumento extremamente significativo dessas enzimas no *Trichoderma asperellum*. Além disso, observa-se uma menor produção de glicanases no *Trichoderma reesei*. A menor produção de exo-glicanases possivelmente

pode estar relacionada com o mecanismo de defesa no processo de micoparasitismo onde o *Trichoderma* secreta uma menor quantidade de exo-glicanases. E consequentemente uma maior produção de endo-glicanases podendo estar relacionada com um mecanismo de ataque para combater fitopatógenos.

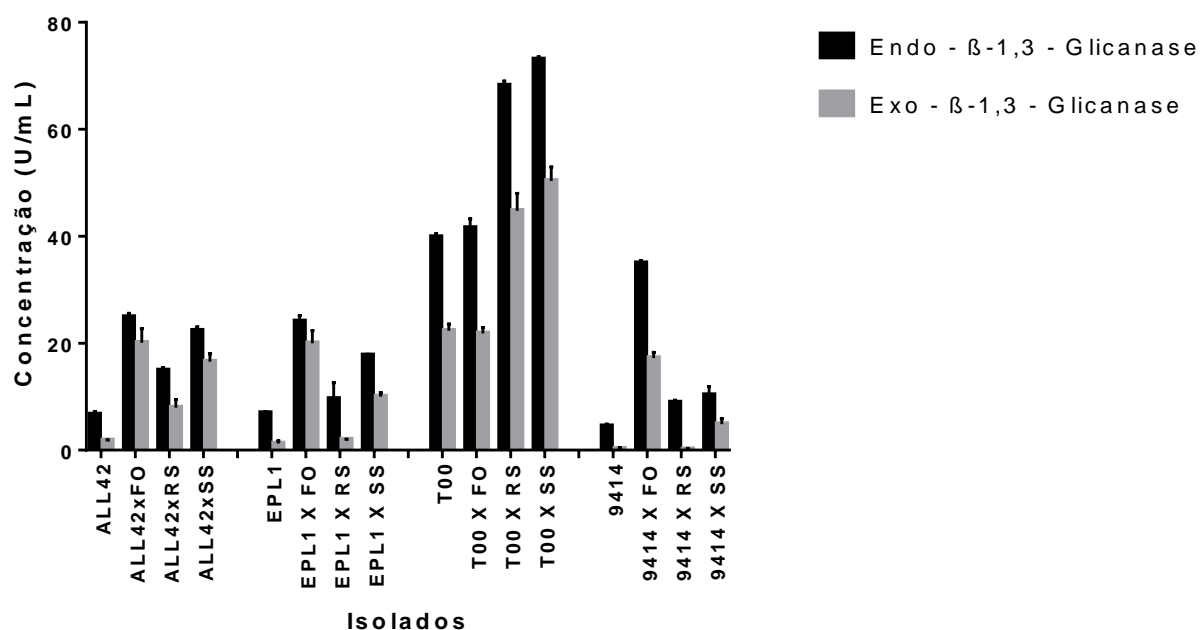


Figura 19: Determinação enzimática das β -1,3-glicanases da parede celular dos fungos *Trichoderma harzianum* (ALL42), *T. harzianum* mutante (Δ EPL1), *T. asperellum* (T00) e *T. reesei* (9414) quando o mesmo encontra-se em pareamento com os fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum* (SS), *Rhizoctonia solani* (RS) e *Fusarium oxysporum* (FO).

Na figura (19), observa-se que as enzimas glicanases aumentam quando o fungo *Trichoderma* está em contato com os fitopatógenos. Observa-se que a produção de enzimas glicanases aumenta quando o *Trichoderma harzianum*, *T. harzianum* mutante e *T. reesei* estão em contato com *Fusarium oxysporum* e diminuem quando estão em contato com a *Rhizoctonia solani*. O aumento na quantidade de enzimas β -1,3-glicanases provavelmente estão relacionadas com o processo de micoparasitismo onde o fungo *Trichoderma* secreta uma maior quantidade de enzimas para degradar a parede celular dos fitopatógenos.

5.5.2 – Determinação de quitinase

As dosagens de quitinases estão entre as dosagens enzimáticas mais realizadas quando estudando o processo de micoparasitismo. Essa enzima tem a capacidade de quebrar moléculas de quitinas da parede celular do fungo invasor, levando a sua degradação.

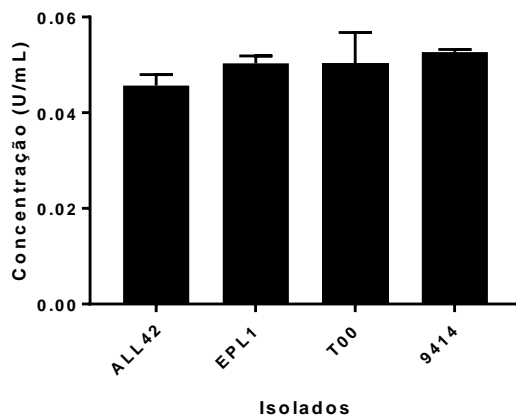


Figura 18: Determinação enzimática das quitinases da parede celular dos fungos *Trichoderma*. *Trichoderma harzianum* (ALL42), *Trichoderma harzianum* mutante (EPL1), *Trichoderma asperellum* (T00) e *Trichoderma reesei* (9414).

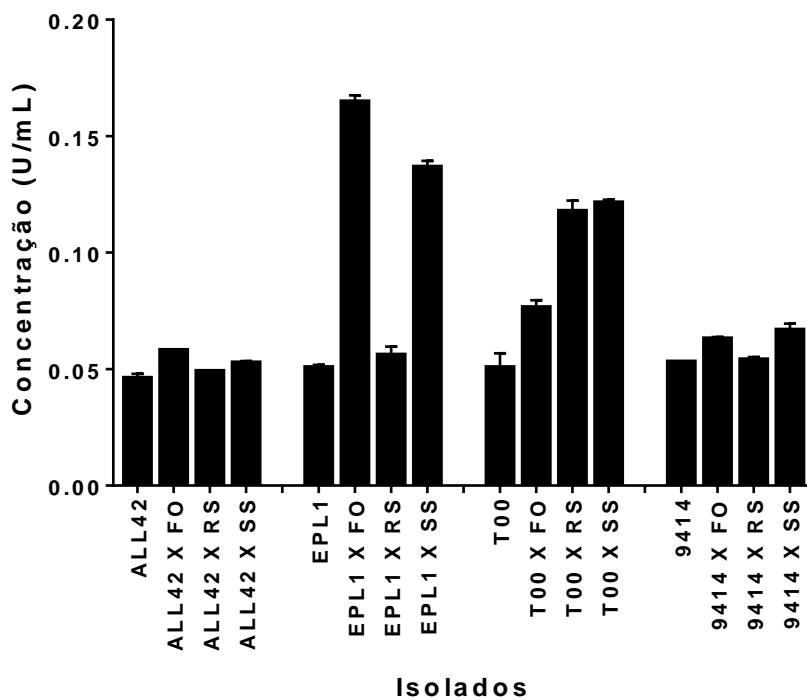


Figura 38: Determinação enzimática das quitinases da parede celular do fungo *Trichoderma harzianum* (ALL42), *Trichoderma harzianum* mutante (EPL1), *Trichoderma asperellum* (T00) e *Trichoderma reesei* (9414), quando o mesmo encontra-se em pareamento com os fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum* (SS), *Rhizoctonia solani* (RS) e *Fusarium oxysporum* (FO).

Observa-se que o fungo *Trichoderma harzianum* apresenta uma menor produção de enzimas quitinases. Os fungos *T. harzianum* mutante, *T. asperellum* e *T. reesei* apresentaram praticamente a mesma produção de enzimas quitinases (Figura 18).

Quando comparamos os fungos *Trichoderma* em antagonismo com fitopatógenos observamos que as produções de quitinases aumentam significativamente (figura 19). Observamos que os fungos *T. harzianum* e *T. harzianum* mutante produzem mais quitinases quando estão em antagonismo com *Fusarium oxysporum*. Os fungos *T. asperellum* e *T. reesei* aumentam a produção de quitinases quando estão em contato com *Sclerotinia sclerotiorum*. Observamos que o fungo *Trichoderma harzianum*, *T. harzianum* mutante e *T. reesei* apresentam uma menor produção de quitinases quando estão em contato com o fitopatógeno *Rhizoctonia solani*.

O aumento das enzimas quitinases quando o isolado está em contato com fitopatógenos possivelmente pode estar relacionado com o mecanismo de ataque do *Trichoderma* no processo de micoparasitismo, ou seja, quanto maior a produção de quitinases mais eficiente o combate a fitopatógenos.

6 – DISCUSSÃO

Nas análises por CLAE os isolados de *T. harzianum*, *T. harzianum* mutante, *T. asperellum* e *T. reesei* apresentaram em média níveis de glicanas e quitinas de 25 a 18% respectivamente. Os fungos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani* apresentaram uma concentração média de glicanas e quitinas de 45 a 42% respectivamente. Confirmando uma intensa variação na composição de polissacarídeos na parede celular de diferentes fungos.

Embora observa-se a predominância de açúcares na composição da parede celular fúngica, variações inter-específicas significativas na contribuição desses compostos para a constituição da parede têm sido relatadas na literatura. A parede celular de diferentes isolados do fungo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* apresenta conteúdo de glicanas e quitinas de 23 a 11 % respectivamente (SCHOFFELMER et al., 1999). Os fungos *Pisolithus microcarpus* e *Pisolithus tinctorius* apresentaram concentração de glicanas e quitinas de 46,5 e 26,1% e 48 e 23,5% respectivamente (SANTOS, 2007).

Nas determinações diretas de Glicox e DMAB na parede dos isolados de *Trichoderma*, observamos que as espécies de *T. harzianum*, *T. harzianum* mutante, *T. asperellum* e *T. reesei* apresentam variações nas concentrações de glicanas e quitinas na parede celular. Sendo que a proporção de glicanas é relativamente maior na parede dos isolados.

As glicanas estão entre os polissacarídeos mais encontrados da parede celular fúngica, formadas a partir de moléculas de glicose. Estudos realizados em fungos filamentosos demonstraram que as glicanas são responsáveis por oferecer força e integridade mecânica a parede celular. Quando comparados com as concentrações de quitinas tem sido observado que a proporção de glicanas praticamente dobra. Dentre as glicanas as que possuem maior ação para a parede fúngica estão as β -1,3-glicanas que podem atuar como moduladoras do sistema de defesa de fungos. As presenças de receptores de membranas, como a dectina-1, são capazes de interagir com as β -1,3-glicanas e desencadear uma resposta de defesa no organismo hospedeiro (RIBEIRO, 2017; CANTU et al., 2009; SANTOS, 2007; BOWMAN; FREE, 2006; FRANÇOIS, 2006; RUIZ-HERRERA et al., 1999; SCHOFFELMER et al., 1999).

Além das glicanas outro componente presente na parede fúngica são as quitinas, que podem ser encontradas em maiores proporções na parede de fungos filamentosos do que em leveduriformes. A determinação de quitina é realizada por análise dos níveis de

N-acetilglicosamina na amostra. A principal função das quitinas é a de fornecer uma integridade da parede celular, devido à microfibrilas que são originadas das interligações das pontes de hidrogênio. Quando ocorre uma disfunção na síntese das quitinas a parede celular torna-se instável e sofre deformações devido à pressão osmótica (BOWMAN; FREE, 2006; SCHOFFELMEER, 1999).

Qualhato et al. (2013), correlacionou a concentração de quitina e glicana da parede celular de *Trichoderma*, com a produção de enzimas quitinases e glicanases respectivamente. O aumento significativo de glicanas e quitinas da parede do *Trichoderma* quando estão em antagonismo com os fitopatógenos podem estar possivelmente relacionados com o processo de micoparasitismo.

Dentre as enzimas produzidas por fungos as β -glicanases estão entre as mais comuns. β -glicanases fúngicas podem ser encontradas na porção extracelular ou associadas na parede celular onde desempenham um importante papel no processo morfológico durante o desenvolvimento e diferenciação fúngica. Isso se refere as constantes mudanças ocorridas na parede celular do fungo durante seu crescimento e extensão, onde são necessárias a atuação das β -glucanases para uma hidrólise parcial das β -glucanas de parede para permitir a inserção de um novo material sem que sua integridade seja abalada. Outras funções das β -glucanases estão relacionadas com a autólise celular. Para os fungos micoparasíticos, servem como uma arma bioquímica primária para a degradação da parede celular do parasita (MARTIN et al., 2007).

A atuação das glicanases de *Trichoderma* no controle de fitopatógenos, a produção e caracterização enzimática de β -glicanases tem sido demonstrado durante anos por vários autores. Altas atividades enzimáticas foram encontradas em condições que *Trichoderma* foi crescido com parede celular de fungos patogênicos, sugerindo o papel desta enzima na degradação da parede celular do patógeno. β -1,3- glucanases detectadas em níveis basais podem estar relacionadas com o crescimento fúngico (RIBEIRO, 2017; DAGUERRE et al., 2014; MUKHERJEE et al., 2012; LOPES et al., 2011).

Quitinases é um dos grupos mais bem estudado de enzimas líticas da parede celular em *Trichoderma*. Estas enzimas são frequentemente produzidas e secretadas para o meio de cultura por uma grande variedade de fungos, em resposta à presença de quitina. Além de atuarem na ação micoparasita, esta enzima também está envolvida no processo de remodelamento, crescimento celular e reciclagem da própria célula fúngica. As enzimas quitinases podem ser liberadas no processo de micoparasitismo com a

finalidade de degradar polímeros de quitina da parede celular de fungos fitopatogênicos. Além disso, existem relatos que as enzimas quitinases atuam na indução de resistência das plantas ao combate de fitopatógenos. A estrutura da parede celular de fungos é recoberta por camadas de β -glicanas ou outros componentes e que após a remoção dessa camada, quitinases estão aptas a hidrolisar a camada posterior que é composta de quitina e que essa hidrólise pode ter sucesso com a cooperação de outras enzimas (GRUBER; SEIDL-SEIBOTH, 2012; MACHADO et al., 2012; BATISTA et al., 2011; ROMEIRO, 2007; MUCHA et al., 2006).

O *Trichoderma harzianum* é um dos principais controladores biológicos e sua ação micoparasita deve-se a presença de enzimas glicanases e quitinases. Existe uma correlação entre a produção dessas enzimas com a quantidade de glicanas e quitinas (RIBEIRO, 2017; QUALHATO, 2013).

Marcello (2008), estudando o *Trichoderma asperellum* descobriu uma forte ação micoparasita do controlador biológico no combate aos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*. Essa ação pode estar fortemente ligada a composição de glicana quitina da parede celular, pois sabe-se que a mesma está relacionada com a produção das enzimas glicanases e quitinases respectivamente, que são extremamente importantes no processo de micoparasitismo.

A baixa concentração de glicana e quitina no *Trichoderma reesei* podem estar possivelmente ligadas a sua baixa atividade micoparasita. De acordo com Melo (1996), o *T. reesei* apresenta atividade micoparasita inferior a outras espécies de fungos *Trichoderma* como, por exemplo, o *T. harzianum* e *asperellum*.

Diante do apresentado podemos afirmar que existe uma diferença significativa dos componentes da parede celular do *Trichoderma* quando o mesmo encontra-se em confronto com fitopatógenos. Confirmando a hipótese que os componentes da parede celular são relativamente dinâmicos, podendo sofrer alterações de acordo com fatores externos, como condições ambientais, forma de cultivo e principalmente contato com outros organismos externos (MAGNELLI; CIPOLLO; ROBBINS, 2005; KLIS; BOORSMA; DE GROOT, 2006).

7- CONCLUSÃO

Este é um trabalho inicial sobre a caracterização bioquímica da parede celular de fungos *Trichoderma* que permitiram as seguintes conclusões:

- De acordo com os dados apresentados podemos afirmar que a parede celular fúngica é uma estrutura relativamente dinâmica, sendo que cada tipo de fungo possui uma determinada concentração de componentes na parede.
- Podemos concluir que os fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* apresentam uma concentração de glicanas e quitinas superiores aos fungos do gênero *Trichoderma*.
- Dentre os fungos do gênero *Trichoderma* o fungo *T. harzianum* e o *T. asperellum* apresentaram uma concentração de glicanas e quitinas superiores ao fungo *T. reesei*.
- Dentre os fungos *Trichoderma* o fungo que mais apresentou uma concentração de açúcares total foi o *T. asperellum*.
- Quando comparamos a parede celular dos fungos *Trichoderma* isolados com os fungos em confrontos com fitopatógenos observa-se que os componentes da parede se alteram relativamente, apresentando uma maior concentração de glicanas e quitinas nos fungos quando estão em confrontos.
- Observamos que a concentração de proteínas totais diminui quando o fungo *Trichoderma* está em contato com fitopatógenos. Possivelmente demonstrando um mecanismo de defesa desses fungos.
- Observamos também que quando o fungo *Trichoderma* está em contato com fitopatógenos a quantidade de enzimas β -1,3-glicanases e quitinases aumentam. Além disso, observamos que as enzimas Endo - β -1,3-glicanases estavam presentes em concentrações maiores do que as Exo - β -1,3-glicanases.
- Esses dados podem estar fortemente relacionados com o processo de micoparasitismo desses controladores biológicos.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABDULLAH, M.T.; ALI, N.Y.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop protection**, v.27, p.1354-1359, 2008.
- ALMEIDA, F.B. et al. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**, v.29, p.1189-1193, 2007.
- ALVES, R.C. **Imunologia das infecções fúngicas**. Instituto Oswaldo Cruz - São Paulo. 2017. (Apostila de Imunologia de doenças infecciosas – Curso de verão).
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN F, A. Manual de Fitopatologia. **Agrônômica Ceres**, v.1, n.4, p.383-387, 2011.
- BATISTA, K.A. et al. Potential fungal inhibition by immobilized hydrolytic enzymes from *Trichoderma asperellum*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.59, p.8148-8154, 2011.
- BAUERMEISTER, A. et al. Fungal β -1,3- Glucanases: production and biotechnological applications. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.31, n.2, p.75-86, 2010.
- BELL, D.K. et al. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v.72, p.379-382, 1982.
- BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v.7, n.4, p.249–260, 2004.
- BETTIOL, W., MORANDI, M.A.B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN F. A.; DIMATI, H.; AMORIM, L. *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*. São Paulo: Ceres, 1995, p. 717-727.
- BISSETT, J. et al. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. **IMA Fungus**, v.6, n.2, p.263–295, 2015.
- BLANCO N. et al. Structural and functional analysis of yeast Crh1 and Crh2 transglycosylases. **Journal Federation of European Biochemical Societies**, v. 282, n. 4, p. 715-731, 2015.
- BODDI, S. et al. Cerato-platanin protein is located in the cell walls of ascospores, conidia and hyphae of *Ceratocystis fimbriata* f. sp. platani. **FEMS microbiology letter**, v.233, n.2, p. 341-346, 2004.
- BOWMAN, S.M; FREE, S.J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**, v.28, p.799–808, 2006.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

- CAFÉ FILHO, A.C.; LOBO Jr., M. Manejo de fatores físicos e culturais para controle de patógenos do solo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.8, p.267-301, 2000.
- CANTU, D. et al. Characterization of the cell wall of the ubiquitous plant pathogen *Botrytis cinerea*. **Mycological Research**, v.113, p. 1396 – 1403, 2009.
- CARRERAS-VILLASEÑOR, N. et al. *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. **Microbiology**, v.158, n.1, p. 3– 16, 2012.
- CHET, I., *Trichoderma* – application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soil borne plant pathogenic fungi. In: CHET, I. Innovative approaches to plant disease control. New York: John Wiley and Sons, p.137-160. 1987.
- CHET, I.; BENHAMOU, N.; HARAN, S. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: HARMAN, G.E; KUBICEK, C.P. *Trichoderma and Gliocladium, Enzymes, Biological Control and Commercial Applications*. London: Taylor & Francis, 1998, p. 153–171.
- COTXARRERA, et al. Use of sewage sludge compost and *Trichodermaasperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. **SoilandBiochemistry**, v.34, n.4, p.467-476, 2001.
- DAGUERRE Y, SIEGEL K, EDEL-HERMANN V, STEINBERG C. Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: a review. **Fungal biology review**, v.28, n.4, p.97–125, 2014.
- DE LA CRUZ, J.; LLOBELL, A. Purification and properties of a basic endo- α -1,6 glucanase (BGN16.1) from the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum*. **European Journal of Biochemistr**, v.265, p. 141 – 151, 1999.
- DIAZ, T.S; GONZALES, L.C. Efectobioestimulante de *Trichodermaharzianum* rifai en posturas de leucaena, cedro y samán. **Colombiaflorestal**, v.21, n.1, p.81-90, 2017.
- DRUZHININA, I.S. et al. The *Trichodermaharzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. **BMC Evolutionary Biology**, v.1, p.10 – 94, 2010.
- EBISU, S. et al. Isolation and purification of Flavobacterium alpha-1,3-glucanase hydrolyzing, insoluble, sticky glucan of Streptococcus mutans. **Journal bacteriology**, v.124, n.3, p.1489-1501, 1975.
- ELAD,Y; BARAK, R; CHET, I. Journal of possible Role of Lectins in Mycoparasitism. **Bacteriology**, v.154, n.3, p. 1431-1435, 1983.
- FESEL P.H.; ZUCCARO, A. B-glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. **Fungal Genetics and Biology**, v. 90, p. 53-60, 2016.
- FONTAINE, T. et al. Molecular organization of the alkali insoluble fraction of *Aspergillus fumigates* cell wall. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 36, p. 27594–27607, 2000.

- FORTUNATO, A.A.; RODRIGUES, F.A.; NASCIMENTO, K.J.T. Physiological and biochemical aspects of the resistance of banana plants to *Fusarium* wilt potentiated by silicon. **Phytopathology**, v. 102, n.10, p.957-966, 2012.
- FRANÇOIS, J.M. A simple method for quantitative determination of polysaccharides in fungal cell walls. **Nature Protocols**, v.1, n.6, p.2995-3000, 2006.
- FREE, S.J. Fungal cell wall organization and biosynthesis. **Advances in Genetics**, v. 81, p.34-71, 2013.
- FREIRE, F.C.O. A introdução de fitopatógenos e doenças emergentes na agricultura cearense. **Essentia**, v.16, n.2, p.22-39, 2015.
- FUJIKAWA T. et al. Surface β 1,3-glucan facilitates fungal stealth infection by interfering with innate immunity in plants. **PLOS Pathogens**, v.8, n.8, 2012.
- FUKUDA, E.K. et al. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Ciências Agrárias**, v.30, n.1, p. 177-134, 2009.
- GOMES, E. et al. Involvement of *Trichoderma harzianum* Epl-1 Protein in the Regulation of *Botrytis* Virulence- and Tomato Defense-Related Genes. **Frontiers in plant science**, v.8, p.880-890, 2017.
- GOMES, E. et al. The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self cell wall protection. **Scientific Reports**, v.5, n.1, p.179-198, 2015.
- GORDON, T.R.; MARTYN, R.D. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.111–128, 1997.
- GRUBER, S.; SEIDL-SEIBOTH, V., Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. **Microbiology**, v.158, p.26–34, 2012.
- HALL, R.; NASSER, L.C.B. Practice and precept in cultural management of bean diseases. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.18, p.176-185, 1996.
- HARMAN,G.E. et al., *Trichoderma* species- Opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.43-56, 2004.
- HENRY, C.; LATGÉ, J.P.; BEAUVAIS, A. β -1,3-glucans are dispensable in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryote Cell**, v.11, n.1, p.26-29, 2012.
- JIANXIN, W. et al. Dynamics of resistant population of *Fusarium graminearum* to carbendazim and substitutable fungicide screening. **Journal of Nanjing Agricultural University**, v.25.p.43-47, 2002.
- KLIS, F.M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P.W.J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, n.3, p.185–202, 2006.
- KUBICEK C.P. et al. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. **Journal Plant Pathology**, v.83, p.11–24, 2001.

KULLNING, C. et al. Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T.harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a Prerequisite for Triggering of *Trichoderma ech42* Gene Expression before mycoparasitic contact. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.2232-2234, 2000.

KULMINSKAYA, A. A. et al. Isolation, enzymatic properties, and mode of action of an exo-1,3- β -glucanase from *Trichoderma viride*. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 612-6131, 2001.

KUMAR, S.; HANSEN, P.M.T. Reaction of heated milk and amino sugars with p-Dimethylamino.benzaldehyde. **Journal Agriculture Food Chernystri**, v.20, p.1141, 1972.

LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE, V.T. Quitosana: Biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, p. 672-678, 2009.

LEITE, R.M.V.B.C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja**. Londrina: EMBRAPA Soja, 2005. 3 p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 76).

LEJEUNE, R.; NIELSEN, J.; BARON, G. Morphology of *Trichoderma reesei* QM 9414 in submerged cultures. **Biotechnology and bioengineering**, v.47, n.5, p. 609-615, 1995.

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

LIZICÁROVÁ, I. et al. Cell wall mannan of human pathogen *Candida dubliniensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 191-195, 2007.

LOPES, F.A. et al. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology**, v.116, n.7, p.815-824, 2012.

LOPES, F. C. *Produção e análise de metabólitos secundários de fungos filamentosos*. Dissertação (Mestrado em biologia celular e molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

LOBO, M.D.P. et al. Expression and efficient secretion of a functional chitinase from *Chromobacterium violaceum* in *Escherichia coli*. **BMC Biotechnology**, v.13, n.46, p.1-15, 2013.

LUCON, C.M.M. et al. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma spp.* para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.44, n.3, p.225-232, 2009.

LUSSIER, M. et al. The *Candida albicans* KRE9 gene is required for cell wall beta-1, 6-glucan synthesis and is essential for growth on glucose. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, n.17, p.9825-9830, 1998.

- MACHADO, D.F.M. et al. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de ciências agrárias**, v.35, n.1, p.274-288, 2012.
- MAGNELLI, P.E.; CIPOLLO, J.F.; ROBBINS, P.W. Glicanase-driven fractionation allows redefinition of *Shizoccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. **Analytical Biochemistry**, v. 336, n. 2, p. 202-212, 2005.
- MARCELLO, C.M. *Avaliação da expressão e caracterização de uma exo-β-1,3-glicanase envolvida no mecanismo de micoparasitismo de Trichoderma asperellum*. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- MARQUES, E.; MARTINS, I.; MELLO, S.C.M. Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. **Biota Neotropica**, v.18, n.1, p.1-5, 2018.
- MARTIN, K. et al. Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal b-(1,3) and b-(1,6)-glucanases. **FEMS Microbiology**, v.31, n.2, p.168–192, 2007.
- MARTÍNÉZ-MEDINA, A. et al. Deciphering the hormonal signalling network behind the systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* in tomato. **Frontiers in plant science**, v.4, n.206, p.1-12, 2013.
- MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical chemistry*, v.31, n.3, p. 426-428, 1959.
- 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.
- MORAES, G.M.; CARVALHO, L.R. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* sp. contra *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Faculdade Montes Belos**, v.8, n.5, p. 99-114, 2014.
- MUCHA, J. et al. Synthesis of enzymes connected with mycoparasitism by ectomycorrhizal fungi. **Architecture Microbiologica**, v. 185, p. 69-77, 2006.
- MUKHERJEE M, et al. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions: advances in genetics of biological control. *Indian Journal Microbiology*. v.52, n.4, p.522–529, 2012.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- ORLEAN, P. Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. **Genetics**, v. 192, n.3, p. 775 – 818, 2012.
- PANISSON, E.; REIS, E.M.; BOLLER, W. Quantificação de danos causados pela Giberela em cereais de inverno, na safra 2000, em Passo Fundo, RS. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28. p.189 – 192, 2003.
- PERALDI, A. et al. *Brachypodium distachyon*: a new patho system to study *Fusarium* head blight and other *Fusarium* diseases of wheat. **BMC Plant Biology**, v.11, p.100, 2011.

PERIPOLLI, M.; MARTINELLI, J.A.; DELATORRE, C.A. Avaliação da agressividade e da diversidade genética de *Sclerotiniasclerotiorum* em tabaco no sul do Brasil. **Summa phytopathology**, v.44, n.2, p.170-177, 2018.

PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J.; MCDUGALL, B. M. Non cellulolytic fungal b-glucanases: their physiology and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 178-190, 1993.

POLETO, I. et al. Zoneamento e identificação de *Fusarium spp.* causadores de podridão de raízes em plantios de erva mate (*ilex paraguariensis* a. st.-hil.) na região do Vale do Taquari, RS. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2006.

QUALHATO, T.F. Avaliação do perfil enzimático e expressão gênica de cinco espécies de *Trichoderma* e potencial antagônico contra *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*. 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

QUALHATO, T.F. et al. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species production. **Biotechnology letter**, v.35, n.9, p. 1461-1468, 2013.

REIS, E.M.; ZOLDAN, S.M; GERMANO, B.C. Mecanismos de transmissão de fitopatógenos de sementes para órgãos aéreos, 2018. Disponível em: <[http://www.orsementes.com.br/sistema/anexos/artigos/50/Transmiss%C3%A3o%20de%20fitopat%C3%B3genos%20\(Silmar\).pdf](http://www.orsementes.com.br/sistema/anexos/artigos/50/Transmiss%C3%A3o%20de%20fitopat%C3%B3genos%20(Silmar).pdf)>. Acesso em: 29 mar. 2018.

REISSING, J. L., STROMINGER, J. L., LE LOIR, L. F. A. A modified colorimetric method for the estimation of N- acetil-aminos sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 217, p. 959-966, 1955.

RIBEIRO, M.S. Estudo funcional do gene *gluc31* que codifica uma β -1,3-glucanase da família GH16 de *Trichoderma harzianum*.2017. Teste (Doutorado em Biologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

ROMEIRO, R.S. (2007) - *Controle biológico de doenças de plantas – procedimentos*. Viçosa, Editora UFV, 172 p.

RUIZ-HERRERA, J. et al. Carboxin-resistant mutant of *Ustilago maydis* is impaired in its pathogenicity for zea mays. **Current microbiology**, v.29, p.291-294, 1999.

SAMUELS, G.J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **MycologyResearch**, v. 100, n.8, p.923–935, 1996.

SANTOS, M.L. Composição da parede celular dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus microcarpus* e *Pisolithus tinctorius*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

- SANTOS, T. et al. Regulation of the beta-1,3-glucanase system in *Penicillium italicum*: glucose repression of the various enzymes. **Journal bacteriology**, v.133, n.2, p.465-471, 1977.
- SCHOFFELMEER, E.A.M. et al. The cell wall of *Fusarium oxysporum*. **Fungal Genetics and Biology**, v.27, p.275-282, 1999.
- SEHNEM, N. T. et al. Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 163-167, 2006.
- SEVIOUR, R. et al. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, p. 279-298, 1992.
- SHAHINIAN S.; BUSSEY H. B-1,6-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v.35, n.3, p.477- 489, 2000.
- SILVA, R.N. et al. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.3, p.337-341, 2003.
- SMITH, G.J. et al. Cell wall dynamics in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 348-352, 1999.
- STAMFORD, T.C.M. et al. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 61- 69, 2007.
- SUTHERLAND, I.W. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 38, p. 319-328, 1999.
- TEIXEIRA, H. et al. Manejo da podridão radicular seca do feijoeiro. Circular técnica n. 63, *Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais*. 2009.
- TING, A. S. Y.; CHAI, J. Y. Chitinase and β -1,3-glucanase activities of *Trichoderma harzianum* in response towards pathogenic and non-pathogenic isolates: Early indications of compatibility in consortium. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.4, n.1, 109–113, 2015.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 6 ed. São Paulo: Atheneu, 2015.
- TRILLAS M.I. et al. Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. **Biological Control**, v.39, p. 32–38,2006.
- TROIAN, R.F. Análise do secretoma da interação entre *Trichoderma harzianum* e os estágios de desenvolvimento do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Tese (Doutorado em biologia molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- VINALE, F. et al. *Trichoderma* plant–pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.40, p. 1–10, 2008.

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

WATANABE, S. et al. Properties and biological control activities of aerial and submerged spores in *Trichodermaasperellum*SKT-1. **Journal of Pesticide Science**, v.31, p. 375-379,2006.

WESSELS, J.G.H. Fungal hydrophobins: proteins that function at interface. **Trends Plant Science**, v.1, p.9-15, 1996.

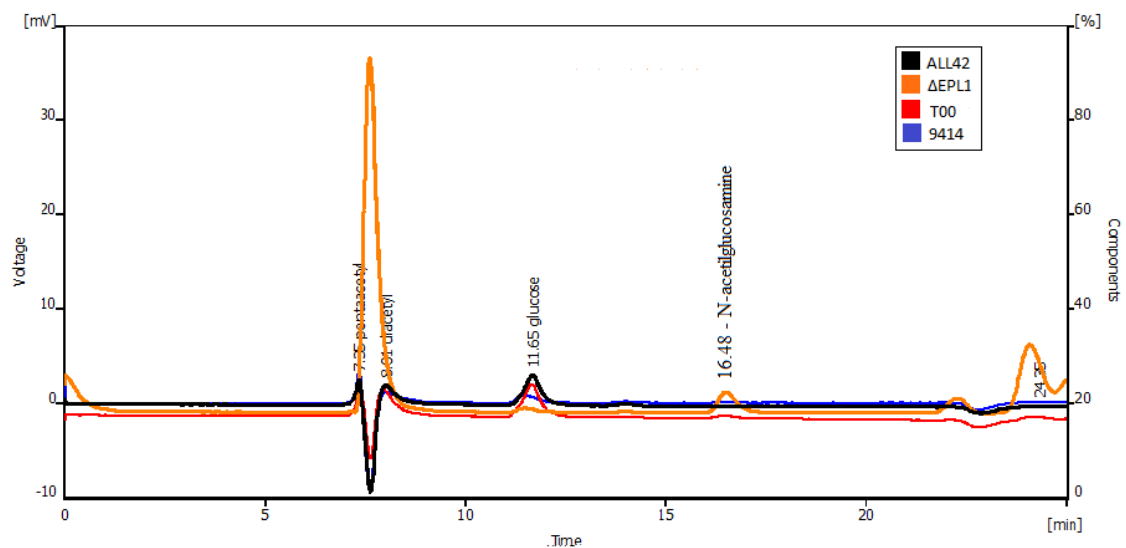
WILLIAMS, D.L. Overview of (1→3)-β-D-Glucan immunobiology. **Mediators of Inflammation**, v. 6, p. 247-250, 1997.

WOO S.L. et al. *Trichoderma* -based products and their widespread use in agriculture. **The Open Mycology Journal**, v. 8, p.71–126, 2014.

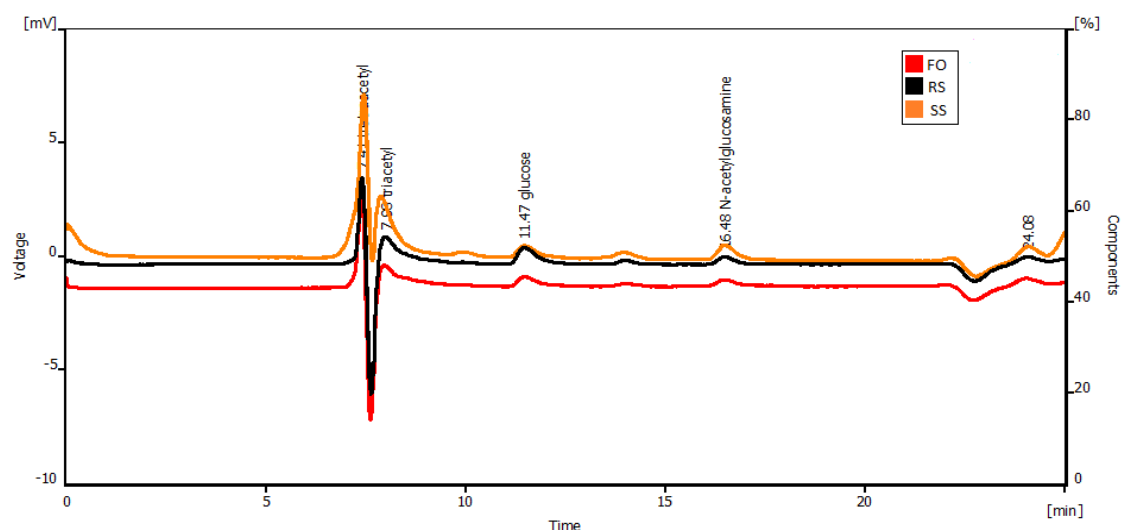
WÖSTEN, H.A.B., SCHUREN, F.H.J., WESSELS, J.G.H. Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipatic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. **EMBO Journal**, v.13, p.5848-5854, 1994.

ANEXOS

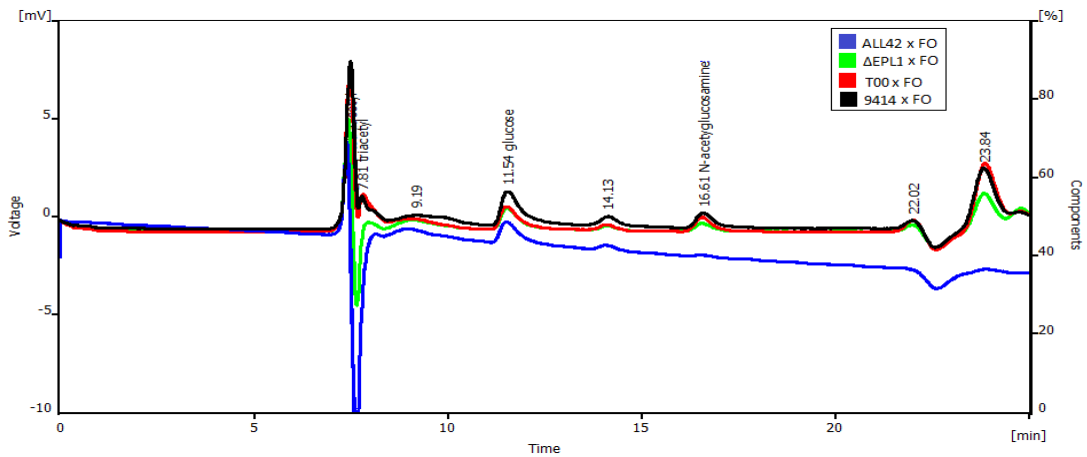
ANEXO 1 - Cromatograma dos componentes da parede celular dos fungos do gênero *Trichoderma*. *Trichoderma harzianum* (ALL42), *Trichoderma harzianum* mutante (Δ EPL1), *Trichoderma asperellum* (T00) e *Trichoderma reesei* (9414).



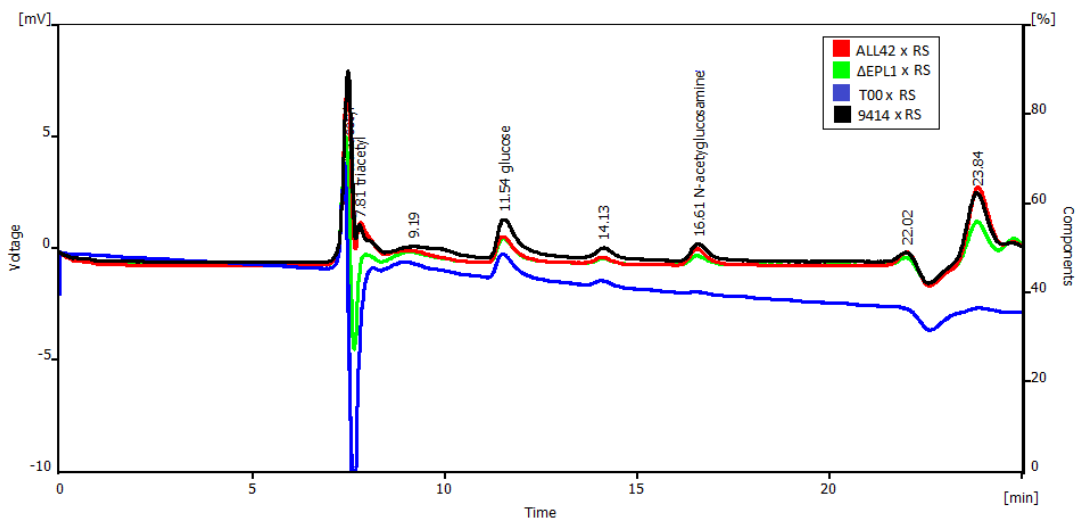
ANEXO 2 -Cromatograma dos componentes da parede celular dos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* (FO), *Rhizoctonia solani* (RS) e *Sclerotinia sclerotiorum* (SS).



ANEXO 3 - Cromatograma de comparação dos constituintes da parede entre os confrontos dos fungos do gênero *Trichoderma*, *T. harzianum* (ALL42), *T. harzianum* mutante (Δ EPL1), *T. asperellum* (T00) e *T. reesei* (9414) e do fitopatógeno *Fusarium oxysporum*.



ANEXO 4 - Cromatograma de comparação dos constituintes da parede entre os confrontos dos fungos do gênero *Trichoderma*, *T. harzianum* (ALL42), *T. harzianum* mutante (Δ EPL1), *T. asperellum* (T00) e *T. reesei* (9414) e do fitopatógeno *Sclerotinia Sclerotiorum* (SS).



ANEXO 5 - Cromatograma de comparação dos constituintes da parede entre os confrontos dos fungos do gênero *Trichoderma*, *T. harzianum* (ALL42), *T. harzianum* mutante (Δ EPL1), *T. asperellum* (T00) e *T. reesei* (9414) e do fitopatógeno *Rhizoctonia solani* (RS).

