



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS  
APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE

**ANÁLISE DA TOLERÂNCIA DE COBALTO EM *Trichoderma  
harzianum***

Anápolis – GO  
2021

TIAGO FREIRE GOMES

**ANÁLISE DA TOLERÂNCIA DE COBALTO EM**  
***Trichoderma harzianum***

Monografia apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Moleculares para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Área de concentração: Biologia Molecular.

Orientadora: Raphaela de Castro Georg.

Anápolis – GO

2021

TIAGO FREIRE GOMES

**ANÁLISE DA TOLERÂNCIA AO COBALTO EM *Trichoderma harzianum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Biologia Molecular

Aprovada em 28/10/2021



---

Prof. Dra. Raphaela de Castro Georg



---

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa



---

Prof. Dra. Valdirene Neves Monteiro

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da  
UEG com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FT551            FREIRE GOMES, TIAGO

a                    ANÁLISE DA TOLERÂNCIA DE COBALTO EM *Trichoderma*

*harzianum* / TIAGO FREIRE GOMES; orientador RAPHAELA DECASTRO  
GEORG; co-orientador CIRANO JOSÉ ULHOA. -- ANÁPOLIS , 2021.

65 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Mestrado  
Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) --  
Câmpus Central - Sede: Anápolis - CET, Universidade Estadual  
de Goiás, 2021.

1. *Trichoderma harzianum*. 2. cobalto. 3. beta

-1,3-glucanase. 4. quitinase. 5. genes domínio CobW eNico.  
I. DE CASTRO GEORG, RAPHAELA, orient. II. JOSÉ

ULHOA, CIRANO, co-orient. III. Título.

**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE TESES E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL (BDTD)**

Na qualidade de titular dos direitos de autor e autora, autorizo a Universidade Estadual de Goiás (UEG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UEG), regulamentada pela Resolução, **CsA n.1087/2019** sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

Estando ciente que o conteúdo disponibilizado é de inteira responsabilidade do autor / autora.

**Dados do autor (a)**

Nome Completo TIAGO FREIRE GOMES

E-mail professortiagofreire@gmail.com

**Dados do trabalho**

Título ANÁLISE DA TOLERÂNCIA AO COBALTO EM TRICHODERMA  
HARZIANUM

**Tipo**

( ) Tese  Dissertação

Curso/Programa PPG CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS PARA A SAÚDE

Concorda com a liberação documento

SIM  
 NÃO

Assinalar justificativa para o caso de impedimento e não liberação do documento:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

- ❖ Em caso de não autorização, o período de embargo será de **até um ano** a partir da data de defesa, caso haja necessidade de exceder o prazo de um ano, deverá ser apresentado formulário de solicitação para extensão de prazo para publicação devidamente justificado, junto à coordenação do curso.

Anápolis , 11/03/2022  
Local Data

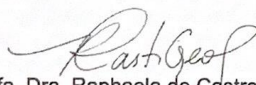
TIAGO  
Assinatura do autor (a)

[Assinatura]  
Assinatura do orientador (a)

**Tiago Freire Gomes**

**“Análise da tolerância ao cobalto em *Trichoderma harzianum*”**

Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás, para a obtenção do título de Mestre, aprovada em 28 de outubro de 2021, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



Prof.ª. Dra. Raphaela de Castro Georg  
Presidente da Banca  
UFG



Prof. Dr. Cirano José Ulhoa  
Prof. Dr. Cirano José Ulhoa  
Membro externo  
UFG



Prof.ª. Dra. Valdirene Neves Monteiro  
Membro interno  
UEG



SERVIÇO PÚBLICO ESTADUAL  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS HENRIQUE SANTILLO  
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE

ATA DA SESSÃO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 046

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO - No dia vinte e oito do mês de outubro de 2021, às 14 h, reuniram-se os componentes da banca Examinadora: Profa. Dra. Raphaela de Castro Georg – Orientadora, Prof. Dr. Cirano José Ulhoa e Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro, sob a presidência da primeira, e em sessão realizada por videoconferência. Procederam à avaliação da defesa de dissertação de Mestrado intitulada: “Análise da tolerância ao cobalto em *Trichoderma harzianum*” de autoria de Tiago Freire Gomes, discente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente da Banca Examinadora: Profa. Dra. Raphaela de Castro Georg que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra a seguir foi concedida ao autor da dissertação **Tiago Freire Gomes** que, em 23 minutos procedeu à apresentação do trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. A dissertação foi aprovada por unanimidade, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE, na área de concentração “Pesquisa e Obtenção de Produtos para Saúde”, na linha de pesquisa - “Desenvolvimento de Produtos para a Saúde” pela Universidade Estadual de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGCAPS, da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 horas e 55 minutos, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação de Mestrado e para constar eu, Profa. Dra. Raphaela de Castro Georg, presidente da banca, lavrei a presente Ata, que após lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de igual teor.

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa  
Membro externo - UFG

Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro  
Membro interno - UEG

Profa. Dra. Raphaela de Castro Georg  
Presidente da Banca

## AGRADECIMENTOS

Quero iniciar os agradecimentos primeiramente agradecendo a Deus, por me manter forte e me fazer seguir com fé em cada momento. 2020 foi um ano difícil, tudo teve que mudar, nossas vidas, nossas rotinas tudo precisou manter o distanciamento. Foi um período em que muitos de perderam suas vidas, e ao mesmo tempo também em que muitos perderam a fé na ciência. Segui fazendo ciência, sem perder a fé e em busca da realização de um sonho.

Agradeço meu pai pela sua simplicidade e minha mãe pelo seu grande coração, mesmo distantes em que alguns momentos souberam compreender minha jornada e se colocaram mais próximos... AMO VOCÊS. Pela minha irmã que soube dar apoio e suporte e principalmente minha noiva Érica (The Best of Me) com seu apoio incondicional e profundo a cada momento de modo a realizar esse sonho. AMO VOCÊ!

Agradeço com muita gratidão a todos do Laboratório de Enzimologia. Muito obrigado Thuana, Letícia, Bruna, Aline, Stephanie, Jomal, Bruna Martins. Obrigado pelos bons momentos compartilhados, pelas trocas de experiências, conhecimentos, risadas e apoio. Vocês sempre serão lembrados por mim.

Quero demonstrar minha enorme gratidão à minha orientadora Profa. Dra. Raphaela de Castro Georg por acreditar e confiar em mim, pela oportunidade oferecida e por dedicar seu tempo e experiência nessa orientação. Também pela paciência, sabedoria e profissionalismo durante todo esse tempo e principalmente agradecer pela sua amizade.

Oferecer também agradecimento imenso a todos os professores que contribuíram de alguma forma, para realização desse trabalho, em especial ao Prof. Dr. Cirano José Ulhoa, Profa. Dr<sup>a</sup>. Valdirene Neves Monteiro e Prof. Dr. Manoel Biancardi pelas dicas, sugestões e instruções durante toda trajetória desse projeto.

Agradeço também ao professor Pedro Vale Brito, professora Fernanda Alcântara e professor Manoel Biancardi do ICB responsáveis pelo preparo das amostras de MET e análise das imagens.



Congratular aos colaboradores do LabMic/UFG: Nathany Ribeiro, Tatiane Oliveira dos Santos e Gisane Gasparotto responsáveis pelo preparo das amostras e análises em microscopia pela paciência e compreensão.

Obrigado ao programa de Pós-Graduação em Biologia/UFG e a todos os funcionários do ICB que me ajudaram em cada momento sempre que precisei muita gratidão! A todos um forte abraço.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> – Isolado de <i>Trichoderma harzianum</i> crescido em meio BDA.....   | 5  |
| <b>Figura 2</b> – Mapa do bioma Cerrado brasileiro.....   | 7  |
| <b>Figura 3</b> – Conteúdo médio dos elementos minerais (em g kg <sup>-1</sup> de matéria seca) no solo e na fitomassa de plantas terrestres.....   | 8  |
| <b>Figura 4</b> – Liga de cobalto.....  | 9  |
| <b>Figura 5</b> – <i>Trichoderma harzianum</i> (ALL - 42) crescimento em meio BDA nas concentrações 0,0; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 mg/mL de CoCl <sub>2</sub> .....                                   | 23 |
| <b>Figura 6</b> – Desenvolvimento de <i>Trichoderma harzianum</i> (ALL - 42) em meio BDA na presença de CoCl <sub>2</sub> .....   | 24 |
| <b>Figura 7</b> - Desenvolvimento de <i>Trichoderma harzianum</i> (ALL- 42) após 47 horas de crescimento mais 1 hora de tratamento com CoCl <sub>2</sub> em meio BD.....                        | 25 |
| <b>Figura 8</b> – Ensaio enzimático <i>T. harzianum</i> (ALL - 42) após 47 horas de crescimento mais 1 hora de tratamento com CoCl <sub>2</sub> em meio BD.....                                 | 26 |
| <b>Figura 9</b> – Micélio e hifas do <i>Trichoderma harzianum</i> utilizadas como controle e (CoCl <sub>2</sub> 0,8 mg/mL) por microscopia eletrônica de varredura 500x.....                    | 27 |
| <b>Figura 10</b> – Micélio e hifas do <i>Trichoderma harzianum</i> utilizadas como controle e (CoCl <sub>2</sub> 0,8 mg/mL) por microscopia eletrônica de varredura 1.500x.....                 | 28 |
| <b>Figura 11</b> – Micélio e hifas do <i>Trichoderma harzianum</i> utilizadas como controle e (CoCl <sub>2</sub> 0,8 mg/mL) por microscopia eletrônica de varredura 5.000x.....                 | 29 |
| <b>Figura 12</b> – Gráficos de EDS dos três pontos marcados em hifas demonstrando os principais elementos concentrados identificados na análise entre eles o (CoCl <sub>2</sub> 0,8 mg/mL)..... | 32 |
| <b>Figura 13</b> – Árvore filogenética de proteínas de <i>Trichoderma</i> que apresentaram domínio Nico.....  | 35 |

**Figura 14** – Árvore filogenética de proteínas de *Trichoderma* que apresentaram domínio CobW.....35

**Figura 15** – Expressão relativa genes de domínio CobW 764301, 844570, NicO (834603) e 783875 de *Trichoderma harzianum* em crescimento nas concentrações 0,0; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 mg/ml de CoCl<sub>2</sub>.....37

## LISTA DE TABELAS

**Tabela I.** Tabela de primers dos genes com domínio CobW.....20

**Tabela II.** Taxa de proteínas totais secretadas (mg.mL) por peso micelial seco (mg) de *Trichoderma harzianum* após 47 horas de crescimento mais 1 hora de tratamento comparada as diferentes concentrações de CoCl<sub>2</sub>.....26

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**cDNA:** DNA complementar

**DEPC:** Água tratada com dietilpirocarbonato

**BDA:** (Ágar, Batata e Dextrose)

**BD:** (Batata e Dextrose)

**BLAST:** Ferramenta de alinhamento local de sequenciamento

**BLASTp:** Ferramenta de alinhamento local de sequenciamento de proteínas

**PFAM:** Base de dados de famílias de proteínas

**JGI:** Joint Genome Institute's

**MEV:** Microscopia Eletrônica de Varredura

**EDS:** Espectroscopia de Energia Dispersiva

**qRT-PCR:** PCR quantitativa em tempo real

**RNA:** Ácido ribonucleico

**TE:** Tris EDTA

**CoCl<sub>2</sub>:** Cloreto de cobalto

**ADNS:** Ácido 3,5-dinitrosalicílico

**PNP-NAG:** p-Nitrofenil N-acetil-glicosamina

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....                 | VII       |
| LISTA DE FIGURAS.....                               | VIII      |
| LISTA DE TABELAS .....                              | IX        |
| RESUMO.....   | X         |
| ABSTRACT.....                                       | XI        |
| <br>  |           |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                            | <b>4</b>  |
| <br>  |           |
| 1.1 <i>Trichoderma</i> ssp.....                     | 4         |
| 1.2 Características dos solos do Cerrado.....       | 6         |
| 1.3 Cobalto.....                                    | 9         |
| 1.4 Mecanismo de tolerância a metais em fungos..... | 11        |
| <br>  |           |
| <b>2 OBJETIVOS .....</b>                            | <b>14</b> |
| <br>  |           |
| 2.1 Objetivo geral.....                             | 14        |
| 2.2 Objetivos específicos.....                      | 14        |
| <br>  |           |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                  | <b>15</b> |
| <br>  |           |
| 3.1 Manutenção dos fungos.....                      | 15        |
| 3.2 Ensaio em meio sólido.....                      | 15        |
| 3.3 Ensaio em meio líquido.....                     | 15        |
| 3.4 Quantificação de proteínas totais.....          | 16        |
| 3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura.....        | 16        |
| 3.6 Análise estatística.....                        | 17        |
| 3.7 Extração de RNA.....                            | 17        |
| 3.8 Eletroforese em gel de agarose.....             | 18        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.9 Síntese de cDNA.....  | 18        |
| 4.0 qRT-PCR.....  | 19        |
| 5.0 Análise enzimática.....   | 20        |
| 5.1 $\beta$ -1,3-glucanase.....   | 20        |
| 5.2 N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase.....   | 20        |
| 5.3 Quitinase.....  | 21        |
| 5.4 $\beta$ -glicosidase.....   | 21        |
| 6.0 Seleção de genes relacionados ao metabolismo de cobalto e construção de árvore filogenética.....    | 22        |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>  | <b>23</b> |
| 4.1 Crescimento em meio sólido (BDA).....   | 23        |
| 4.2 Crescimento em meio líquido (BD).....   | 25        |
| 4.3 Ensaio enzimático.....  | 26        |
| 4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura.....  | 28        |
| 4.5 Espectroscopia de Energia Dispersiva.....   | 31        |
| 4.6 Identificação de genes relacionados ao metabolismo de cobalto em <i>Trichoderma harzianum</i> ..... | 33        |
| 4.7 Análise da expressão dos genes com domínio CobW e Nico de <i>T. harzianum</i> .....                 | 37        |
| <b>5 CONCLUSÃO.....</b>   | <b>41</b> |
| <b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>43</b> |

## RESUMO

*Trichoderma harzianum* é um fungo filamentosos encontrado em diversos habitats, com abundância em solos, promovendo a decomposição da matéria orgânica. Como fungo micoparasita o *Trichoderma* é amplamente utilizado no controle biológico sendo capaz de induzir a resistência em plantas. O Cerrado é o segundo maior bioma do território brasileiro e apresenta grande riqueza de flora, hidrografia e solos que podem ser exploradas economicamente na agricultura, pecuária e na mineração. O cobalto extraído em atividades de mineração é útil na metalurgia e indústrias de cerâmica, tintas e fertilizantes. As ações humanas utilizando cobalto têm elevado os níveis exposições ambientais aumentando os riscos e agravamento a saúde. Para verificar o efeito das possíveis alterações morfológicas do cobalto em *Trichoderma harzianum* foram observadas através de microscopia eletrônica de varredura a redução no tamanho das unidades celulares e retenção do cobalto nas hifas através das análises observadas em espectroscopia de energia dispersiva. A análise enzimática mostrou um aumento de atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase quando o crescimento era induzido pelo cobalto e um aumento na expressão de genes do domínio CobW 764301, 783875, NicO (844603) e 844570. Além disso, foi observado durante a fase de crescimento alterações no tamanho e a na coloração das hifas como também o aumento na secreção de proteínas e no peso seco micelial que podem ser atribuídos ao efeito do cobalto. Apesar do cobalto afetar no desenvolvimento das hifas de *Trichoderma harzianum* foi observada a capacidade de tolerar a exposição ao metal. O aumento na atividade de quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase pode indicar um provável processo de remodelação para comportar o cobalto nas estruturas da parede celular. Entretanto, o aumento na expressão dos genes de domínio CobW e Nico relacionados ao metabolismo do cobalto necessita ser melhor esclarecidos.

**Palavras-chave:** *Trichoderma harzianum*, cobalto,  $\beta$ -1,3-glucanase, quitinase, genes domínio CobW e Nico, microscopia eletrônica de varredura

## ABSTRACT

*Trichoderma harzianum* is a filamentous fungus found in several habitats, with abundance in soils, promoting the decomposition of organic matter. As a mycoparasitic fungus, *Trichoderma* is widely used in biological control and is capable of inducing resistance in plants. The Cerrado is the second largest biome in the Brazilian territory and has a great wealth of flora, hydrography and soils that can be economically exploited in agriculture, livestock and mining. Cobalt extracted in mining activities is useful in the metallurgy and ceramic, paint and fertilizer industries. Human actions using cobalt have raised environmental exposure levels, increasing risks and worsening health. To verify the effect of possible morphological alterations of cobalt in *Trichoderma harzianum*, the reduction in the size of cell units and retention of cobalt in the hyphae were observed through the analysis observed in energy dispersive spectroscopy. Enzyme analysis showed an increase in  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase activity when growth was induced by cobalt and an increase in the expression of genes from the CobW domain 764301, 783875, NicO (844603) and 844570. During the growth phase, changes in the size and color of the hyphae as well as an increase in protein secretion and mycelial dry weight were observed, which can be attributed to the effect of cobalt. Although cobalt affects the development of *Trichoderma harzianum* hyphae, the ability to tolerate metal exposure was observed. The increase in chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase activity may indicate a probable remodeling process to accommodate cobalt in cell wall structures. However, the increase in the expression of CobW and Nico domain genes related to cobalt metabolism needs to be better clarified.

**Keywords:** *Trichoderma harzianum*, cobalt,  $\beta$ -1,3-glucanase, chitinase, CobW domain genes, scanning electron microscopy

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 *Trichoderma* ssp.

*Trichoderma* pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales e Família Hypocreaceae. Compreende como fungo de vida livre, que se reproduz assexuadamente, presentes com maior frequência em solos de regiões de clima temperado e tropical. Estudos conduzidos por Tulasne (1860) foram o marco para a taxonomia para o gênero das espécies de *Trichoderma* (MACHADO et al., 2012; GHAZANFAR et al., 2018).

Com característica de ampla distribuição a espécie de *Trichoderma* é heterotrófica sendo geralmente abundante no solo, matéria orgânica em decomposição e madeira. Devido à sua diversidade metabólica pode ser encontrado em diversas regiões com diferentes características de existência e condições distintas. A alta capacidade de reprodução, a habilidade de competição e o parasitismo são características comuns presentes em diversos tipos de isolados (DRUZHININA et al., 2006; KREDICS et al., 2014).

O gênero mostra alta diversidade genética na maioria das espécies, é facilmente cultivável e cresce rapidamente em meio artificial produzindo esporos e massa micelial elevada em meio de crescimento com diferentes fontes de nutrientes. As características morfológicas do *Trichoderma* spp é identificada por conidióforos pouco definidos e vastamente ramificados seguidos com de presença de estruturas denominadas de fiálides, conídios e esporos unicelulares caracterizados em tom esverdeado (MUKHERJEE et al., 2013; GHAZANFAR et al., 2018).

*Trichoderma harzianum* é capaz de colonizar raízes de plantas, promover o seu crescimento e combater fitopatógenos (Figura 1) é uma das espécies de biopesticidas mais utilizadas em formulações comerciais (FRACETO et al., 2018). Além disso, através do processo de biossorção, alguns estudos demonstram que o *T. harzianum* tem potencial para remover



metais do solo, em virtude disso pode atuar como biorremediador (HARMAN et al., 2013; KUMAR & DWIVEDI., 2019). *Trichoderma* é um fungo de rizosfera possui a característica de desenvolvimento em pH acidificado e adaptação metabólica podendo atuar no combate de fitopatógenos. Quando aplicado ao solo o *Trichoderma* é capaz de proporcionar benefícios na regulação no crescimento de plantas atuando no sistema radicular (MUKHERJEE et al., 2012; MAYO et al., 2015; MACHADO et al., 2012).

Espécies de *Trichoderma* envolvidas em mecanismos biológicos de controle de fitopatógenos podem ser aplicadas como tecnologias alternativas a utilização de produtos químicos. O biocontrole é possível através das atividades de antibiose e competição atuando no micoparasitismo sobre agentes fitoparasitas. O micoparasitismo de *Trichoderma* envolve a detecção das hifas do fungo hospedeiro bem como enrolar-se, penetrar secretando enzimas como beta-glucanases, quitinases e proteases na parede celular dos fitopatógenos. A competição, atividade ligada ao gênero implica em alcançar quantidade maior de nutrientes em comparação às outras espécies de fungos. Além disso, a antibiose demanda a produção de metabólitos secundários com efeito danoso com capacidade de inibir e destruir outras espécies. A antibiose pode ser caracterizada pela produção de substâncias voláteis e não voláteis. *Trichoderma* spp apresenta cerca de 40 substâncias identificadas com atividade antibiótica (MACHADO et al., 2012; SOOD et al., 2020; ZHANG et al., 2015).



**Figura 1 – *Trichoderma harzianum* em meio de cultura BDA (Fonte Própria).**

Algumas linhagens de *Trichoderma* são utilizadas no controle de fitopatógenos devido sua versatilidade como micoparasitas e são utilizadas há bastante tempo na melhoria de produção de vegetais e em grandes culturas. A promoção do crescimento de plantas relacionada a espécies de *Trichoderma* é devido à capacidade de proporcionar à produção de hormônios ou fatores de crescimentos úteis que favorecem o desenvolvimento de plantas. A indução a resistência é um mecanismo observado na aplicação do *Trichoderma* em vegetais e pode ser observado como item importante para o desenvolvimento, sendo capaz de aumentar a produtividade em diversas culturas (HANSON., 2005; et al., MACHADO et al., 2012).

Em 2012, LOPES et al., identificaram 21 isolados de *Trichoderma* spp. extraídos de solos do Cerrado e constataram que 42.86% destes isolados relacionavam-se à espécie *T. asperellum*, 33.33% à *T. harzianum*, 14,29 à *T. tomentosum*, 4,76% à *T. koningiopsis* e 4,76% *T. erinaceum*. Esses dados apontam que *T. asperellum* e *T. harzianum* são as espécies mais numerosas em solos do Cerrado.

## **1.2 CARACTERÍSTICAS DO SOLO DO CERRADO**

Considerado a savana com maior biodiversidade do mundo o cerrado brasileiro é palco de crescentes ocupações humanas em busca de interesses econômicos, ambientais e interesses sociais (Figura 2). Seu bioma demonstra características expressivas de diversidades biológicas, como riqueza em recursos hídricos abrigando importantes unidades de conservação e berçário de bacias e águas. Características ecológicas e riquezas inestimáveis para os povos que habitam esta região (BRASIL., 2011).



**FIGURA 2 – Bioma cerrado (Fonte: site WWF-Brasil, 2021).**

O Cerrado é segundo maior bioma brasileiro ocupando 21% do território nacional e somente é superado pelo o bioma amazônica. Atualmente existem áreas restantes de Cerrado que se desenvolveram sobre solos muito antigos, intemperizados, ácidos, enfraquecidos de nutrientes, porém, que possuem alumínio em concentrações elevadas (Figura 3). Com o objetivo na produção agrícola, são utilizados fertilizantes e calcários aos solos do Cerrado. Portanto, não constituindo um obstáculo para a ocupação de grandes extensões de terra pela agricultura moderna no Brasil (KLINK & MACHADO., 2005).

A fertilidade baixa dos solos do Cerrado perpassa do alto poder de fixação do fósforo, alta concentração de alumínio, baixa capacidade troca catiônica e de deficiência de nutrientes. Além disso, a rápida infiltração, a baixa retenção de água e a má distribuição das chuvas são condições que desfavorecem o desenvolvimento vegetal. Portanto, torna-se essencial o uso de fertilizantes para o crescimento e desenvolvimento de plantas. Por outro lado, a associação simbiótica com fungos micorrízicos aumenta a capacidade de absorção de nutrientes (NETO., 1999).

| Elemento | Concentração média no solo | Limites de concentração na planta | Necessidades |
|----------|----------------------------|-----------------------------------|--------------|
| Si       | 330                        | 0,2-10                            |              |
| Al       | 70                         | 0,04-0,5                          |              |
| Fe       | 40                         | 0,002-0,7                         | aprox. 0,1   |
| Ca       | 15                         | 0,4-15                            | 3-15         |
| K        | 14                         | 1-70                              | 5-20         |
| Mg       | 5                          | 0,7-9                             | 1-3          |
| Na       | 5                          | 0,02-1,5                          |              |
| N        | 2                          | 12-75                             | 15-25        |
| Mn       | 1                          | 0,003-1                           | 0,03-0,05    |
| P        | 0,8                        | 0,1-10                            | 1,5-3        |
| S        | 0,7                        | 0,6-9                             | 2-3          |
| Sr       | 0,25                       | 0,003-0,4                         |              |
| F        | 0,2                        | até 0,02                          |              |
| Rb       | 0,15                       | até 0,05                          |              |
| Cl       | < 0,1                      | 0,2-10                            | > 0,1        |
| Zn       | 0,09                       | 0,001-0,4                         | 0,01-0,05    |
| Ni       | 0,05                       | até 0,005                         |              |
| Cu       | 0,03                       | 0,004-0,02                        | 0,005-0,01   |
| Pb       | 0,03                       | até 0,02                          |              |
| B        | 0,02                       | 0,008-0,2                         | 0,01-0,04    |
| Co       | 0,008                      | até 0,005                         |              |
| Mo       | 0,003                      | até 0,001                         | < 0,0002     |

\* Para expressar os valores em percentagem (%) na matéria seca, divida por 10 os dados apresentados.

**FIGURA 3 – Conteúdo médio dos elementos minerais (em g kg<sup>-1</sup> de matéria seca) no solo e na fitomassa de plantas terrestres. Também é apresentada a necessidade média dos elementos minerais segundo Larcher (2004), baseada em vários autores (Fonte: Embrapa: Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 2010).**

Metais são todos os elementos químicos que apresentam ligações químicas fortes entre átomos (ligação metálica) seguindo as características físicas de condução de eletricidade, de brilho, de maleabilidade, e de flexibilidade. Os metais pesados transcorrem naturalmente, em baixos teores, na composição das rochas carbonáticas. Algumas fontes de origem humanas são responsáveis pelo espalhamento de metais pesados no ambiente são: atividade de mineração, fundição e refinamento, agricultura (aplicação de fertilizantes e pesticidas), uso sistemático de compostos de metal, queima de combustíveis fósseis e de biomassa na zona rural, incineração de resíduos industriais e urbanos, lixiviação de depósitos de lixo e emissões veiculares (FORSTNER & WITTMANN., 1981; BACCAN., 2004).

Os efeitos danosos dos metais pesados exercem não é exclusivo apenas sobre o crescimento das plantas, mas os processos bioquímicos que acontecem nos solos também são afetados. O acréscimo no solo de material orgânico em decomposição, o nitrogênio mineralizado e a inibição da nitrificação podem ser exibidos em locais contaminados por metais pesados. Alguns metais como o cobre (Cu) e o zinco (Zn) são micronutrientes necessários para as plantas. Além de serem dispensáveis promovem acumulação no solo e em níveis tóxicos levam danos a plantas e ao homem (TSUTIYA., 2001; MAAS et al., 2014).

### 1.3 COBALTO

Em 1735 o químico sueco Georg Brandt (1694-1768) a partir de uma amostra de esmaltita isolou pela primeira o cobalto metálico. O cobalto apresenta características ferromagnéticas sendo considerado um elemento de transição na tabela periódica pertencendo ao quarto período. Só é possível encontrar na natureza em forma de isótopo  $^{59}\text{Co}$ , contudo a obtenção sintética do isótopo radioativo  $^{60}\text{Co}$  é devido a amostras de  $^{59}\text{Co}$  por bombardeamento de nêutrons (MEDEIROS., 2013).

Os minérios de cobalto são utilizados a cerca de cinco mil anos em artefatos de cerâmica egípcia, em vidros pérsicos e em vidros e porcelanas chinesas. A esmaltita é o pigmento comum mais utilizada em cerâmicas com a tonalidade azul durante vários séculos. Sendo o 30º elemento mais abundante na crosta terrestre, o cobalto é encontrado na natureza somente combinado com outros elementos formando mais de 200 minerais cujo poucos se apresentam comercialmente relevantes: esmaltita –  $\text{CoAs}_2$ , cobaltita –  $\text{CoAsS}$ , linneíta –  $\text{Co}_3\text{S}_4$  e eritrita –  $\text{Co}_3(\text{AsO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ . Desse modo, na maior parte desses minerais, o cobalto encontra-se ligado a elementos metálicos como exemplo: o níquel, o cobre, o chumbo, o ferro e a prata (GREENWOOD & EARNSHAW.,1997; MEDEIROS., 2013).



Figura 4 – Liga de cobalto (Fonte: Britannica Escola, 2021)

As maiores consumidoras de cobalto são as indústrias de tintas e cerâmicas, mas atualmente a indústria metalúrgica (Figura 5), utiliza o elemento na produção de ligas metálicas, produção de componentes para usinagem do aço, fabricação de ferramentas e peças para maquinários (Greenwood & Earnshaw., 1997), (Alves & Rosa., 2003). Além disso, pode ser usado na indústria química, como catalisador de reações orgânicas e na radioterapia, sendo utilizado na radiação ionizante (raios  $\gamma$ ) emitido pelo cobalto<sup>60</sup> (CARDOSO., 2010).

Em seres humanos, o cobalto é um metal que apresenta grande destaque biológico. A cobalamina (vitamina B12) apresenta em sua estrutura central um íon de cobalto e a importância dessa vitamina envolve a participação principalmente em processos de síntese de aminoácidos, ácidos nucleicos e a formação dos eritrócitos. Desse modo, A nutrição insuficiente e a baixa absorção de vitamina B12 podem causar a anemia perniciosa. A exposição ocupacional de cobalto pode apresentar efeitos tóxicos graves que podem de modo geral comprometer os sistemas respiratório, gastrointestinal, cardíaco, tireoide e pele (ALVES e ROSA.,2003; NATIONAL RESEARCH COUNCIL.,1989; HEBERT.,1988).

O cobalto é um elemento que não pode ser degradado, porém pode ter sua composição alterada a produtos metabólicos o que pode minimizar sua toxicidade. Um modelo de metabolismo de cobalto foi observado em *Aspergillus niger* mostra que a metabolização do cobalto pode ocorrer por bioprecipitação (YANG et al., 2019).

A exposição ambiental pode ser determinada pelas atividades industriais e extração mineral durante o processo moagem do minério. Os solos podem ser considerados moderadamente poluídos quando os valores atingem entre 26,5 a 30,0 mg de Co/Kg e altamente poluídos quando as concentrações ultrapassam de 36,0 a 69,0 mg de Co/Kg (ALVES & ROSA., 2003).

O cobalto pode influenciar na absorção de nitrogênio por via simbiótica visto que se encontra como parte estrutural da vitamina B12, sendo necessária para a síntese de leghemoglobina em plantas (SILVA et al.,2011). A deficiência de cobalto em pastagens de algumas regiões ocorre devido a condições de

alcalinidade do solo, como também excesso de manganês. Dessa forma, promove a diminuição da absorção do elemento pelas plantas (GONZÁLEZ & SILVA., 2003). Diversos produtos comerciais disponíveis no mercado contêm cobalto em concentrações variáveis que podem ser utilizados para diversas culturas.

A aplicação de fertilizantes com presença de cobalto tem sido uma prática comum na agricultura. O cobalto influencia na absorção de nitrogênio por via simbiótica porque faz parte da estrutura da vitamina b12 necessária para síntese de leg-hemoglobina. Os baixos teores de cobalto podem provocar deficiência de nitrogênio resultando em baixos teores de proteínas na planta (MARCONDES & CAIRES., 2005; MORAGA., 2018).

Visto que *Trichoderma* spp têm sido amplamente utilizadas no aumento de produção agrícola e considerando que cobalto está recorrentemente presente em fertilizantes e produtos de aplicação agrícola, torna-se importante estudar os efeitos que esse metal apresenta no crescimento e atividade de biocontrole desses fungos.

#### **1.4 MECANISMOS DE TOLERÂNCIA A METAIS EM FUNGOS**

A exposição de metais no meio ambiente esta ligada em grande parte as ações humanas como no derramamento de resíduos em atividades de mineração, no uso de fertilizantes na agricultura, atividades industriais e descarte de lixo. Os produtos lançados diretamente na natureza causam forte impacto podendo inviabilizar o uso de solos e rios por períodos longos afetando assim a produção de alimentos, consumo de água e também na saúde humana. Metais tóxicos como Hg, Cd e Pb encontrados despejados em rios e solos possuem forte toxicidade em organismos. E mesmo apesar de essenciais, metais como Zn, Mn e Co quando encontradas concentrações elevadas podem provocar também danos, afetando assim fatores bióticos e abióticos importantes e abalando o equilíbrio nos ecossistemas (BELLION et al., 2006; ANAHID et al., 2010).

Os efeitos dos metais já foram observados e relatados de vários modos em microrganismos em outros estudos. A adoção mecanismos de tolerância capazes de neutralizar a toxicidade dos metais são estratégias observadas em certos microrganismos como medidas de sobrevivência em ambientes com baixa capacidade de crescimento. Os modelos de estudo já observados em fungos detalham diferentes formas da capacidade de tolerância as metais e seus mecanismos. Fungos filamentosos como *Aspergillus* e *Penicillium* mostraram alta tolerância em exposição a metais Ni, Co, Mo, V, Mn, Fe, W e Zn em mecanismos de bioquelação demonstrando de forma eficiente em fase de crescimento (ANAHID et al., 2010).

Os mecanismos de bioquelação já observados anteriormente podem ser melhores explicados em atividades de quelação de ligantes de parede celular. Moléculas orgânicas como ácidos tricarbóxicos não pertencentes à matriz celular são excretados para quelação de íons de metais reduzindo a captação e promovendo a acidificação do solo. A biossorção é um mecanismo independente da atividade metabólica fúngica ao contrario da precipitação de substâncias excretadas torna-se dependente do metabolismo. (GADD., 1993; BLAUDEZ et al., 2000; FREY et al., 2000; LANFRANCO et al., 2002; BELLION et al., 2006).

Estudos observados mostram que a melanina entre os componentes da parede celular aumenta a capacidade de biossorção de metais. A indução da atividade da lacase e expressão gênica e produção de compostos polifenólicos foram observadas como resposta na exposição excessiva a metais em *Paxillus involutus*. Além disso, um mecanismo pré-adaptativo de colonização de solos poluídos pode ser observado em *O. maius* ligado a atividade enzimática da poligalacturonase capaz de degradar a pectina da parede celular de vegetais provocando o aumento de exposição Cd e Zn. (FORGATY & TOBIN., 1996; JACOB., 2004; MARTINO et al., 2000).

A complexação por peptídeos são mecanismo baseado na atividade de metalotioínas ligadas a peptídeos amplamente atribuídas ao seqüestro de metais ambientalmente tóxicos. A correlação entre a exposição de metais e nível de expressão é base de estudos observados com metalotioínas em



*Paxillus involutus* importante para compreensão da complexação de peptídeos intracelulares. Além disso, outros genes relacionados às fitoquelatinas foram seqüenciados no genoma de *Laccaria biocolor* e documentados em *Saccharomyces cerevisiae* e isolados de *Aspergillus* demonstra o papel das fitoquelatinas na exposição de metais em fungos. A glutathione outro importante componente intracelular já identificado em espécies fúngicas atua na quelação e seqüestro de metais impedindo a progressão da lesão celular (KNEER et al., 1992; CANOVAS et al., 2004; BELLION et al., 2006)

Transportadores de metais são proteínas capazes extrair íons de metais tóxicos do citosol para fora da célula. A detoxificação celular pode utilizar os compartimentos vacuolares e gerar acúmulo de metais conjugados com glutathione e fitoquelatinas. A relação de fatores de transcrição Zap1 e participação ativa de membros de famílias de transportadores atua diretamente na detoxificação celular por ação de permeases (LI et al., 1997; ORTIZ et al., 1992; BELLION et al., 2006).

A formação de espécies de radicais livres são efeitos observados a exposição direta e indireta a metais e pode proporcionar danos aos componentes celulares. As tioredoxinas incluídas em muitos processos celulares propõem o dobramento, regulação de proteínas e reparação de proteínas danificadas pela ação oxidativa dos metais. Além disso, a indução de superóxido dismutases atividades enzimáticas ativas contra estresse oxidativo e podem agir na prevenção do acúmulo peróxido de hidrogênio (HOLMGREN., 1989; TROTTER & GRANT., 2002; OTT et al., 2002; BELLION et al., 2006).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS:

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da exposição ao cobalto sobre o crescimento de *Trichoderma harzianum*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Analisar a tolerância de *T. harzianum* ao metal cobalto através de ensaios de crescimento em meio de cultura.
- Avaliar os aspectos morfológicos de *T. harzianum* quando exposto ao metal cobalto através de microscopia eletrônica de varredura.
- Avaliar a presença do metal do cobalto nas estruturas das hifas através de espectroscopia de energia dispersiva.
- Avaliar se há alteração da atividade enzimática de enzimas relacionadas ao micoparasitismo durante o crescimento de *T. harzianum* tratado com cobalto.
- Identificar genes relacionados ao metabolismo de cobalto presentes no genoma de *T. harzianum*, a partir da análise no banco de dados e utilizando ferramentas de bioinformática;
- Avaliar a expressão de genes possivelmente relacionados ao metabolismo de cobalto em *T. harzianum* durante o crescimento com cobalto, utilizando PCR em tempo real quantitativa;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. MANUTENÇÃO DOS FUNGOS

O isolado de *Trichoderma harzianum* (ALL - 42), da coleção do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos, foi mantido em meio BDA (glicose 20 %; glicose 2 %; ágar 2 %) com a realização de repiques periódicos. A preservação do isolado também foi realizada usando o método de Castellani (1939).

#### 3.2. ENSAIO EM MEIO SÓLIDO.

Para o crescimento das culturas de *T. harzianum* foram utilizadas discos de 3 mm de diâmetro por em média 4 dias e utilizadas para inocular placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio BDA acrescido de 0,0; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 mg/ml<sup>-1</sup> de CoCl<sub>2</sub>. O pH foi corrigido com solução de NaOH 0,5 M ou HCl 1 M para 5,6 ± 0,2. O crescimento aconteceu em temperatura ambiente utilizando fotoperíodo e fotografado em imagens durante 4 dias e ao fim de 24 dias. A análise foi realizada em triplicata e a aferição das medidas de crescimento foi realizada utilizando paquímetro.

#### 3.3. ENSAIO EM MEIO LÍQUIDO

O micélio de *T. harzianum* foi colocado em crescimento ativo por 7 dias e foi filtrado em lã de vidro para a separação dos esporos. Foi utilizada a câmara de Neubauer para a contagem de esporos e em seguida, a concentração final de 10<sup>7</sup>esporos/mL, foi utilizada para a inoculação. O meio BD (caldo de batata 20 %; dextrose 2 %) foi adicionado de 0,0; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 mg/ml<sup>-1</sup> de CoCl<sub>2</sub>, ajustando-se o pH com solução NaOH 0,5 M ou HCl 1 M para 5,6 ± 0,2. Após 48 horas de crescimento em agitador rotatório à 28 °C e 160 rpm, o micélio foi filtrado à vácuo, lavado com solução de NaCl 0,9 % para a eliminação do meio de cultura e submetido a estufa até que sua biomassa se

tornar peso constante. O filtrado foi armazenado em  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e liofilizado para quantificação de proteínas totais e dosagem de enzimas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata conforme a concentração aplicada junto ao meio.

### **3.4. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS**

O método de Bradford (1976) foi utilizado para observar o perfil da concentração de proteínas totais secretadas após o tratamento com metais.

### **3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)**

Foram realizadas análises das amostras de *Trichoderma harzianum* em estágios de crescimento das hifas na fase de esporulação na concentração de  $0,0\text{ mg/ml}$  como controle e no cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ )  $0,8\text{ mg/ml}$  e para uma melhor análise de desenvolvimento dessas estruturas, por MEV.

Após o 4<sup>o</sup> dia foram retiradas amostras com uma região  $3\text{ mm}$  contendo micélio das placas de petri contendo meio de BDA com o auxílio de ponteiros e transferidas para tubos eppendorf de  $1,5\text{ ml}$  de fundo arredondado, com o auxílio de pipeta de Pasteur foi realizada fixação, lavagem e desidratação. As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, em tampão cacodilato de sódio ( $0,05\text{ M}$ , pH 7,2), em seguida as amostras, foram armazenadas na geladeira por 24 horas. Após a fixação o material foi retirado do fixador com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e realizada a lavagem (quatro vezes) em tampão cacodilato ( $0,05\text{M}$ , pH 7,2), por 15 min. cada.

Em seguida todas as amostras foram desidratadas com etanol 30% (v/v), 50% (v/v), 70% (v/v), 80% (v/v), 90% (v/v), deixando agir por 15 minutos, finalizando com a desidratação em etanol absoluto PA 100%, por 15 minutos, duas vezes e submetidas à análise por microscopia eletrônica por varredura e espectroscopia de energia dispersiva.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A diferença entre os resultados foi analisada utilizando o programa GraphPadPrism versão 7.03 para Windows. Foi realizado o teste ANOVA oneway de um fator seguido do teste de Tukey para comparação múltipla entre os dados. O nível de significância considerado foi de 5 %. Asteriscos indicam que os dados apresentaram diferença estatisticamente significativa e letras iguais indicam o oposto.

### 3.7 EXTRAÇÃO DE RNA

A partir do crescimento em meio líquido do *Trichoderma harzianum* retirado previamente em tratamento com cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ), a etapa seguinte foi a extração de RNA para dar sequência aos experimentos, dentre eles, a síntese de cDNA. Na etapa de extração, os micélios de *Trichoderma harzianum* foram armazenados em ultra freezer a  $-80^\circ\text{C}$  e em seguida colocados em gral com o auxílio de pistilo, para serem macerados com adição de nitrogênio líquido.

Após completa maceração dos micélios, os conteúdos seguiram sendo armazenados em eppendorf sob a presença de 1 mL de reagente TRIReagente (Invitrogen™) para manutenção de estado de conservação e congelados a  $-80^\circ\text{C}$ . Em seguida, os tubos em eppendorf com as amostras foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Após centrifugado o conteúdo sobrenadante das amostras foi transferido para novos tubos eppendorfs contendo 200 ul de clorofórmio. E depois homogeneizados em vórtex e incubados por 3 minutos à temperatura ambiente.

O sobrenadante das amostras foi novamente transferido para novos tubos eppendorf contendo 250 ul de isopropanol e 250 ul de citrato de sódio. Após isso, foram misturados por inversão durante 10 segundos. A solução aquosa do conteúdo das amostras foi incubada por de 10 minutos à temperatura ambiente, e em seguida centrifugada por 12.000 rpm por 10 minutos. Foi descartado o sobrenadante do conteúdo, e o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 75% e centrifugado a 7.500 rpm por 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$ .

O sobrenadante do *pellet* foi removido, e logo após procedeu-se a secagem do mesmo em equipamento speedVac por 10 minutos. E por último, o pellet foi ressuscitado em 50 ul de água DEPC. O RNA extraído das amostras foi quantificado em espectrofotômetro (Thermo Scientific Nano Drop™) nas absorvâncias 260/280nm e 260/230nm utilizado para avaliação da pureza da amostra de RNA.

Conforme o fabricante é aceitos valores de até 2,0 para absorvâncias de 260/280 e 260/230, visto que, valores fora deste limiar, podem indicar contaminação das amostras. Em seguida para avaliar da integridade do RNA das amostras foi realizado a eletroforese em pH alcalino em gel de agarose.

### **3.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE**

Após o RNA extraído, o material foi quantificado e em seguida avaliado a integridade do RNA em gel de agarose-formaldeído para observar as bandas de rRNAs 28S e 18S das amostras coletadas nas condições de controle e tratamento com cloreto de cobalto.

### **3.9 SÍNTESE DE cDNA**

Para realização da síntese da primeira fita de cDNA foi realizada as junções das amostras em tratamento com cloreto de Cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ) nas concentrações de 0,0; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 mg/ml (réplicas biológicas 1, 2 e 3). A quantificação do RNA foi realizada em tecnologia NanoDrop, de cada amostra foi retirada réplica técnica, a quantidade suficiente para uma concentração final de 5 ug/ul. Iniciou-se então para a remoção do DNA genômico o tratamento das amostras com DNase, ficando somente o RNA. Para a efetuação desta etapa foram empregados água milli-Q, RNAsin, tampão de DNase, RNA e DNase – todos os reagentes que compõem o próprio kit.

Em seguida, as amostras foram levadas para o termociclador e selecionadas dois ciclos seguidos: 37° C por 1h; com a adição de 2µl de

EDTA e 65° por 10 min. O passo seguinte foi a realização de cDNA, para essa etapa usou-se o RNA das amostras anteriormente tratados. Foi transferido para o termociclador por 5' a 65°. Adicionou-se a solução o tampão de reação, o inibidor de RNase, a transcriptase e o DNTP. Novamente em seguida levou-se ao termociclador em três tempos seguidos: 25° por 5'; 45° por 60' e 70° por 5'.

#### 4.0 qRT-PCR

As amostras pós-tratamento com DNase e síntese de cDNA foram direcionadas para análise por RT-PCR no equipamento iQ5 (Bio-Rad), utilizando o reagente SYBR Green para o sinal de detecção, conforme com as instruções estabelecidas pelo o fabricante.

Para conferir a eficiência da amplificação dos *primers* foi efetuado um ensaio com diluições de cDNA de 1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000. O programa de amplificação selecionado da qRT-PCR usados nesta análise foi: 95°C - 10 minutos, seguidos de 39 ciclos de 95°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos seguinte, de curva de dissociação de 60°C até 95°C com consecutivos incrementos de 0,5°C, por 10 segundos.

Para avaliação do nível de genes expressos submetidos a partir das amostras de *T. harzianum* em crescimento sob condições fisiológicas, sem presença do metal e aplicada como controle. Neste teste utilizou-se 10 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher), 2 µL de mix de primers Forward e Reverse (10 µM), 2 µL de cDNA e 6 µL de água livre de nucleotídeo.

Os valores de eficiência, em conjunto com os CTs (*cycle threshold*) foram usados para calcular a expressão relativa. Os níveis de expressão dos genes foram calculados segundo o método expressão relativa  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (SILVA et al., 2016). Essa etapa foi conduzida com três repetições. As amostras foram comparadas e cada um dos resultados foram analisados e as diferenças entre as condições relacionadas aos controles usando GraphPadPrism 7.03 para Windows.

**Tabela 1.** Sequência dos primers dos genes utilizados na qRT-PCR.

| <b>Gene</b>       | <b>Sequência <i>forward</i></b>                           | <b>Sequência <i>reverse</i></b> |
|-------------------|---|---------------------------------|
| <b>&gt;764301</b> | GTCAACACAGGCCTCTTCGA                                      | CATTGCGGCCATTTACCTCG            |
| <b>&gt;783875</b> | GGCCCGTGTTAAGAGTGACA                                      | GATCATCGCCGTTTCGTTTGG           |
| <b>&gt;834603</b> | CTGGAGGATGTCGACCGATG                                      | CGTTGATAAAAGCGAGGCGG            |
| <b>&gt;844570</b> | GCTTTCAACGGGTGGGAAAC<br>(hairpin)<br>TTCATGGCATCCCCTCCAAC | TAAAGCACCCATCCGTTCCC            |

## 5.0 ANÁLISE ENZIMÁTICA

### 5.1 $\beta$ -1,3-glucanase

O ensaio da atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase foi realizado conforme descrito por Ramada et al. (2015). Em microplaca para termociclador, a reação enzimática foi acompanhada com a adição de 10  $\mu$ L do extrato enzimático com 20  $\mu$ L de Laminarina (Sigma) 0,75% (p/v) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e incubada em um termociclador a 50 °C por 15 minutos. Em seguida, 100  $\mu$ L do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) foram adicionados e a reação incubada a 95 °C por 5 minutos. Logo após a reação foi resfriada por 2 minutos a 25 °C e 100  $\mu$ L e transferidas para placa de ELISA e aplicada a absorbância de 550 nm em leitor de microplacas. A concentração de açúcar redutor foi estabelecida por espectrofotometria a 550 nm pelo método de DNS (MILLER, 1959), empregando glicose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi determinada como a quantidade de enzima necessária para formar 1  $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto de reação.

### 5.2 N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase

Para o ensaio da atividade de N-acetil-glicosaminidase, 100  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5.0 mais 40  $\mu$ L de p-nitrofenil N-acetil-



glicosamina 5 mM (PNP-NAG 5 mmol/L) e 10  $\mu$ L das amostras à 37 °C por 15 minutos em um termociclador. A reação foi interrompida para a adição de 100  $\mu$ L de Carbonato de Sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 0,1 M. Os 100  $\mu$ L do conteúdo foram transferidos para uma placa de ELISA e a absorbância obtida à 405 nm em leitor de microplacas. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi determinada a como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de PNP por minuto de reação.

### 5.3 Quitinase

A atividade enzimática da quitinase foi determinada pela reação com quitina coloidal (0,5%) (p/v) em tampão acetato de sódio (50 mmol/L pH 5.0). Amostras de 50  $\mu$ L de amostra foram incubados com 50  $\mu$ L de quitina coloidal sob agitação por 16 horas a 37° C. Em seguida, 100  $\mu$ L do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) foram acrescentados a reação e incubada a 95 °C por 5 minutos. Após a parada reação foi resfriada por cerca de 2 minutos a 25 °C e 100  $\mu$ L foram colocados na placa de ELISA e a absorbância obtida a 550 nm em leitor de microplacas. A concentração de açúcar redutor foi estabelecida por espectrofotometria a 550 nm pelo método de DNS (MILLER, 1959), foi aplicada a glicose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi estipulada como a quantidade de enzima necessária para formar 1 $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto de reação.

### 5.4 $\beta$ -glicosidase

O ensaio enzimático da  $\beta$ -glicosidase foi determinado pela reação com p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (pNP-G 5 mmol/L). As amostras de 10  $\mu$ L da enzima foram incubados com 20  $\mu$ L de substrato mais 70  $\mu$ L de tampão acetato de sódio (50 mmol/L pH 5.5) a 37°C por 15 minutos. A reação foi interrompida para acrescentar 100  $\mu$ L de Carbonato de Sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 0,1 M. A concentração de PNP liberada na reação foi definida pela absorbância obtida à 405 nm em leitor de microplacas. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi

estipulada como a quantidade de enzima liberada a 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol por minuto de reação.

## 6.0 SELEÇÃO DE GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO DE COBALTO E CONTRUÇÃO DE ÁRVORE FILOGENÉTICA

Buscou-se a palavra-chave “cobw” no banco de dados de *T. harzianum* TR274 v1.0 no Mycocosm (JGI). Foram obtidos os genes: 764301, 783875, 834603 e 844570. Posteriormente foi realizada a busca por domínios protéicos nessas proteínas, utilizando o banco de dados Pfam, a partir da ferramenta “hmmscan” e o parâmetro cut\_ga (gatheringthreshold). Este parâmetro utiliza pontos de corte diferentes para cada domínio, desta forma, para que o domínio apresentado na proteína de interesse seja válido, ele precisa atingir o ponto de corte estabelecido. Para mais infos: <http://eddylab.org/software/hmmer3/3.1b2/Userguide.pdf>). Para identificar possíveis outros genes Cobw, foi realizado um BlastP destas sequências contra o banco de dados de *T. harzianum* TR274. Não foi identificado nenhum novo gene.

Foram construídas duas árvores filogenéticas, uma para cada domínio (CobW e NicO). As sequências foram alinhadas usando o software MAFFT, parâmetros default. Esses alinhamentos foram editados manualmente utilizando o software MEGA-X

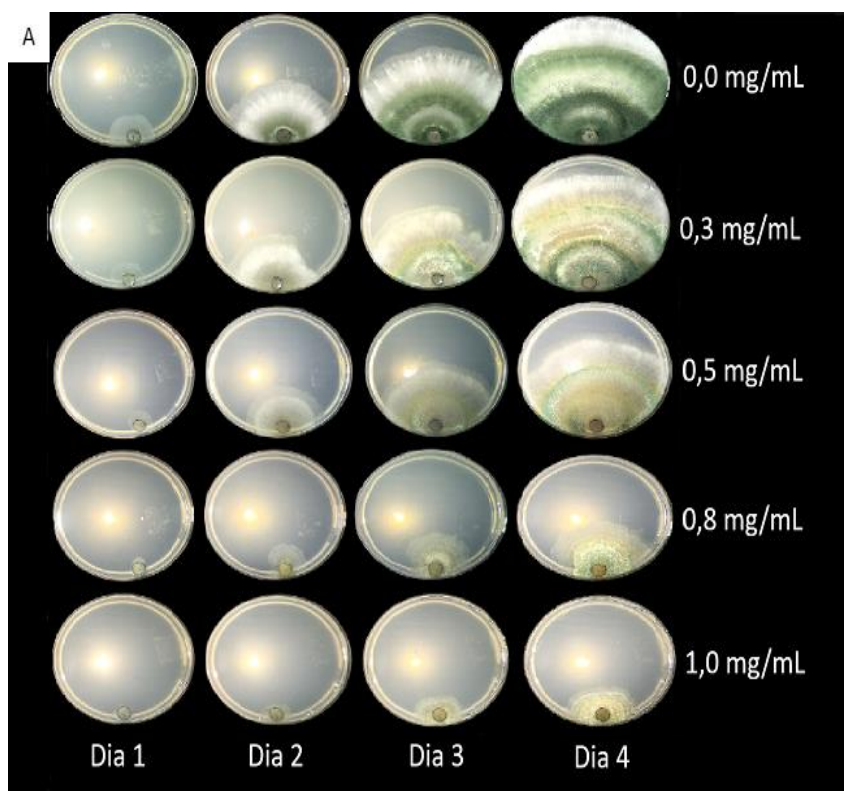
As árvores foram construídas utilizando o software IQTree, utilizando ultra bootstrap com 1000 repetições e o restante dos parâmetros default. Os modelos de substituição selecionados para as árvores foram LG+G4 e JTT+G4 para a árvore de CobW e de NicO, respectivamente.

Por fim, as árvores foram visualizadas e editadas no software iTOL. Nas árvores, são mostrados apenas os valores de bootstrap acima de 60, e as seções e clados são baseados nas classificações mais recentes (<https://link.springer.com/article/10.1007/s13225-020-00464-4>).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

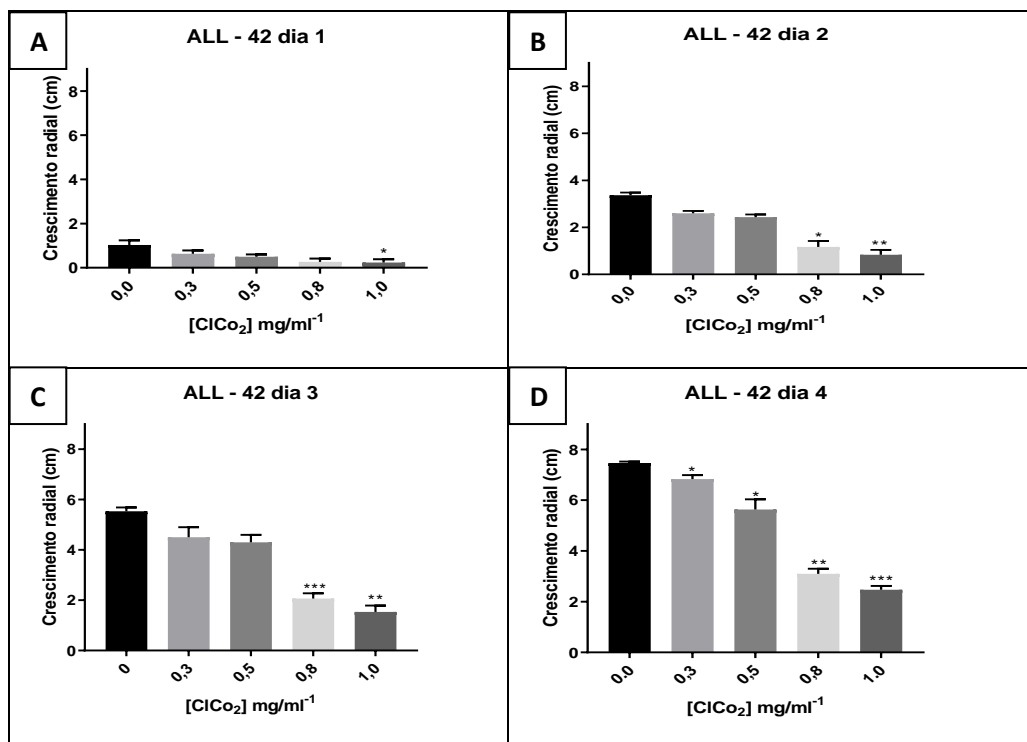
### 4.1 CRESCIMENTO EM MEIO SÓLIDO (BDA)

Para observar a resposta de *T. harzianum* aos efeitos da exposição ao cobalto, diferentes concentrações do metal foram utilizadas e o crescimento do fungo foi acompanhado por 4 dias. Em meio sólido (BDA), o crescimento foi registrado ao longo de 4 dias em placas de petri de 90 mm acrescentado  $\text{CoCl}_2$  nas concentrações de 0,0; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0  $\text{mg/ml}^{-1}$ . Ao quarto dia, a amostra de *T. harzianum* sem exposição ao metal atingiu o crescimento máximo ocupando completamente a placa. Já nas condições com diferentes concentrações do metal a taxa de crescimento do fungo foi menor, sendo mais inibida nas maiores concentrações (Figura 6 - A). Em seu aspecto morfológico, o fungo apresentava esporulação ao ser exposto ao cobalto. Contudo, os esporos apresentavam cor marrom-amarelada, halos distorcidos e irregulares e o micélio apresentavam espessuras finas.



**Figura 6** – *Trichoderma harzianum* (ALL - 42) crescimento em meio BDA nas concentrações 0,0; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0  $\text{mg/mL}$  de  $\text{CoCl}_2$ . Nota-se a mudança na cor e no comprimento das hifas

distribuídas sobre o meio ao longo do primeiro ao quarto dia de crescimento de acordo com a concentração do metal. Ao longo do quarto dia o controle completa a placa, enquanto as concentrações 0,3 e 0,5 mg/mL de  $\text{CoCl}_2$  desenvolve suas hifas com mudança na cor d micélio enquanto as concentrações 0,8 e 1,0 mg/mL de  $\text{CoCl}_2$  não alcançaram a metade de placa.



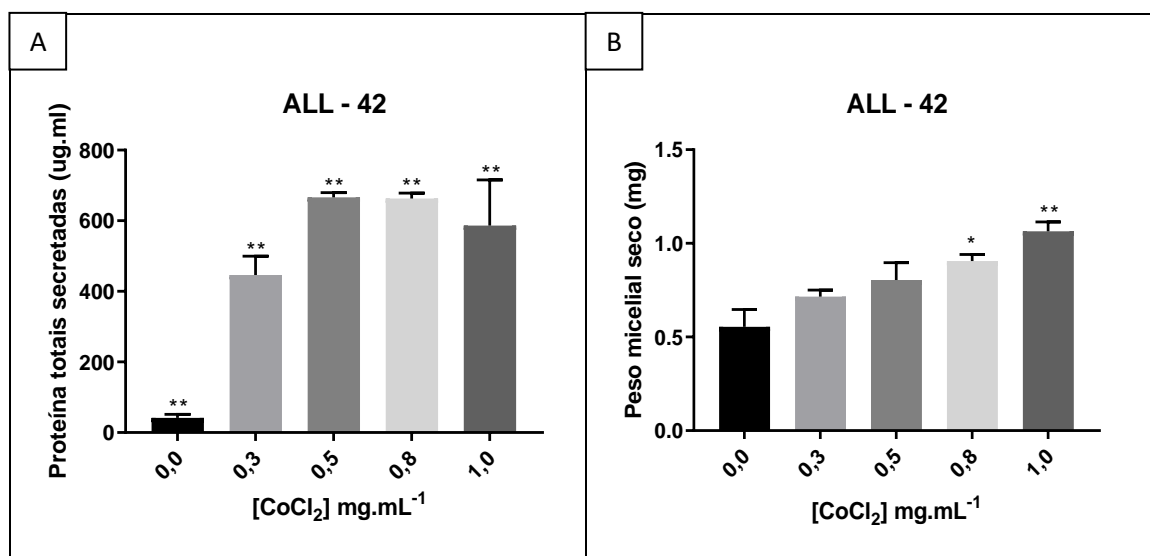
**Figura 7** – Desenvolvimento de *Trichoderma harzianum* (ALL -42) em meio BDA na presença de  $\text{CoCl}_2$ . A – Primeiro de crescimento. B – Segundo dia de crescimento C – Terceiro dia de crescimento as concentrações 0,3 e 0,5 mg/mL de  $\text{CoCl}_2$  crescem próximo das medidas de controle e D – Quarto dia de crescimento nota-se a diferença nas medidas no crescimento entre o controle e as concentrações 0,8 e 1,0 mg/mL de  $\text{CoCl}_2$ . As comparações foram realizadas pelo teste ANOVA seguida de fator de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Estudos dos efeitos do estresse oxidativo em *Debaryomyces hansenii* mostram que os níveis elevados de cobalto foram capazes de induzir alterações relacionadas à diminuição do crescimento das células (GUMÁ-CINTRÓN et al., 2015). Esse mesmo efeito foi observado nas imagens de microscopias analisadas em *Trichoderma harzianum* em tratamento com o cobalto. Possíveis respostas apresentadas em genes regulados positivamente envolvidos na síntese e no reparo do DNA justificam o crescimento e a divisão celular em resposta aos danos ocasionados ao estresse oxidativo em *D. hansenii* (GUMÁ-CINTRÓN et al., 2015).

Foi demonstrado em estudos com *D. hansenii* um efeito semelhante ao observado no crescimento de *T. harzianum* em meio BDA e observado crescimento inibido quando as concentrações de cobalto se apresentavam elevadas. A preservação do aspecto morfológico da parede celular e outras demais estruturas não estão bem esclarecidas quando o *T. harzianum* exposto aos efeitos do estresse oxidativo em exposição ao cobalto. Contudo, a resposta do *D. hansenii* em exposição ao cobalto demonstra que a eliminação das espécies radicais tóxicas através de um sistema não enzimático de defesa e enzimático como exemplo de regulação positiva de glutathione s-transferase, metabolismo sulfiredoxina e outras (GUMÁ-CINTRÓN et al., 2015).

## 4.2 CRESCIMENTO EM MEIO LÍQUIDO (BD)

Em meio BD *T. harzianum* cresceu por 48 horas (47 horas sendo acrescentado por uma hora o tratamento com cobalto) nas concentrações de 0,0; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 mg/ml<sup>-1</sup> em agitação por 160 rpm. A partir do filtrado do meio de cultura foram mensuradas as proteínas totais secretadas, as quais apresentaram elevações em suas concentrações de 0,3 mg/ml<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub> até 1,0 mg/ml<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub> (Figura 7 - A). O peso micelial seco mostrou elevação à medida que as concentrações de cobalto aumentavam (Figura 7 - B). O que demonstra que concentração do metal influencia na quantidade de proteína secretada.



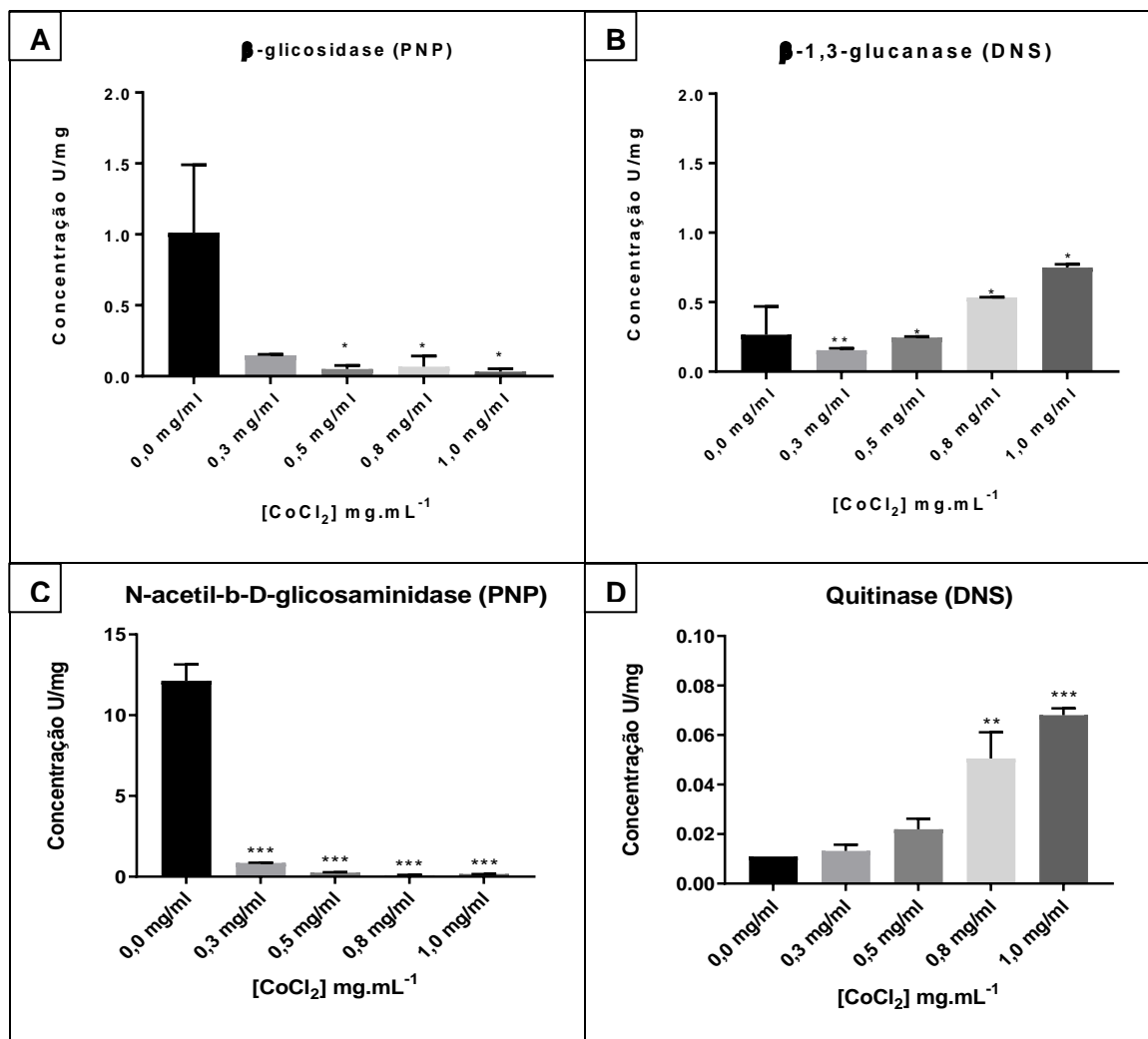
**Figura 8** – Desenvolvimento de *Trichoderma harzianum* (ALL-42) após 47 horas de crescimento mais 1 hora de tratamento com CoCl<sub>2</sub> em meio líquido (BD). A – Peso seco biomassa. B – Concentração de proteínas totais secretadas. As comparações foram realizadas com teste ANOVA com fator seguido de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

**Tabela 2** – Taxa de proteínas totais secretadas ( $\mu\text{g.mL}$ ) por peso micelial seco (mg) de *Trichoderma harzianum* após 47 horas de crescimento mais 1 hora de tratamento comparada as diferentes concentrações de CoCl<sub>2</sub>.

| [CoCl <sub>2</sub> ] mg.mL | 0,0   | 0,3    | 0,5    | 0,8    | 1,0    |
|----------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| Proteína/Peso              | 1,612 | 647,24 | 827,82 | 732,92 | 583,66 |

### 4.3 ENSAIO ENZIMÁTICO

O ensaio enzimático foi realizado com enzimas do *T. harzianum* observadas no micoparasitismo envolvidas na degradação da parede celular de fungos fitopatogênicos. A análise foi realizada a partir do filtrado em BD nas concentrações de 0,0; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 mg/ml<sup>-1</sup> de CoCl<sub>2</sub> em agitação por 160 rpm.



**Figura 9** – Ensaio enzimático *T. harzianum* (ALL-42) após 47 horas de crescimento mais 1 hora de tratamento com CoCl<sub>2</sub> em meio BD. **A** – Concentração de  $\beta$ -glicosidase por U/mg. **B** – Concentração de  $\beta$ -1,3-glucanase por U/mg. **C** – Concentração de N-acetil-b-D-glicosaminidase por U/mg e **D** – Concentração de quitinase por U/mg.

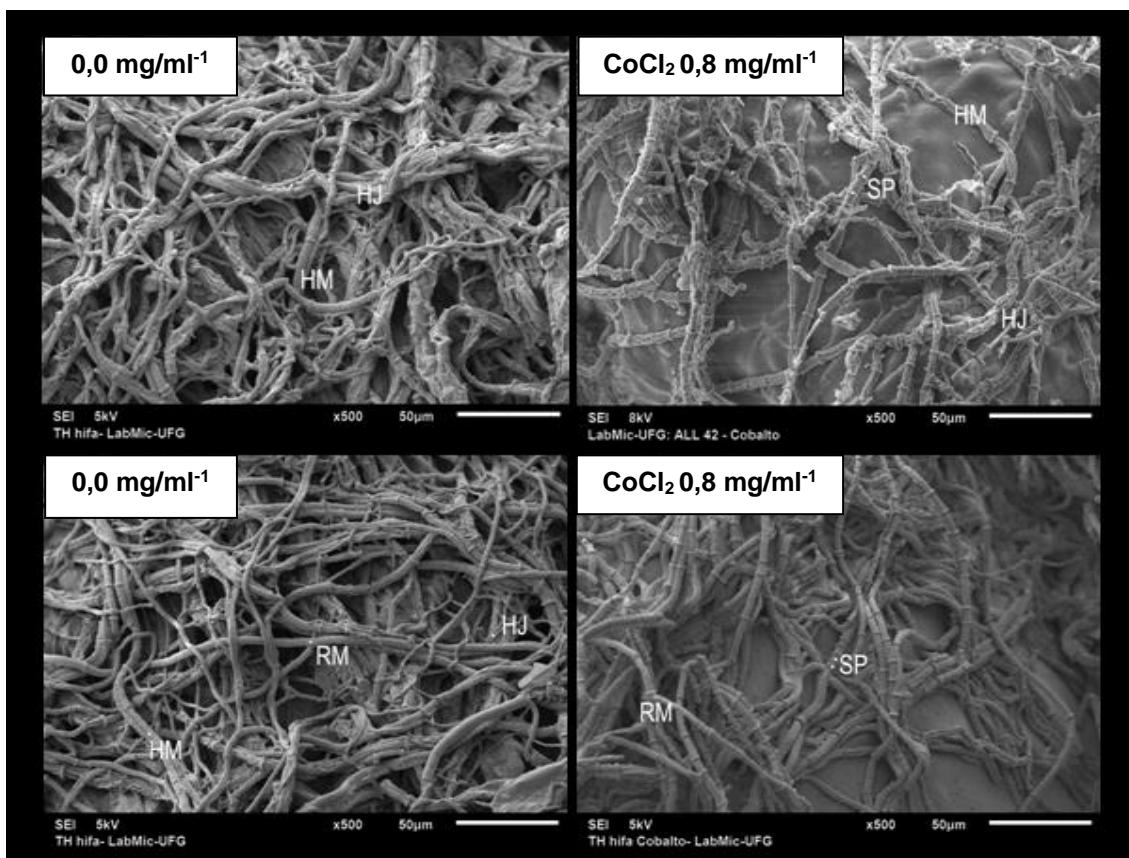
Os resultados das análises mostraram aumento na secreção da quitinase à medida que as concentrações de cobalto aumentavam em comparação ao controle. Enquanto a atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase houve aumento nas concentrações 0,8 e 1,0 mg/ml<sup>-1</sup> de CoCl<sub>2</sub>. Já a atividade enzimática da N-acetil-b-D-glicosaminidase e a  $\beta$ -glicosidase houve redução na presença do cobalto quando comparadas ao controle.

Enzimas líticas exercem papéis essenciais em fungos micoparasitas atuando na degradação da parede celular de fitopatógenos sendo utilizadas na desestabilização e na captação de nutrientes. Foram observadas atividade

aumentada de quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase em estudos de agentes de biocontrole na mitigação do estresse oxidativo (RAMADA et al., 2015; QUALHATO., 2013; XU et al., 2008; COHEN-KUPIEC et al., 1999). No entanto, não há relação clara dos efeitos provocados pelo estresse oxidativo do cobalto com o aumento da atividade de enzimas de degradação de parede celular de *T. harzianum*.

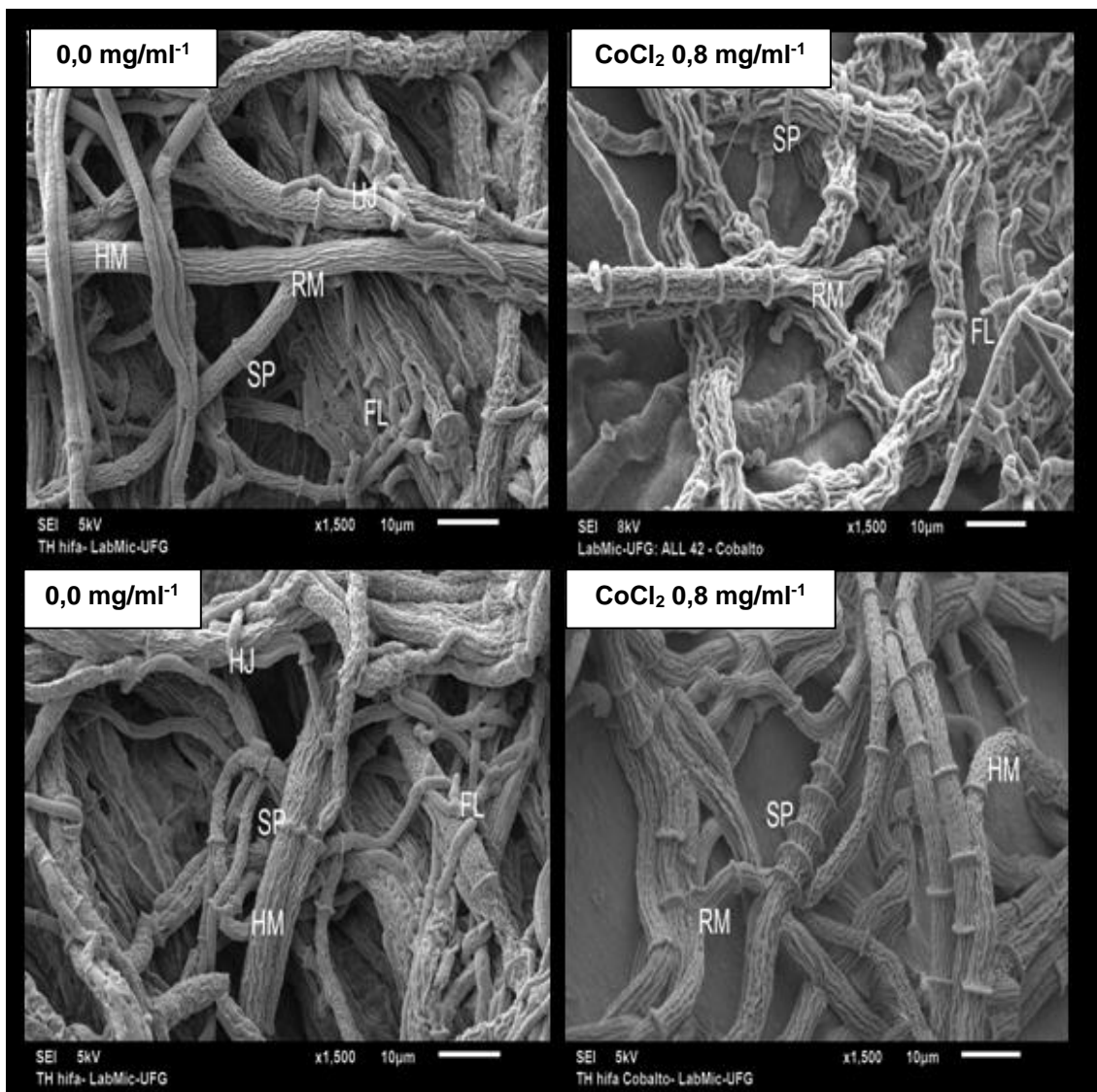
#### 4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para a realização das análises em microscopia eletrônica de varredura, *Trichoderma harzianum* foi submetido a crescimento em BDA por 3 a 4 dias, acrescido com solução de metais e coletado de pontos de amostra em zona de crescimento onde as hifas mais jovens se expandem através do meio. Em seguida, as amostras foram submetidas à etapa de fixação por 24 horas e desidratação com álcool. Toda a análise foi realizada em triplicata.

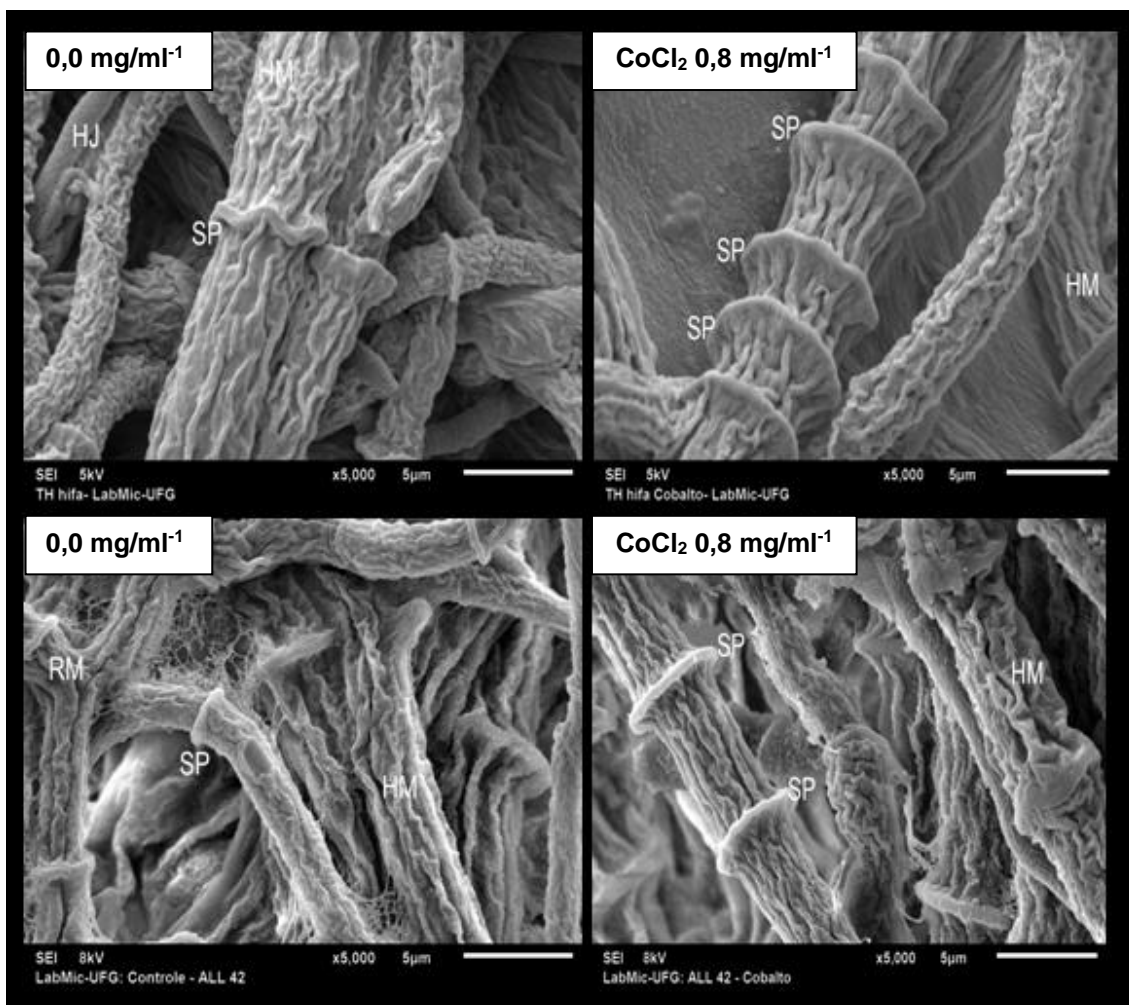




**Figura 10** - Micrografias com aumento em 500x, área de varredura 50  $\mu\text{m}$  e 5 Kv comparativa entre o grupo de *T. harzianum* controle (0,0 mg/ml) e o grupo submetido ao tratamento com  $\text{CoCl}_2$  (0,8 mg/ml<sup>-1</sup>). SP: septos; RM: ramificações; HJ: hifas jovens; HM: hifas maduras. Nota-se uma pequena redução do volume no micélio de *T. harzianum*  $\text{CoCl}_2$  (0,8 mg/ml<sup>-1</sup>) quando comparado com o controle (0,0 mg/ml<sup>-1</sup>).



**Figura 11** - Micrografia com aumento em 1.500x, área de varredura 10  $\mu\text{m}$  e 5 Kv comparativa entre o grupo de *T. harzianum* controle (0,0 mg/ml<sup>-1</sup>) e o grupo submetido ao tratamento com  $\text{CoCl}_2$  (0,8 mg/ml<sup>-1</sup>). SP: septos; RM: ramificações; HJ: hifas jovens; HM: hifas maduras e FL: fiálide. Nota-se a redução do volume de hifas no micélio de *T. harzianum*  $\text{CoCl}_2$  (0,8 mg/ml<sup>-1</sup>) quando comparado com o controle e redução dos espaços do intervalo entre os septos das hifas maduras o que pode indicar a redução das unidades celulares.



**Figura 12** - Micrografia com aumento em 5.000x, área de varredura 5  $\mu\text{m}$  e 5 Kv comparativa entre o grupo de *T. harzianum* controle ( $0,0 \text{ mg/ml}^{-1}$ ) e o grupo submetido ao tratamento com  $\text{CoCl}_2$  ( $0,8 \text{ mg/ml}^{-1}$ ). SP: septos; RM: ramificações; HJ: hifas jovens; HM: hifas maduras. Nota-se aspectos morfológicos da estrutura da parede celular do *T. harzianum*  $\text{CoCl}_2$  ( $0,8 \text{ mg/ml}^{-1}$ ) preservados quando comparado com o controle ( $0,0 \text{ mg/ml}^{-1}$ ) e redução no intervalo entre os septos das hifas maduras o que pode indicar a redução das unidades celulares.

Para a análise do *T. harzianum* em MEV as amostras em controle ( $0,0 \text{ mg/ml}^{-1}$ ) foram submetidas a crescimento em meio BDA e colhidas amostras em triplicata das amostras das zonas de crescimento entre o terceiro ou quarto dia. O fungo apresentou grande volume das hifas jovens e maduras amplamente distribuídas sobre o suporte do meio. Na MEV, o micélio ramificado mostrou ausência de conídios e conidióforos em determinados pontos da área de varredura excluindo pontos com presença de esporos em

fase de germinação. Estrutura morfológica demonstrou boa preservação da parede celular e conservação dos septos.

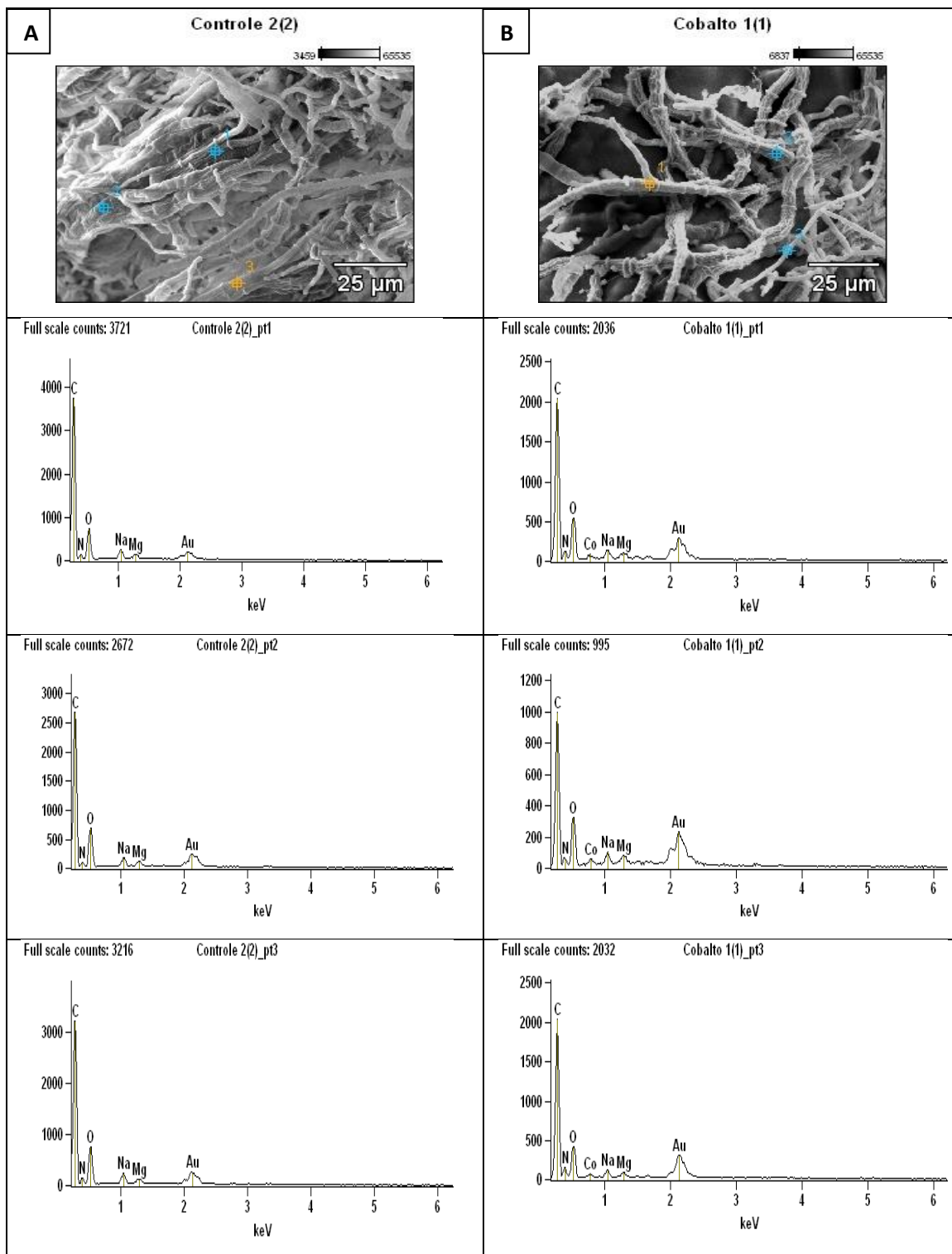
A concentração ( $0,8 \text{ mg/ml}^{-1}$ ) de cloreto de cobalto, conforme observado foi escolhida de modo que o *T. harzianum* durante o crescimento meio BDA apresentava maior ponto limite de tolerância ao metal. Nota-se a maior presença dos septos nas hifas o que indica provavelmente uma redução no tamanho das unidades celulares do fungo. Encurtamento das hifas o que sugere uma possível na redução do tamanho das unidades celulares. O que pode estar de acordo com o crescimento em meio BDA. A ramificação uma das características do fungo quando observada na MEV aponta redução do volume de hifas em algumas áreas de varredura quando comparada ao controle. Aspecto morfológico e estrutural da parede celular aparentemente apresenta padrão de integridade preservada de modo que não possível observar lesões, rupturas ou deformações que afetem a integridade de efeito ocasionado pelo estresse oxidativo causado pelo cobalto.

#### **4.5 ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA *T. harzianum* CONTROLE ( $0,0 \text{ mg/ml}^{-1}$ ) E $\text{CoCl}_2$ ( $0,8 \text{ mg/ml}^{-1}$ )**

Em seguida, para avaliação da presença de metais através de espectroscopia de energia dispersiva foram selecionados pontos no plano de varredura com foco direcionado nas hifas. A espectroscopia de energia dispersiva visa analisar a caracterização química dos componentes de uma amostra. O ponto de varredura da área selecionada para o controle ( $0,0 \text{ mg/ml}^{-1}$ ). Nos pontos 1, 2 e 3, foram identificados a abundância do elemento carbono seguida pela presença de nitrogênio, oxigênio, sódio e magnésio o que está relacionado como elementos orgânicos e ausência de cobalto. O elemento ouro identificado na amostra vale ressaltar sua presença devido recobrimento das amostras na etapa do ponto crítico.

As análises em EDS das concentrações de cloreto de cobalto  $0,8 \text{ mg/ml}^{-1}$  foram acompanhadas as MEV do *T. harzianum* marcadas no ponto de varredura identificaram elementos comuns no controle como carbono,

nitrogênio, oxigênio, sódio e magnésio. As hifas marcadas nos pontos da EDS identificaram cobalto incluído aos principais elementos orgânicos nos três pontos distintos da área de varredura. O elemento ouro identificado na amostra não deve ser levado em consideração nas análises devido a utilização na etapa de recobrimento das amostras no preparo do ponto crítico.



**Figura 13** – Gráficos da EDS comparando os marcadores (1, 2 e 3): A - amostras de *T. harzianum* em crescimento meio BDA controle (0,0 mg/mL) dos pontos de dispersão selecionadas nas hifas identificando os principais elementos em maior concentração (C, N, O, Na, Mg) na análise a ausência do cobalto. Figura – B amostras de *T. harzianum* CoCl<sub>2</sub> (0,8 mg/ml<sup>-1</sup>) dos pontos de dispersão selecionadas nas hifas identificando os principais elementos em maior concentração (C, N, O, Na, Mg) na análise entre eles a presença do cobalto. O Au identificado na espectroscopia foi utilizado na etapa de preparo para recobrimento das amostras em MEV e não apresenta nenhuma influência nos resultados do estudo.

Os resultados dos gráficos de EDS encontrados estão relacionados aos pontos de marcação nas hifas (com exceção do ouro que é utilizado no processo de preparo das amostras na etapa do ponto crítico). Os valores aumentados em destaque no percentual como magnésio e sódio foram encontrados em comum nas EDS nas amostras com cobalto no controle pode não refletir bastante relevância. O que se pode justificar é que a penetração do feixe de elétrons não pode alcançar essa profundidade no citoplasma e vacúolos (FARRAG et al., 2008).

#### **4.6 IDENTIFICAÇÃO DE GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO DE COBALTO EM *Trichoderma harzianum***

Com o intuito de verificar quais genes no genoma de *T. harzianum* estariam relacionados com o metabolismo de cobalto, uma busca no proteoma desse fungo foi feita.

Sabe-se que a família de transportadores NiCoT está relacionada ao transporte de cobalto e foi identificada em espécies de fungos como *Schizosaccharomyces pombe* e *Neurospora crassa*. Como proteína de transmembrana integral age usando o gradiente de prótons para conduzir a absorção do íon cobalto (OKAMOTO., 2011; ZHANG., 2009).

Outro domínio relacionado ao cobalto é o CobW, que tem participação ativa na síntese da cobalamina. Como metalquelatase demonstra atividade na redução do cobalto em anéis corrinoídes. A biosíntese de cobalamina foi evidenciada em procariotos, de modo que fungos não conseguem sintetizar

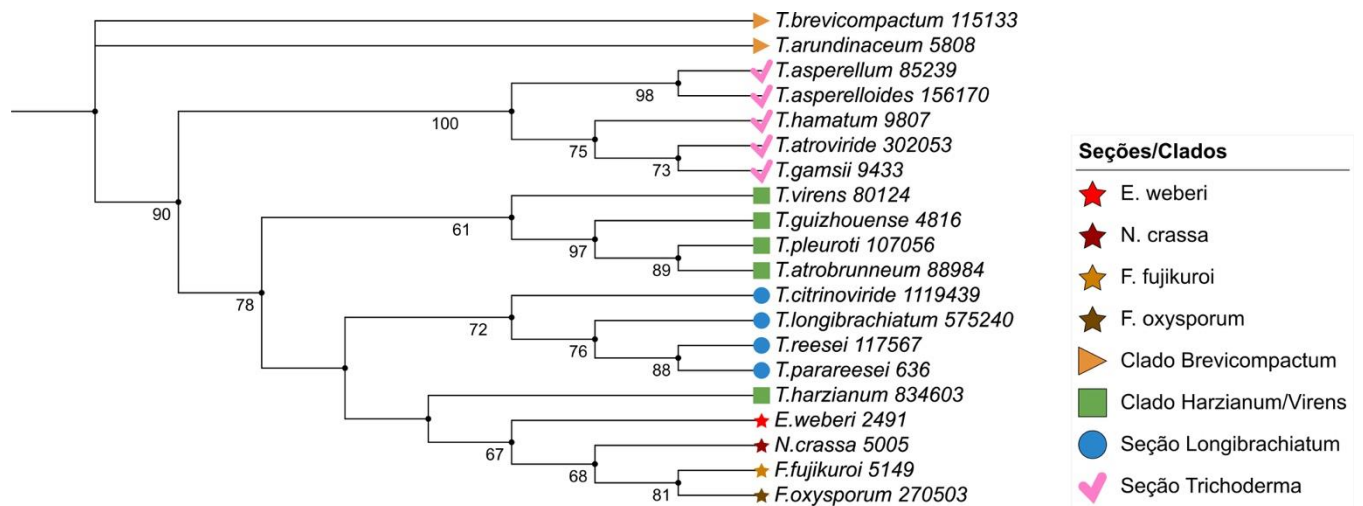
cobalamina. Desse modo, não está esclarecida a atividade do domínio CobW em fungos (CROUZET., 1991; MARTENS., 2002).

A princípio, foi observado que os genes de IDs 764301, 783875, 834603 e 844570, apresentaram um domínio CobW segundo a anotação do genoma disponível no JGI (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Trihar1/Trihar1.home.html>). Posteriormente foi realizada a busca por domínios protéicos nessas proteínas, utilizando o banco de dados Pfam e observamos que a proteína codificada pelo gene 834603 não continha domínio CobW, mas sim um domínio NicO, relacionado ao transporte de níquel e cobalto (DUPREY et al., 2014).

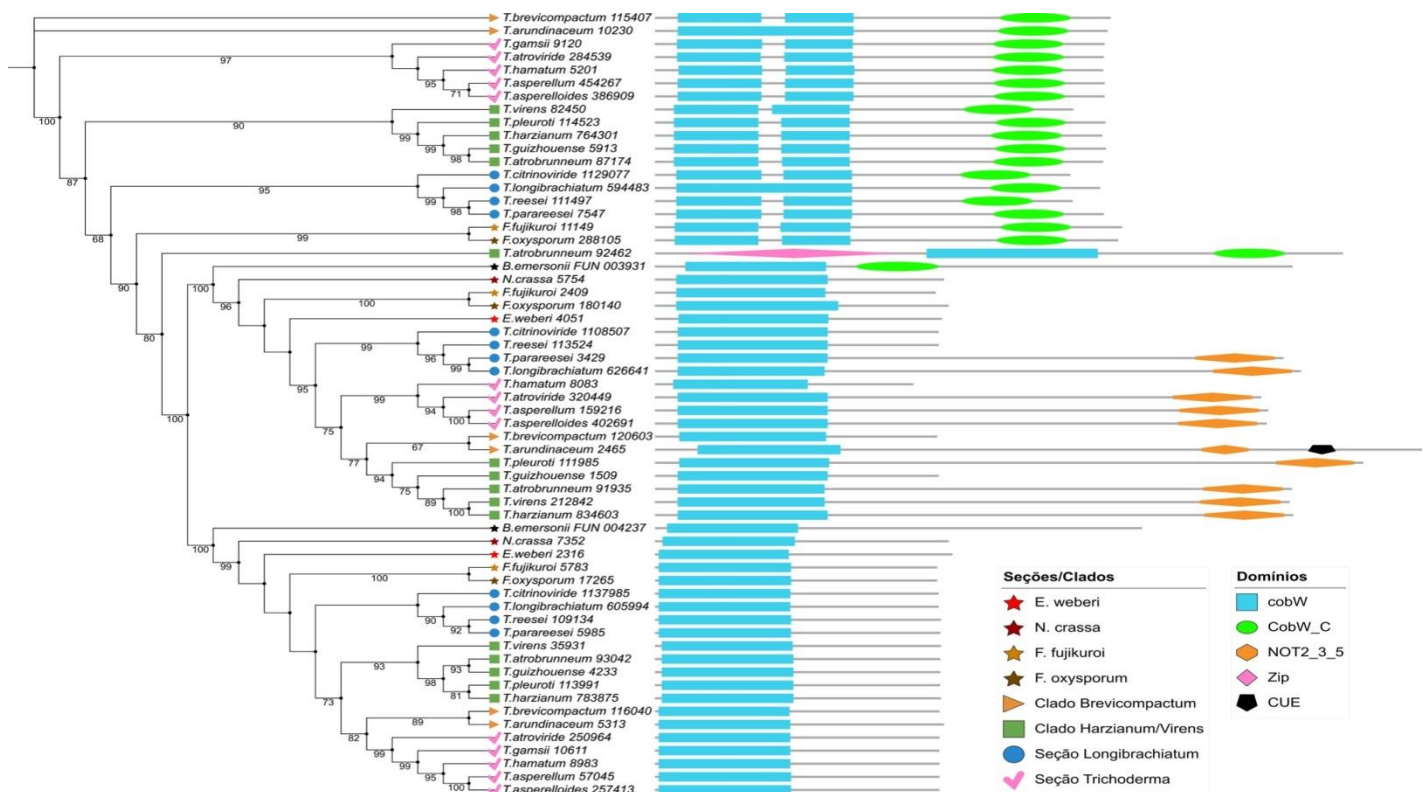
Para identificar genes com domínio CobW e NicO em outras espécies de *Trichoderma*, um novo Blastp, utilizando as sequências 764301, 783875, 834603 e 844570 de *T. harzianum*, foi realizado contra os bancos de dados das seguintes espécies: *T. arundinaceum* IBT 40837, *T. asperelloides* TR356 v1.0, *T. asperellum* CBS 433.97 v1.0, *T. atrobrunneum* ITEM 908, *T. atroviride* v2.0, *T. brevicompactum* IBT 40841, *T. citrinoviride* TUCIM 6016, *T. gamsii* T6085, *T. guizhouense* NJAU 4742, *T. hamatum* GD12, *T. longibrachiatum* MK1 v1.0, *T. parareesei* CBS 125925, *T. pleuroti* TPhu1, *T. reesei* QM6a, *T. virens* GV29\_8 v2.0. Além destes, foram usadas espécies de outros gêneros para enraizar a árvore: *Neurospora crassa* OR74A v2.0, *Fusarium fujikuroi* IMI 58289, *Fusarium oxysporum* Fo47 v2.0 e *Escovopsis weberi* CC031208-10.

Foi feita a análise do Pfam também para essas sequências, utilizando os mesmos parâmetros, para identificar os domínios CobW e NicO. Todas as sequências obtiveram hit no Pfam. Todas as espécies analisadas apresentaram apenas uma sequência da família NicO (transportador de níquel que também transporta cobalto), com exceção de *B. emersonii*, e uma família de fatores de transcrição apareceu nessas análises (NOT family). Essa observação pode ter sido decorrente do fato de que a sequência de aminoácidos *T. harzianum\_834603* apresenta, além do domínio CobW, um domínio NOT. Essas sequências foram desconsideradas nas análises. Além disso, a sequência *T. atrobrunneum* 92462 apresentou, além do domínio CobW, o domínio Zip e *T. arundinaceum* 2465 apresentou além de CobW, um domínio CUE.

Essas seqüências de proteínas foram analisadas através de árvore filogenética com o intuito de observar o processo evolutivo do metabolismo de cobalto em *Trichoderma*.



**Figura 14** – Árvore filogenética de proteínas de *Trichoderma* que apresentaram domínio NicO.



**Figura 15** – Árvore filogenética de proteínas de *Trichoderma* que apresentaram domínio CobW.

De acordo com as análises feitas das sequências CobW obtidas contra o banco de dados Pfam, foram observados três tipos diferentes dessas sequências, com relação aos domínios protéicos presentes: a) tipo I – sequências menores (340 – 391 aa), apresentando apenas o domínio CobW (PF02492); b) tipo II – sequências intermediárias (546 – 904 aa), apresentando, em geral, dois domínios CobW (PF02492) e um domínio CobW\_C (PF07683); c) e tipo III – sequências maiores (797 – 1008 aa), apresentando, em geral, um domínio CobW (PF02492) e um domínio NOT2\_3\_5 (PF04153), cuja função é regular negativamente a expressão gênica (Figura 14) (COLLART e STRUHL, 1994).

Em geral, as espécies analisadas apresentaram pelo menos 3 proteínas preditas com domínio CobW, com exceção de *E. weberi*, *N. crassa*, *B. emersonii* e *T. gamsii*, com as duas primeiras apresentando duas sequências tipo I e as duas últimas apresentando uma sequência tipo I e uma tipo II. Além destas, *T. atrobrunneum* apresentou 4 proteínas CobW preditas, sendo a proteína excedente uma duplicação modificada da sequência de tipo II. *E. weberi*, *N. crassa*, *F. fujikuroi*, *F. oxysporum*, *T. citrinoviride*, *T. reesei*, *T. hamatum*, *T. brevicompactum* e *T. guizhouense* não apresentaram sequências do tipo II, em vez disso, foi observado uma duplicação das sequências tipo I nestas espécies (Figura 14).

A análise filogenética das sequências CobW evidenciou dois clados monofiléticos, compreendidos por sequências tipo I e II, apresentando o mesmo ancestral comum. Em um dos clados, é possível observar que estas sequências estão mescladas, mostrando mais uma vez sua proximidade evolutiva (Figura 14).

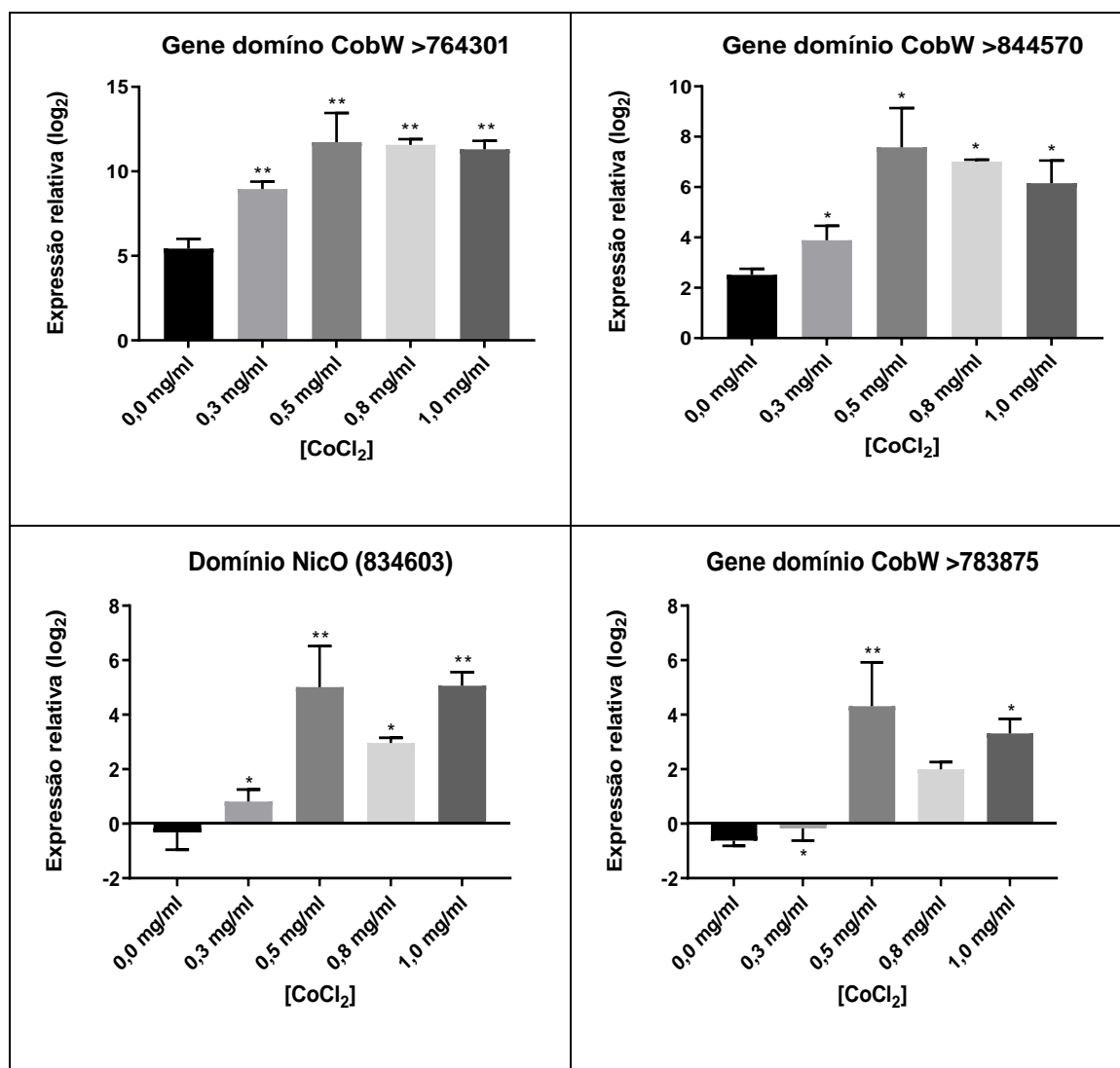
Já com relação ao transportador NicO (PF03824), todas as espécies apresentaram apenas uma cópia desta proteína. Foi possível observar que as sequências se agruparam de acordo com os clados/seções filogenéticos de *Trichoderma*, com exceção do transportador putativo de *T. harzianum*, que se agrupou com as espécies de referência, no entanto, o ramo foi pouco suportado pelo valor de bootstrap (< 60). Além disso, as espécies de referência



formaram um clado no interior da árvore, indicando que são mais recentes evolutivamente nestas espécies (Figura 13).

#### 4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES COM DOMÍNIO CobW e NicO DE *T. harzianum*

As análises de qRT-PCR para avaliação da expressão gênica dos genes com domínio CobW (764301, 844570, 783875) e NicO (834603) foram realizados utilizando RNAs extraídos de micélio de *T. harzianum* após tratamento com cobalto.



**Figura 15** - Expressão relativa genes domínio CobW e NicO de *Trichoderma harzianum* em crescimento nas concentrações 0,0; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 mg/ml<sup>-1</sup> de CoCl<sub>2</sub>.

Os seguintes genes 834603 (NicO) e 783875 (CobW) mostraram-se reprimidos em concentração de controle e sendo induzidos pela presença do metal cobalto. A expressão de genes de domínio CobW e NicO observados quando o *T. harzianum* foi submetido ao cobalto pode corroborar com a ação de possíveis metalchaperonas como observados nos estudos (HASHIMOTO et al., 2020) e (CROUZET et al., 1991). O que atribui à atividade atuando como uma provável ação protetora de cobaltoquelatases sob os efeitos de estresse oxidativo provocados pelo cobalto.

Já os genes de domínio CobW 764301 e 844570 apresentaram alta expressão, mesmo na ausência do metal. No entanto, após o tratamento com cobalto ambos os genes foram induzidos, indicando que a presença do metal é um fator indutor da sua expressão. Pode se referir a possível atividade dos genes de domínio CobW ligados as funções ativas no metabolismo do fungo concedidos a outros metais como o ferro conforme observado no estudo de (KOTABOVA et al., 2021). A superexpressão dos genes de domínio CobW pode esta relacionada à concentração do cobalto que por conseguinte promove ação protetora ao estresse oxidativo.

Efeitos de desintoxicação do cobalto foram observados em *Schizosaccharomyces pombe*, onde foi demonstrado que o transportador vacuolar Zhf1 tem papel importante na detoxificação agindo na captação do cobalto (RYUKO et al., 2012). Não foi identificado o gene do transportador vacuolar Znf1 no genoma do *Trichoderma*, porém os genes 764301 e 783875 identificados no genoma do *Trichoderma harzianum* o domínio CobW estão relacionados a atividade de permeases de captação de zinco. Isso sugere que provavelmente o *T. harzianum* promova detoxificação através de transportadores de zinco direcionando o cobalto para os vacúolos de modo semelhante.

O cobalto é um importante elemento traço para manutenção das funções biológicas e do metabolismo nos fungos. Como componente biológico o cobalto é essencial agindo como cofator enzimático e o seu controle homeostático são uma condição importante nos organismos. A superexposição ao cobalto pode causar efeitos tóxicos gerando espécies reativas de oxigênio e causar

competição com outros metais essenciais como ferro, cálcio e zinco (PIMENTEL., 2014). Resistência ao metal cobalto por outros fungos investigada pode ser demonstrada em outros estudos (PAL et al., 2005).

A cobalamina é um cofator presente em vias metabólicas de importância na maioria dos organismos tendo em vista que é um componente biosintetizado com exclusividade em procariotos, exceto em Dikarya (ORLOWSKA et al., 2020; MAGGIO-HALL et al., 2004). A via de síntese da cobalamina demonstrada em *Pseudomonas denitrificans* envolve várias enzimas desde a inserção do íon cobalto através da CobQ (ácido cobíricosintase) na molécula de ácido cobírico até cob(I)alamina adenosiltransferase (CROUZET et al., 1991).

O domínio CobW pode estar envolvido na atividade de proteínas redução do cobalto e assim conduzindo aos corrinoídes o cobalto (I). De todo modo, a etapa em que o cobalto é introduzido na via da cobalamina ainda não está esclarecida. Poderia estar envolvida na apresentação do íon cobalto a cobaltoquelatases, proteção de cofatores, ou mesmo ligada na inserção de um metal em uma enzima dependente de metal da via. O que faz com que suas funções bioquímicas não sejam completamente compreendidas (CROUZET et al., 1991).

A indicação que a CobW possui um sítio de ligação NAD(H) faz que seu envolvimento a uma etapa NAD(H) dependente da oxidação na via, que é presumível de uma etapa de redução levando a corrinoídes de cobalto (I), como também de substratos para adenosilação. O que indica que a CobW pode estar atribuída a uma reação diferente da proposta (CROUZET et al., 1991). Na maioria dos estudos observados, CobW é localizada próxima a componente quelatase de cobalto como exemplo a CobN. O que provavelmente envolve na via da biossíntese de cobalamina como uma possível chaperona de metal do cobalto (HASHIMOTO et al., 2020).

KOTABOVA et al., (2021) define uma nova atividade de domínio CobW contendo COG0523 putativa como metal chaperona na qual está envolvida no metabolismo do ferro de forma restrita a poucas linhagens de filoplânctons além do *Bigelowiella natans*. A inclusão recente de novo estudo que inclui um

gênero diferente de organismo propõe o que pode conduzir a definição da atividade da CobW ligada ao *Trichoderma harzianum* em exposição ao metal cobalto.

Os fungos possuem a capacidade de atuar na diminuição da toxicidade de metais, incluindo a formação da ligação metal-proteína, precipitações orgânicas e inorgânicas, transporte ativo, compartimentalização intracelular. Além disso, os constituintes da parede celular do fungo, como a quitina, possuem capacidade de adsorver metais (VALE et al., 2011). Essas propriedades são conhecidas e podem ser atribuídas ao gênero *Trichoderma*.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados do crescimento em meio BDA apresentados pelo *Trichoderma harzianum* demonstram que a capacidade de tolerar o cobalto pouco influenciou em suas hifas com mudanças leves na coloração do micélio. Entretanto, foi capaz de se desenvolver sobre o meio contendo o metal. As proteínas secretadas e seu peso micelial colaboram com o fato de que o *Trichoderma harzianum* é capaz de aumentar sua produção de proteínas o que provavelmente neutralizariam a atividade do metal no fungo.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura para acompanhar o efeito oxidativo do metal sobre o estresse no fungo mostrou aparência preservada seguida de alterações visíveis na redução do tamanho das hifas, conidióforos, fiálides e redução do micélio. A tolerância ao metal influenciou um possível efeito no metabolismo do *Trichoderma harzianum* o que pode ser notado em crescimento.

As análises em espectroscopia de energia dispersiva identificaram que o metal estava presente nas hifas do fungo seguindo do aumento de magnésio e sódio. Contudo, ainda não é possível esclarecer a influência do estresse oxidativo com a presença desses elementos nas análises.

A expressão dos genes de domínio CobW analisados nesse estudo apresentaram-se elevados em situações diferentes. Podendo indicar que estariam atuando na resposta aos efeitos do estresse oxidativo causado pelo cobalto.

O mecanismo de como o *Trichoderma harzianum* atua sobre o estresse oxidativo pelo metal cobalto ainda não foi totalmente esclarecido. Até o momento não foram encontrados estudos que relacionem os genes do domínio CobW ao *Trichoderma harzianum* discriminando ao estresse oxidativo por cobalto.

Apesar dos resultados, são necessários mais estudos para a compreensão que justifique a tolerância do fungo ao metal. Contudo, parte desse estudo pode observar que mesmo o cobalto sendo um metal de

importância para o fungo, em concentrações elevadas pode apresentar efeitos danosos.

Desse modo, os possíveis efeitos do estresse oxidativo podem causar prejuízo nas características gerais do fungo, como agente competidor podendo afetar seu micoparasitismo a indução a resistência de plantas, sua antibiose e promoção da indução de resistência em plantas. Por outro lado, o fungo mostrou boa tolerância a metais.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES A.N.L., ROSA H.V.D.: Exposição ocupacional ao cobalto: aspectos toxicológicos. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**. São Paulo SP. abr. 2003 39(2) 130-138.

ANAHID S., YAGHMAEI S., GHOBADINEJAD Z., Heavy metal tolerance of fungi. **Scientia Iranica**. Tehran, Iran. 18(3) 502-508, 2011.

BACCAN N.: Metais pesados: significado e uso da terminologia. In: Anais do IX encontro nacional sobre contaminantes inorgânicos, **IPEN**, São Paulo, 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMbio)**. Vamos conhecer o cerrado. Brasília DF 2011.

BELLION M., COURBOT M., JACOB C., BLAUDEZ D., CHALOT M.; Extracellular and mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. **FEMS Microbiol Lett**. Vandoeuvre-les-Nancy, France. v254 p173-181. 2006.

BLAUDEZ D., BUTTON B., CHALOT M.; Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungi *Paxillus involutus*. **Microbiology** 146: 1109–1117. (2000).

CAMARGO A.O., FURLANI P.R.: Alumínio no solo: concentração, especiação e efeito no desenvolvimento radicular. In: simpósio avançado de solos e nutrição de plantas, 2., Piracicaba, 1989. **Anais**. Campinas, Fundação Cargill, p. 45-69, 1989.

CAMPOS, M. L. et al: 'Teores de arsênio e cádmio em solos do bioma cerrado', **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 37. (2013).

CANOVAS D., VOOIJS R., SCHAT H., DE LORENZO V.; The role of thiol species in the hypertolerance of *Aspergillus* sp. P37 to arsenic. **J Biol Chem** 279: 51234–51240 (2004).

CARDOSO E.M.: Aplicações da energia nuclear. Disponível em <[http://portalnuclear.cnen.gov.br/conteudo/Grupo.asp?Cod\\_Gru-po=1](http://portalnuclear.cnen.gov.br/conteudo/Grupo.asp?Cod_Gru-po=1)>. Acesso em 29 dez. 2018.

COHEN-KUPIEC, R. et al. Molecular characterization of a novel beta-1,3-exoglucanase related to mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. **Gene**, v.226, n.2, p.147-154, 1999.

COLLART A., M; STRUHL, K. NOT1(CDC39), NOT2(CDC36), NOT3, and NOT4 encode a global-negative regulator of transcription that differentially affects TATA-element utilization. **Genes & Development**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 525-537, 1 mar. 1994. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.8.5.525>.

CONSTANTINO V.R.L., ARAKI K., SILVA D.O., OLIVEIRA W.: Preparação de compostos de alumínio a partir da bauxita: considerações sobre alguns aspectos envolvidos em um experimento didático. **Química Nova**. São Paulo. 2002. 25 (3) 3 490-498.

CROUZET J., LEVY-SCHIL S., CAMERON B., CAUCHOIS L., RIGAUULT S., ROUYEZ M.C., BLANCHE F., DEBUSSCHE L., THIBAUT D., Nucleotide sequence and genetic analysis of a 13.1-kilobase-pair *Pseudomonas denitrificans* DNA fragment containing five *cob* genes and identification of structural genes encoding *cob(I)*alaminadenosyltransferase, *cobyric acid synthase*, and bifunctional *cobinamide kinase-cobinamide phosphate guanylyltransferase*. **Journal of bacteriology**. Washington DC, USA. 1991. Vol.173.No 19 p.6074-6087.



Disponível em: <<https://escola.britannica.com.br/artigo/cobalto/481004> acesso em: 21 jan. 2021.

Disponível em: <[https://www.wwf.org.br/natureza\\_brasileira/questoes\\_ambientais/biomas/bioma\\_cerrado/mapa\\_bioma\\_cerrado/](https://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/questoes_ambientais/biomas/bioma_cerrado/mapa_bioma_cerrado/) > acesso em: 21 jan. 2021.

DRUZHININA I.S., KOPCHINSKIY A.G., KUBICEK C.P.: The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. **Mycoscience**, Tokyo, 2006 47:55-64.

DUPREY A., CHANSAVANG V., FRÉMION F., GONTHIER C., LOUIS Y., LEJEUNE P., SPRINGER F., DESJARDIN V., RODRIGUE A., DOREL C.: “NiCo Buster”: engineering *E. coli* for fast and efficient capture of cobalt and nickel. **Journal of Biological Engineering**, Lyon, 2014, 8:14.

FARRAG R.M., MOHAMEDEIN M.M., MEKAWY A.A. Scanning Electron Microscopy and Energy-Dispersive X-ray Microanalysis of *Penicillium brevicompactum* treated with cobalt. **Polish Journal of Microbiology**. Cairo, Egypt. vol 57(4) 321-326.

FILHO J.R.B., **Análise da expressão de genes de *Trichoderma harzianum* relacionados a transporte intracelular durante estresse por metais**. Tese (trabalho de conclusão de curso) Universidade Federal de Goiás – GO. 40p 2018.

FOGARTY R.V. & TOBIN J.M.; Fungal melanins and their interactions with metals. **Enzyme Microb Technol** 19: 311–317 (1996).

FONSECA D.S. COBALTO. IN: LIMA, T.M. e NEVES, C.A.R. (Coords.). Sumário mineral 2014. Brasília: DNPM, 2014, p. 54-55. Disponível em: Acesso em: 29 dez. 2019.

FORSTNER U., WITTMANN G.T.W.: Metal pollution in the aquatic environment. Berlin: **Springer-Verlag**, (2), 486p, 1981.

FRACETO, L. F., et al.: 'Trichoderma harzianum -based novel formulations: potential applications for management of Next-Gen agricultural challenges', **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. John Wiley & Sons, Ltd, 93(8), pp. 2056–2063. doi: (2018) 10.1002/jctb.5613.

FREY B., ZIEROLD K., BRUNNER I.; Extracellular complexation of Cd in the Hartig net and cytosolic Zn sequestration in the fungal mantle of *Picea abies*–*Hebeloma crustuliniforme* ectomycorrhizas. **Plant Cell Environ** 23: 1257–1265 (2000).

GADD G.M.; Interactions of fungi with toxic metals. **New Phytol** 124: 25-60 (1993).

GHAZANFAR M.U., RAZA M., RAZA W., QAMAR M.I.: Trichoderma as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture: a revision. **Plant protection**. Poznań, Poland, 2018, 02 (03) 109-135 ISSN: 2617-1287.

GONZÁLEZ F.H., SILVA S.C.: Introdução à Bioquímica Veterinária. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003, 198p.

GREENWOOD, NN., EARNSHAW A. Chemistry of the elements. Oxford: **Butterworth**; Heinemann, 1997.

GUMÁ-CINTRÓN Y., BANDYOPADHYAY A., ROSADO W., SHU-HU W., NADATHUR S.G. Transcriptomic analysis of cobalt stress in the marine yeast *Debaryomyces hansenii*. **FEMS Yeast Research**. Mayaguez, Puerto Rico. 2015. Vol15(8) doi: 10.1093/femsyr/fov099.

HANSON J.R.; **The chemistry of the bio-control agent, Trichoderma harzianum**. Science Progress. Brighton UK. 2005. 88(4), 237-248.

HARTIKAINEN S., HATAKKA A., KAHKONEN M.A.: Impact of Cadmium, Chromium, Cobalt, Lithium and Manganese to the Growth of Fungi and Production of Enzymes. **Expert Opin on Environment Biology**. Helsinki, Finland. 2013, 2:3.

HAAS C.E., RODIONOV D.A., KROPAT J., MALASARN D., MERCHANT S.S., CRÉCY-LAGARD V., A subset of the diverse COG0523 family of putative metal chaperones is linked to zinc homeostasis in all kingdoms of life. **BMC genomics**, Los Angeles USA 2009 10:470.

HARMAN, G. E., LORITO, M. AND LYNCH, J. M.: 'Uses of Trichoderma spp. To Alleviate or Remediate Soil and Water Pollution', in **Advances in applied microbiology**, pp. 313–330. (2004) doi: 10.1016/S0065-2164(04)56010-0.

HASHIMOTO Y., UBE Y., DOI S., KUMANO T., KOBAYASHI M.: Metal chaperone, NhpC, involved in the metallocenter biosynthesis of nitrile hydratase, **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, Japan. HEBERT V.: Vitamin B-12: plant sources, requirements and assay. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 48, p. 852-858, 1988.

HENRIQUES A.B., PORTO M.F.S.: A insustentável leveza do alumínio: impactos socioambientais da inserção do Brasil no mercado mundial de alumínio primário. **Ciências & Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro. 2013 18 (11) 3223-3234.

HERMOSA, M.R., KECK E., CHAMORRO I., RUBIO B., SANZ L., VIZCAÍNO J.A., GRONDONA I., MONTE E.: Genetic diversity shown in Trichoderma biocontrol isolates. **Mycological Research**. 2004; 108, 897–906.

HOLMGREN A.; Thioredoxin and glutaredoxin systems. **J Biol Chem** 264: 13963–13966 (1989).

HOWELL C.R., HANSON L.E., STIPANOVIC R.D., PUCKHABER L.S.: Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. **Phytopathology**, 2000; 90: 248-252.

JACOB C., COURBOT M., MARTIN F., BRUN A., CHALOT M.; Transcriptomic responses to cadmium in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. **FEBS Lett** 576: 423–427 (2004).

KHAN R.A.A., NAJEEB S., HUSSAIN S., XIE B., LI Y., Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic fungi. **Microorganisms**. Peshawar-Pakistan. 817(8) 2020.

KLINK C.A., MACHADO R.B.: A conservação do cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, Jul 2005; (1) 147-155.

KNEER R, KUTCHAN TM, HOCHBERGER A & ZENK MH.; *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin. **Arch Microbiol** 157: 305–310 (1992).

KOCHIAN L.V., PIÑEROS M.A., HOEKENGA O.A.: The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil** 274: 175-195, 2005.

KOCHIAN L.V., PIÑEROS M.A., HOEKENGA O.A.; The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil** 274: 175-195, 2005.

KOTABOVA E., MALYCH R., KARLUSICH J.J.P., KAZAMIA E. EICHNER M., MACH J., LESUISSE E., BOWLER C., PRASIL O., SUTAK R. Complex response of the chlorarachniophyte *Bigeloviella natans* to Iron availability. **mSystems**. Trebon, Czech Republic. 2021. Vol6(1) DOI: <https://doi.org/10.1128/mSystems.00738-20>.

KREDICS, L., et al.: ' Biodiversity of the Genus *Hypocrea*/*Trichoderma* in Different Habitats', **Biotechnology and Biology of Trichoderma**. Elsevier, pp. 3–24. (2014) doi:10.1016/B978-0-444-59576-8.00001-1.

KUMAR V., DWIVEDI S.K.; Hexavalent chromium stress response, reduction capability and bioremediation potential of *Trichoderma* sp. isolated from electroplating wastewater. **Ecotoxicol Environ Saf.** 2019 Dec 15;185:109734. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109734. Epub 2019 Sep 28. PMID: 31574371.

LANFRANCO L., BALSAMO R., MARTINO E., PEROTTO S., BONFANTE P.; Zinc ions alter morphology and chitin deposition in an ericoid fungus. **Eur J Histochem** 46: 341–350 (2002).

LI Z.S., LU Y.P., ZHEN R.G., SZCZYPKA M., THIELE D.J., REA P.A. ; A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato) cadmium. **Proc Natl Acad Sci USA** 94: 42–47 (1997).

LIAQUAT F., MUNIS M.F.H., HAROON U., ARIF S., SAQUIB S., ZAMAN W., KHAN A.R., SHI J., CHE S., LIU Q. Evaluation of metal tolerance of fungal stains isolated from contaminated mining soil of Nanjing, China. **Biology**. Shanghai, China. 2020. Vol 9(12): 469.

LIECKFELDT E., SAMUELS G.J., NIRENBERG H.I.: A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: Is it one or two species? **Applied and Environmental Microbiology** 1999; 65:2418-2428.

LINDSAY W.L.: Chemical equilibria in soils., **John Wiley and Sons**. New York (1979); 449p.

LOPES E.C.V., **Análise do papel de proteínas de choque térmico da família Hsp70 de *Trichoderma harzianum* durante o micoparasitismo**. Tese

(mestrado em ciências aplicadas a produtos para a saúde) – Universidade Estadual de Goiás – GO. 56p. 2018.

LOPES F.A., STEINDORFF A.S., GERALDINE A.M., BRANDÃO R.S., MONTEIRO V. N, LOBO M.J.R.: Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biol** 2012;116(7): 815-824.

MAAS G.C.B., WEBER O.L.S., SCARAMUZZA L.M.P., MAAS K.D.B., MOGNON F.: Metais pesados em um latossolo vermelho em função de dose de lodo de esgoto. **Engenharia ambiental**. Espirito Santo do Pinhal, jan/jun 2014; (11) 97-106.

MACHADO D.F.M., PARZIANELLO F.R., SILVA A.C.F., ANTONIOLLI Z.I., Trichoderma no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de ciências agrárias**. Lisboa-Portugal 2012. v(25) n(1). p.274-288.

MAGGIO-HALL L.A., CLAAS K.R., ESCALANTE-SEMERENA J.C. The last step in coenzyme B12 synthesis is localized to the cell membrane in bacteria and archaea. **Microbiology**. Madison, USA. 2004. V150 1385-1395p.

MARCONDES J.A.P., CAIRES E.F.: **Aplicação de molibdênio e cobalto na semente para cultivo de soja**. Bragantia, Brasil. 2005. v.64 n.4 687-694p.

MARTENS J.H., BARG H., WARREN M.J., JAHN D.: **Microbial production of vitamin B12**. Appl. Microbiol. Biotechnol. Braunschweig, Germany, 2002. 58:275-285p

MARTINO E., COISSON J.D., LACOURT I., FAVARON F., BONFANTE P., PEROTTO S.; Influence of heavy metals on production and activity of

pectinolytic enzymes in ericoid mycorrhizal fungi. **Mycol Res** 104: 825–833 (2000).

MAYO S, GUTIÉRREZ S, MALMIERCA MG, LORENZANA A, CAMPELO MP, HERMOSA R, CASQUERO PA. Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* spp. in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes. **Front Plant Sci.** 2015 Sep 16;6:685. doi: 10.3389/fpls.2015.00685. PMID: 26442006; PMCID: PMC4584982.

MEDEIROS M.A. Elemento químico cobalto. **Química nova na escola.** São Paulo SP. Ago 2013. Vol 35(3) 220-221.

MEIRELLES G.B., **Resistência induzida por *Trichoderma harzianum* em resposta a *Alternaria alternata* em tomateiro.** Tese (mestrado em fitotecnia – Ênfase em melhoramento e biotecnologia vegetal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – RS. 80p 2014.

MELO B.S., **Análise morfológica e molecular da formação de escleródio no fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.** Tese (mestrado em ciências biológicas) – Universidade Federal de Goiás – GO. 61p 2019.

MEYER R.J., PLASKOWITZ J.S.: Scanning electron microscopy of conidia and conidial matrix of *Trichoderma*. **Mycologia**1989; 81(2): 312-317.

MORAGA F.G., **Adubação foliar com cobalto e molibdênio na cultura da soja.** TCC (Curso agronomia ICAA/CUS/UFMT) – Universidade Federal do Mato Grosso – MT. 43p 2018p.

MOTA T.M., **Análise do perfil de expressão de genes da família Hsp70 de *Trichoderma Asperellum* (TR356) durante o micoparasitismo e estresse abióticos.** Tese (mestrado em ciências biológicas) – Universidade Federal de Goiás – GO. 86p 2018.

MUKHERJEE P.K., HORWITZ B.A, KENERLEY C.M. Secondary metabolism in Trichoderma--a genomic perspective. **Microbiology (Reading)**. 2012 Jan;158(Pt 1):35-45. doi: 10.1099/mic.0.053629-0. Epub 2011 Oct 13. PMID: 21998165.

MUKHERJEE, P. K., et al.: 'Trichoderma Research in the Genome Era', **Annual Review of Phytopathology**. Annual Reviews, 51, pp. 105–129. (2013) doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102353.

MYROLD D.D., NASON G.E. (1992) :Effect of acid rain on soil microbial processes. In Environmental Microbiology, pp. 59–82. Edited by R. Mitchell. New York: Wiley Godoy, C.V.; Koga, L.J.; Canteri, M.G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.63-68, 2006.

NAOUM S., **Análise das proteínas glicosiladas secretadas pelo isolado Trichoderma harzianum (ALL-42) induzidas por parede celular de fitopatógenos**. Tese (mestrado em ciências aplicadas a produtos para a saúde) Universidade Estadual de Goiás – GO. 67p 2016.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.) Subcommittee on the Tenth Edition of the RDAs. **Recommended dietary allowances**. 10.ed. Washington: National Academy Press, 1989. p.267-268.

NETO E.G.H.: Tecnologias para produção de forragem em solos de cerrado do Brasil central. **(trabalho de conclusão de curso)** 63f. Florianópolis, Mar 1999.

ORLOWSKA M., STECZKIEWICZ K., MUSZEWSKA A. Utilization of cobalamin is ubiquitous in early-branching fungal phyla. **bioRxiv**. Warsaw, Poland.2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.13.337048>.

OKAMOTO S., ELTIS L.D., **The biological occurrence and trafficking of cobalt**. Metallomics. British Columbia, Canada. Vol.3 p.963-970. 2011.



ORTIZ D.F., KREPPPEL L., SPEISER D.M., SCHEEL G., MCDONALD G., OW D.W.; Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. **EMBO J** 11: 3491–3499 (1992).

OSHIQUIRI L.H., **Análise do transcriptoma de *Trichoderma harzianum* em resposta a exposição a cádmio**. Tese (mestrado em ciências biológicas) – Universidade Federal de Goiás – GO. 93p 2019.

OSHIQUIRI L.H., SANTOS K.R.A., JUNIOR S.A.F., STEINDORFF A.S.S., FILHO J.R.B., MOTA T.M., ULHOA C.J., GEORG R.C. *Trichoderma harzianum* transcriptome in response to cadmium exposure. **Fungal Genetics and biology**. Goiânia, Brasil. 2020. Vol 134.

OSUMI M. Visualization of yeast cells by electron microscopy. **Journal of Electron Microscopy**. 61(6): 343-365 (2012) Tokyo Japan.

OTT T., FRITZ E., POLLE A., SCHÜTZENDÜBEL A.; Characterisation of antioxidative systems in the ectomycorrhiza-building basidiomycete *Paxillus involutus* (Barsch) Fr. and its reaction to cadmium. **FEMS Microbiol Ecol** 42: 359–366 (2002).

PAL A., GHOSH S., PAUL A.K. Biosorption of cobalt by fungi from serpentine soil of Andaman. **Bioresource Technology**. Kolkata, India. 2006. V97 1253-1258p.

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***. Dissertação (mestrado em ciências biológicas) Universidade Federal de Goiás – GO. 102p. 2013.

RAMADA, M.H. et al. Secretome analysis of the mycoparasitic fungus

*Trichoderma harzianum* ALL-42 cultivated in different media supplemented with *Fusarium solani* cell wall or glucose. **Proteomics**, v.3, 2015.

RAO S., LIANG J., SONG W. Accumulation of  $^{152+154}$  Eu(III) by *Aspergillus sydowii* and *Trichoderma harzianum*. **Journal of environmental radioactivity**. Jiangchuai, China. 2018. Vol 193-194 p75-81.

Reactive Oxygen Species', **Free Radical Biology and Medicine**, 36(11), p. 1434–1443. (2004) doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.010.

ROCHA A.F.: Cádmio, chumbo e mercúrio – A problemática destes metais pesados na saúde pública?. 2008. 63f. **Trabalho de conclusão de curso** (Ciências da Nutrição). Faculdade do Porto. Porto. 2009.

RONQUIM C.C.; Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais. EMPRAPA. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**. 1 edição. Campinas SP 2010.

RYUKO S., MA Y., MA N., SAKAUE M., KUNO T. Genome-wide screen reveals novel mechanisms for regulating cobalt uptake and detoxification in fission yeast. **Molecular Genetics and Genomics**. Himeji, Japan. 2012. v287 651-662p.

SAMUELS G.J., LIECKFELDT E., NIRENBERG H.I.: *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. **Sydowia** 1999; 51(1): 71-88.

SANTOS K.R.A., **Análise da tolerância ao alumínio em *Trichoderma harzianum***. Tese (mestrado em ciências biológicas) – Universidade Federal de Goiás – GO. 61p 2017.

SILVA A.A., GONÇALVES R.C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**. Botucatu, Brasil. 2010. v.40 n.4 p.994-1002.

SILVA C.N.B, GALACINE J.R.M., SILVA D.P., EIPHANIO P.D., BARROS B.M.C., GIROTTI T.F., BOSQUÊ G.G., LIMA F.C.C.: Aplicação do cobalto para absorção de nitrogênio na cultura de soja. **Revista científica eletrônica de agronomia**. Garça-SP. 2011. (20)- issn:1677-0293.

SILVA F.N., TEIXEIRA D.S., PAIVA O., ZIOTO P., MARCHIORO S., SAICK K.W., ULIANA M.P., LAIGNIER E.P., LOOS R.: Riscos relacionados à intoxicação por alumínio. **Infarma**. Brasília. 2012. (24) n1-3 120-125.

SILVA R.M., RIBEIRO E.A., CANTO A.L., MORAES L.H.F., CANEVARI R.A. Análise da expressão de genes *serpina1* e *TFF3* na predição do envolvimento de linfonodos em neoplasias mamárias. **XX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XVI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VI Encontro de Iniciação à Docência – Universidade do Vale do Paraíba**.2016.

SOOD M., KAPOOR D., KUMAR V., SHETIWIY M.S., RAMAKRISHNAN M., LANDI M., ARANITI F., SHARMA A.; Trichoderma: The “secrets” of a multitasked biocontrol agent. **Plants**. Basel. 2020; v.9(6) 762.

SOUZA T.L., BECHTLUFFT M.P.: Determinação de proteínas totais presentes nos ovos do carrapato *Boophilus microplus*, via espectrofotometria pelo método de Bradford. **Revista digital Synthesis**. V.4, n.4 p. 147-155. Pará de Minas-MG. 2013.

Ting ASY, Choong C.C. Bioaccumulation and biosorption efficacy of *Trichoderma* isolates SP2F1 in removing Copper(Cu II) from aqueous solutions. *World J Microbiol Biotechnol*; 25:1431–1437, 2009.

TRIPATHI, P. et al.: 'Trichoderma: a potential bioremediator for environmental clean up', **Clean Technologies and Environmental Policy**, 15(4), pp. 541–550. (2013) doi: 10.1007/s10098-012-0553-7.

TROTTER E.W. & GRANT C.M.; Thioredoxins are required for protection against a reductive stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Microbiol** 46: 869–878 (2002).

TSUTIYA M.T.: Características de biossólidos gerados em estações de tratamento de esgotos. In: TSUTIYA, M. T. et al. (Ed.). **Biossólidos na agricultura**. São Paulo: Sabesp, 2001. p.89-132.

VALE M.S., ABREU K.V., GOUVEIA S.T., LEITÃO R.C., SANTAELLA S.T., Efeito da toxicidade de Cr (VI) e Zn (II) no crescimento do fungo filamentoso *Aspergillus niger* isolado de efluente industrial. **Eng. Sanit Ambient.** Fortaleza-CE. v.16 n.3. 2011.

WANG X., YI M., LIU H., HAN Y., YI H. Reactive oxygen species and  $Ca^{2+}$  are involved in cadmium-induced cell killing in yeast cells. **Canadian Journal of Microbiology**. Taiyua, China. 2017. 63(2) 153-159p.

WANG, Y. et al.: 'Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces

WUANA, R. A. AND OKIEIMEN, F. E.: 'Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation', *ISRN Ecology*. **Hindawi Limited**, 2011, pp. 1–20. (2011) doi: 10.5402/2011/402647.

XU Y., XIANG S., YE K., ZHENG Y., FENG X., ZHU X., CHEN J., CHEN Y.: Cobalamin (vitamin B12) Induced a shift in microbial composition and metabolic

activity in a in vitro colon simulation. **Frontiers in microbiology**. v9. Hangzhou China. 2018.

XU X., QIN G., TIAN S., Effect of microbial biocontrol agents on alleviating oxidative damage of peach fruit subjected to fungal pathogen. **InternationJournalofFoodMicrobiology**. Beijing China. v126 p153-158. 2008.

YANG Y., SONG W., FERRIER J., FEIXUE L., CSETENYI L., GADD G.M.: Biorecovery of cobalt and nickel using biomass-free culture supernatants from *Aspergillus niger*. **AppliedMicrobiologyandBiotechnology**. Dundee, Scotland UK. V104 p417-425. 2020.

ZAIA D.A.M., ZAIA C.T.B., LICHTIG J.: Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**. São Paulo SP 21(6) 1998.

ZANG Y., RODIONOV D.A., GELFAND M.S., GLADYSHEV V.N.: **Comparative genomic analyses of nickel, cobalt and vitamin B12 utilization**. BMC Genomics. Lincoln USA. 10:78 p1-26. 2009.

ZHANG X., HARVEY P.R., STUMMER B.E., WARREN R.A., ZHANG G., GUO K., LI J., YANG H.; **Antibiosis functions during interactions of Trichoderma afroharzianum and Trichoderma gamsii with plant pathogenic Rhizoctonia and Pythium**. Functional & Integrative Genomics. Shandong CHINA. 2015. 15:599-610.

ZEILINGER S., GRUBER S., BANSAL R., MUKHERJEE P.K., Secondarymetabolism in *Trichoderma* – chemistrymeetsgenomics. **FungalBiologyReviews**. Mumbai-India 1-17p. 2016.