

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**  
**NÍVEL DE DOUTORADO**

**Secretômica de *Trichoderma atroviride* e *Trichoderma harzianum* frente a *Guignardia citricarpa*, agente etiológico da Pinta Preta dos Citros.**

FERNANDA BLAUTH DE LIMA

Caxias do Sul, 2016.

Fernanda Blauth de Lima

**Secretômica de *Trichoderma atroviride* e *Trichoderma harzianum* frente a *Guignardia citricarpa*, agente etiológico da Pinta Preta dos Citros.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do  
Sul, visando obtenção do título de Doutora  
em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rute T. da Silva Ribeiro  
Co-orientação: Prof. Dr. António Correia  
Profa. Dra. Ana Cristina Esteves

Caxias do Sul

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
UCS - BICE - Processamento Técnico

L732s Lima, Fernanda Blauth de, 1985-  
Secretômica de *Trichoderma atroviride* e *Trichoderma harzianum*  
frente a *Guignardia citricarpa*, agente etiológico da Pinta Preta dos  
Citros / Fernanda Blauth de Lima. – 2016.  
136 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.  
Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia, 2016.  
Orientação: Profa. Dra. Rute T. da Silva Ribeiro ; Coorientação:  
Prof. Dr. António Correia, Profa. Dra. Ana Cristina Esteves.

1. Fungos como agentes no controle biológico de pragas. 2.  
Trichoderma. 3. Controle biológico. 4. Doenças e pragas. I. Título.

CDU 2. ed.: 582.28:632.937

Índice para o catálogo sistemático:

- |  |                |
|--|----------------|
| 1. Fungos como agentes no controle biológico de pragas | 582.28:632.937 |
| 2. Trichoderma   | 582.28         |
| 3. Controle biológico                                  | 632.937        |
| 4. Doenças e pragas                                    | 632            |

FERNANDA BLAUTH DE LIMA

SECRETÔMICA DE *TRICHODERMA ATROVIRIDE* E *TRICHODERMA HARZIANUM* FRENTE A *GUIGNARDIA CITRICARPA*, AGENTE ETIOLÓGICO DA PINTA PRETA DOS CITROS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rute Terezinha da Silva Ribeiro

Co-orientadores: Prof. Dr. António Correia

Profa. Dra. Ana Cristina Esteves

TESE APROVADA EM 15 DE ABRIL DE 2016

Orientadora: Profa. Dra. Rute Terezinha da Silva Ribeiro

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Cristina Esteves

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

Prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva

Profa. Dra. Joseli Schwambach

Àqueles que estiveram ao meu lado,  
em todos os momentos de minha vida, pelo  
incentivo, apoio e compreensão durante esta caminhada,  
meus familiares,  
em especial meu pai **Gilberto Ferreira de Lima**,  
minha mãe **Olga Maria Blauth de Lima** e  
meus avós João Carlos Coutinho de Lima *in memorian* e  
Adélia Ferreira de Lima.

## A GRADECIMENTOS

O término de mais uma caminhada, mais uma conquista, mais um sonho realizado. Mas que tenho a plena certeza que, se não fosse pela imensa ajuda que recebi não teria chegado até aqui.

Desta forma o que me resta é agradecer a tudo e a todos que através de palavras, gestos e atitudes fizeram deste um sonho possível.

Não é tarefa fácil agradecer, pois podemos cometer o erro de não ser gratos o suficiente através de palavras. Devo agradecer a muitas pessoas, cada uma cumprindo um papel importante nesta longa trajetória.

Agradeço primeiramente a Deus por me ter dado forças, quando nem mesmo eu sabia que as tinha, para não desistir, pois todos sabemos que não é fácil abdicar de tempo com a família, noites sem dormir, vida social, entre outras tantas, para conseguir concretizar este tão sonhado Doutorado. Além disso, nos momentos de frustrações e tristeza, que foram inevitáveis, permitiu que surgessem novas oportunidades, e alegrias inesperadas tornando esta jornada compensatória e gratificante tanto no âmbito profissional como no pessoal.

Gostaria de agradecer também às pessoas mais importantes de minha vida e com certeza as que foram fundamentais para que concretizasse este sonho, minha família, em especial meus pais, **Olga Maria Blauth de Lima e Gilberto Ferreira de Lima**, e meus avós paternos, **João Carlos Coutinho de Lima e Adélia Ferreira de Lima**, que foram minha base e inspiração, onde aprendi meus valores e tronei-me o que sou. Apoiam cada decisão que eu tomo em minha vida, incentivam e principalmente torcem para que eu conquiste cada vez mais, novos objetivos. Sempre que pensei em desistir, foi neles que busquei ânimo para continuar. Agradeço imensamente os valores que hoje fazem parte de mim, aprendidos pelo exemplo que tive em vocês, sendo que o que levarei eternamente, que o que realmente importa é o que somos não o que temos, onde a humildade, o respeito ao próximo e a honestidade, fazem a diferença neste mundo de adversidades. E peço desculpas por fazer de meu sonho, um castigo, onde os momentos em família se tornaram raros.

Ao meu namorado, amigo, companheiro de todas as horas, quem muito escutou sobre meu trabalho, sem nem mesmo entender o que eu estava falando, quem me apoiou incondicionalmente em todos os momentos, desde os mais alegres aos mais depressivos ao longo destes quatro anos. À você, **Anderson Damião Klimann**, muito obrigado por estar sempre ao meu lado. Te amo muito.

À minha orientadora Prof. Doutora **Rute Teresinha da Silva Ribeiro**, pela oportunidade de eu continuar fazendo o que tanto gosto (pesquisar), por todo apoio, mas principalmente pela confiança de que eu poderia realizar este trabalho. Obrigada por tudo, pelo carinho, compreensão e amizade, que foram tão importantes para despertar a vontade de chegar ao final com tanta alegria pela conquista.

À toda equipe do **Microlab (Universidade de Aveiro-Portugal)** que me acolheram, me auxiliaram em todos os momentos, tanto quando o trabalho parecia não ter fim, quanto pelos momentos de tristeza que pairavam devido a distância de minha família, namorado e País. Tenham a certeza que cada um contribuiu um pouco para que meu trabalho tivesse sucesso. Mas agradeço principalmente meu orientador no exterior **Prof. Dr. António Correia**, pela oportunidade de eu ter conhecido todas essas pessoas maravilhosas que hoje fazem parte do meu coração, amizades eternas que jamais pensei em ter um dia, e à minha co-orientadora no exterior **Profª. Dr. Ana Cristina Esteves**, por todo apoio, pela incansável ajuda, a qualquer hora do dia, pela confiança depositada, sem ao menos me conhecer, pelo carinho nos momentos difíceis e por tudo que me auxiliou para que este trabalho fosse concluído, serei eternamente grata a você.

À toda equipe do laboratório de Controle Biológico de Doenças de Plantas e Fitopatologia, pelos momentos compartilhados e amizades, pelo carinho e ajuda de sempre.

À minha eterna amiga, **Maria del Carmen Braccini**, que mesmo distante, com palavras de carinho, sempre demonstrou acreditar em mim, a ela devo a base profissional que tenho, pois, durante a graduação como minha professora e orientadora, se propôs a ensinar não os conceitos que devemos aprender sobre esta grande Ciência, mas que por trás dela, somos seres humanos em busca de conhecimentos sobre a Vida.

À Universidade de Caxias do Sul, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, e ao Instituto de Biotecnologia, pelo espaço e apoio técnico, que contribuíram para que meu trabalho fosse realizado.

À Fundação de amparo à pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo, para desenvolvimento deste projeto de pesquisa na Universidade de Caxias do Sul e parte da pesquisa no Exterior, na Universidade de Aveiro (Portugal).

À Universidade de Aveiro (UA-Portugal), ao Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM/UA) e ao Departamento de Biologia (UA), pelo apoio técnico e disponibilidade de material para desenvolvimento da pesquisa no Exterior.

*Meus mais sinceros agradecimentos a todos que de algum modo fizeram parte desta conquista e realização pessoal. Muito obrigada.*

## RESUMO

Os agentes de controle biológico têm recebido grande reconhecimento, e o seu uso tem contribuído como um complemento ou substituição de agroquímicos. No entanto, existem poucos estudos sobre o controle biológico da Pinta Preta dos Citros, causada pelo fungo *Guignardia citricarpa*, o que impede o seu mercado *in natura*, além de prejudicar a sua exportação pelo uso intensivo de insumos químicos para controlar este patógeno. Os fungos do gênero *Trichoderma* são agentes de controle utilizados em todo o mundo contra vários fitopatógenos relevantes. Este estudo visou identificar proteínas extracelulares secretadas por *T. atroviride* T17 e por *T. harzianum* T1A, eficazes para o controle de *G. citricarpa*. Por eletroforese bidimensional (2D) foram obtidos perfis de proteínas secretadas por *Trichoderma* em meio de glicose (controle) e em meio suplementado com micélio desativado de *G. citricarpa*. As proteínas foram identificadas por LC-MS/MS mostrando que ambas as espécies secretam proteínas diferentes. Foram identificadas 68 proteínas das 178 diferencialmente expressas por *T. harzianum*, sendo a maioria relacionada aos mecanismos de biocontrole, mesmo no meio controle. Foi verificado que em contato com o patógeno a expressão de proteínas relacionadas com o metabolismo primário diminui. Por outro lado, *Trichoderma atroviride* mostrou uma maior expressão de proteínas relacionadas com biocontrole na presença de micélio do patógeno. Nesta espécie identificamos 59 proteínas de 116 diferencialmente expressas, principalmente proteínas relacionadas com a degradação da parede celular: α-manosidase, quitinase, mutanase, glicosidase, endoquitinase e, algumas famílias de glicoside hidrolases. Os resultados indicam que estas espécies apresentam um elevado potencial como agentes de controle de *G. citricarpa*. Os resultados são pioneiros em detalhar a interação de *Trichoderrma* com *G. citricarpa*, por meio da análise do secretoma.

**Palavras-chave:** Secretoma, *Trichoderma*, controle biológico, micoparasitismo, proteínas extracelulares.

## ABSTRACT

Biological control agents (BCA) have received great recognition, and their use has contributed as a complement or replacement of agrochemicals. However, there are few studies on the biological control of Black spot of citrus, caused by the fungus *Guignardia citricarpa*, which prevents the market *in natura*, besides damaging their export by the intensive use of chemical inputs to control this pathogen. *Trichoderma* fungi are the most applied worldwide BCA against various relevant plant pathogens. The purpose of this study was to identify extracellular proteins secreted by *T. atroviride* T17 and of *T. harzianum* T1A, which are effective for the control of *G. citricarpa*. Bidimensional electrophoresis (2D) allowed obtaining the secreted protein profiles of *Trichoderma* grown in glucose medium (control) and in medium containing inactivated mycelium of *G. citricarpa*. From the 178 differentially expressed proteins by *T. harzianum*, 68 were identified, most of them related to biocontrol mechanisms, even in the control medium. In the presence of the pathogen, the expression of proteins related to the metabolism decreases. On the other hand, *Trichoderma atroviride* showed higher expression of proteins related to biocontrol pathogen when grown in the presence of pathogen mycelium, when compared to the control medium. From the 116 differentially expressed proteins, 59 were identified, mainly proteins related to fungi cell wall degradation such as  $\alpha$ -mannosidase, chitinase, mutanase, glycosidase, endochitinase and, some families of glycoside hydrolases. The results indicate that these species have a high potential as biocontrol agents of *G. citricarpa*. These results are pioneers in to detail the *Trichoderrma* interaction with *G. citricarpa* through the secretome analysis.

**Keywords:** Secretome, *Trichoderma*, biological control, mycoparasitism, extracellular proteins.

## **Lista de Figuras**

Figura 1. Ciclo da doença Pinta Preta dos Citros. Adaptado de SEAB (2009) .....	17
Figura 2. Diâmetro das colônias de <i>G. citricarpa</i> em diferentes meios de cultura (Folha de laranjeira, CDA, Casca e Suco de laranja) em placas de Petri. Análise estatística realizada utilizando ANOVA seguida de um teste de comparações múltiplas de Tukey. Letras iguais correspondem a dados sem diferença estatística ( $p>0,005$ ).....	33
Figura 3. Placas de Petri com crescimento micelial de <i>G. citricarpa</i> nos diferentes meios de cultura: (A) Meio de Folha de laranjeira, (B) CDA, (C) Casca de Laranja e (D) Suco de Laranja.....	34
Figura 4. Biomassa de <i>G. citricarpa</i> após crescimento em diferentes meios de culturas líquidos: Folha de laranjeira, CDA, Casca e suco de laranja). Análise estatística realizada utilizando ANOVA seguida de um teste de comparações múltiplas de Tukey. Letras iguais correspondem a dados sem diferença estatística ( $p>0,005$ ) .....	35
Figura 5. Diâmetro da colônia de <i>G. citricarpa</i> crescida em MM sem secretoma, MM com secretoma e dextrose e MM com secretoma sem dextrose. Análise estatística foi realizada utilizando teste One-Way ANOVA seguida de um teste de comparações múltiplas de Tukey.....	37
Figura 6. Médias do diâmetro das colônias de <i>G. citricarpa</i> desenvolvidas em meio de cultura no período de 20 dias à 25 °C com fotoperíodo de 12 h, contendo meio extracelular de <i>T. atroviride</i> T17, com diferentes fontes de carbono sem acréscimo de sais (M1, M2, M3, M4) e com acréscimo de sais utilizada para o início de um cultivo de <i>T. atroviride</i> (M1%, M2%, M3%, M4%) e diferentes tempos de tempos de indução de <i>T. atroviride</i> (48, 72 e 96h). Todos os tratamentos receberam 1 % de dextrose.....	41

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1. Análise estatística dos resultados de inibição de crescimento de *G. citricarpa* em meio sólido contendo secretoma de *T. atroviride* T17 crescido em meio MTV com diferentes fontes de carbono, utilizando teste Two-wayANOVA seguida de um teste de comparações múltiplas de Tukey. ns- não significante .....

41

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
2. Revisão Bibliográfica.....	15
2.1. Citricultura do Rio Grande do Sul.....	15
2.2. Etiologia da Pinta Preta dos Citros.....	16
2.3. Medidas de Manejo da Pinta Preta dos Citros.....	17
2.4. Controle químico da Pinta Preta dos Citros.....	18
2.5. Controle alternativo de <i>G. citricarpa</i> .....	19
2.6. Controle biológico da Pinta Preta dos Citros .....	20
2.7. <i>Trichoderma</i> como agente de Controle biológico.....	21
2.7.1. Quitinases.....	23
2.7.2. Beta-1,3-glucanases.....	24
2.7.3. Proteases.....	26
2.7.4. Proteômica.....	26
2.7.5. Secretômica.....	29
3. Objetivos.....	31
3.1. Objetivo Geral.....	31
3.2. Objetivos Específicos .....	31
CAPÍTULO 4 – Avaliação de meios de cultura para o crescimento de <i>G. citricarpa.....</i>	32
4.1. Materiais e Métodos.....	32
4.1.1. Meio de cultivo sólido.....	32
4.1.2. Meio de cultivo líquido.....	32
4.2. Resultados e Discussão.....	33
CAPÍTULO 5 – Avaliação da presença de princípios inibidores de crescimento de <i>G. citricarpa</i> no filtrado da cultura de <i>T. atroviride</i> T17.....	36
5.1. Materiais e Métodos.....	36
5.1.1. Crescimento de <i>T. atroviride</i> em Meio Mínimo.....	36
5.1.2. Inibição do crescimento de <i>G. citricarpa</i> em Meio Mínimo.....	36
5.2. Resultados e Discussão.....	37

5.2.1. Inibição do crescimento de <i>G. citricarpa</i> em meio sólido.....	37
CAPÍTULO 6 – Inibição do crescimento de <i>G. citricarpa</i> em meio MTV com diferentes fontes de carbono e nitrogênio.....	39
6.1. Materiais e Métodos.....	39
6.2. Resultados.....	40
CAPÍTULO 7 - Secretome analysis of <i>Trichoderma atroviride</i> T17 biocontrol of <i>Guignardia citricarpa</i> .....	44
CAPÍTULO 8 – <i>Trichoderma harzianum</i> T1A constitutively secretes proteins involved in biological control of <i>Guignardia citricarpa</i> .....	75
CAPÍTULO 9 – Comparação da secretômica de <i>T. atroviride</i> T17 e <i>T. harzianum</i> T1A.....	111
10. Conclusões.....	113
11. Perspectivas Futuras.....	115
12. Referências.....	116

## **1. INTRODUÇÃO**

O Brasil é considerado o maior produtor mundial de citros, principalmente de laranja, assim como de suco de laranja para diversos países. Segundo Neves et al. (2010), o Brasil é responsável por 50% da produção mundial de suco de laranja, e 98% do que ele produz é exportado.

Assim como outras culturas, os citros estão sujeitos às condições abióticas e bióticas que muitas vezes favorecem o desenvolvimento de doenças. No Estado do Rio Grande do Sul as condições climáticas vigentes nas áreas de produção, com frequência, podem favorecer o desenvolvimento de doenças que reduzem a produtividade dos pomares e a qualidade das frutas. Entre os agentes etiológicos como vírus, bactérias e nematoides, os fungos se destacam por serem os mais importantes causadores de doenças nos citros.

Entre as doenças fúngicas, uma das que mais afeta a citricultura da região é a Pinta Preta dos Citros (PPC), causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* (*Phylosticta citricarpa* - anamórfica), o qual provoca lesões pretas na casca dos frutos, que danificam o flavedo inutilizando os frutos para o comércio *in natura*. Além de afetar a estética, a doença pode causar maiores prejuízos pela queda prematura dos frutos, reduzindo a produtividade das plantas.

A principal forma de controle da PPC tem sido através do uso de defensivos químicos, com uma intensa aplicação, podendo causar impactos negativos ao meio ambiente além de provocar a seleção de linhagens resistentes aos princípios ativos utilizados.

Outro fato negativo em relação ao controle químico da PPC é relacionado a produção de sucos a partir de frutos atacados e desmerecidos comercialmente para o mercado interno e externo. No entanto, esse suco não pode ser exportado, pois a PPC é uma doença quarentenária considerada A1 pela União Europeia (por não estar ainda presente em seus países membros), e qualquer resíduo de agroquímicos com registro para a doença, encontrado no suco é indicativo da presença do fungo na região produtora. Por isso, ainda que de forma reduzida em relação a outros fitopatógenos (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria* sp., entre outros) novas alternativas de controle de *G. citricarpa* têm sido avaliadas.

Desta forma, o grupo de pesquisa do Laboratório de Controle Biológico de Doenças de Plantas da Universidade de Caxias do Sul-Brasil, em parceria com o Curso de Agronomia e os citricultores do Vale do Caí-RS (Brasil), testaram o isolado T17 de *T. atroviride* em pomares, obtendo redução da incidência dos sintomas da PPC (resultados não publicados).

Os fungos do gênero *Trichoderma* são reconhecidamente eficientes agentes de controle biológico de diversos fitopatógenos. No entanto, há poucos estudos sobre a ação de *Trichoderma* sobre *G. citricarpa*, bem como o esclarecimento dos mecanismos utilizados por este antagonista no controle do patógeno.

Sendo necessário esclarecimentos sobre os mecanismos de biocontrole utilizados por *Trichoderma* contra o patógeno *G. citricarpa*, objetivou-se identificar alguns mecanismos moleculares de interação entre *T. atroviride* T17/ *T. harzianum* T1A e *G. citricarpa* Gc3. Através de técnicas de proteômica foram identificadas proteínas extracelulares secretadas durante o desenvolvimento de *T. atroviride* T17 e *T. harzianum* T1A na presença do fitopatógeno.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Citricultura no Rio Grande do Sul**

No Brasil a Citricultura tem grande importância econômica, sendo os estados produtores: São Paulo, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul (Fernandes, 2010, IBGE, 2016). Conforme Neves et al. (2010), no Brasil a citricultura promoveu um total de 230 mil empregos diretos e indiretos e uma massa salarial anual de R\$ 676 milhões. Além da importância na economia, a citricultura tem um papel importante na criação de novos empregos, na formação de capital, na geração de renda, na agregação de valor e, também, no desenvolvimento regional onde está inserida (Zulian et al., 2013). No contexto mundial, apresenta importância pela importação e exportação de produtos e subprodutos desenvolvidos.

No RS está concentrada principalmente nos Vales do Caí e Taquari, nos municípios de Montenegro, São Sebastião do Caí, General Câmara, Triunfo e Taquari (Koller, 1994). A produção anual de frutas cítricas no Estado no final dos anos 2000 foi de aproximadamente 750 mil toneladas e baseando-se em pomares que possuam em média, dois a três hectares (Pandolfo, 2011).

A citricultura gaúcha destaca-se pela qualidade das frutas frescas, estando acima da média nacional, em decorrência das condições climáticas da região. Além disso é caracterizada principalmente pela agricultura familiar, proporcionando características próprias, com diversidade no cultivo dos citros, bem como no número de cultivares (Guimarães, 2008). Apesar disso, e assim como outras culturas, também enfrenta problemas em relação ao controle fitossanitário de várias doenças. Entre elas, a Mancha ou Pinta preta dos citros (MPC ou PPC) causada pelo fungo *Guignardia citricarpa*.

A PPC causa redução da produtividade em pomares, depreciação dos frutos para o mercado de fruta fresca, além de onerar os custos de produção pelas diferentes estratégias de controle (Rodrigues, 2006). A PPC é uma das doenças com relevância econômica por afetar a produção e o aspecto dos frutos e, consequentemente a sua comercialização. Considerada uma doença quarentenária presente no Brasil, restringe a comercialização de material de propagação, mudas e frutos, além da restrição nas exportações de frutas cítricas brasileiras, principalmente quando destinadas ao mercado europeu (Aguilar-Veldoso et al., 2002).

A principal forma de controle dos sintomas desta doença é pela utilização de insumos químicos, aplicados quatro a cinco vezes por safra, reduzindo a quantidade de focos, mas com aumento do custo de produção, e com questões de toxicidade associadas (Dal Soglio et al., 2006; Baldassari et al., 2007).

## 2.2. Etiologia da Pinta Preta dos Citros

A Pinta Preta dos Citros é causada por um Ascomycota (Dothideomycetes) da ordem Botryosphaerales, família Phyllostictaceae. Na fase anamórfica ou imperfeita do seu ciclo é denominado *Phyllosticta citricarpa* Van der Aa. e, na fase teleomórfica ou sexual, *Guignardia citricarpa* Kiely (Kiely, 1948), sendo um patógeno específico dos citros (Paul et al., 2005).

Na fase imperfeita, o fungo desenvolve-se em folhas caídas no chão, onde são produzidos os ascósporos, cuja produção é influenciada pelas condições de temperatura e precipitação de chuvas (Alcoba et al., 2000). De acordo com Klotz (1978), os ascósporos formados nos ascocarpos são lançados e carregados pelo vento e assim disseminados até 2,5 Km de distância. Segundo Aguilar-Veldoso et al. (2002) a produção desses esporos é considerada importante pela capacidade de dispersão e maior viabilidade e tolerância ao ressecamento que os mesmos apresentam, favorecendo a sobrevivência do patógeno no campo. A contaminação das plantas por estas estruturas, ocorre a partir do início do período de frutificação (Kiely, 1948; McOnie 1964; Kotzé, 1988), nas superfícies das folhas, pedúnculos, folhas mortas e principalmente frutos (Feichtenberger, 1996). Em condições ambientais favoráveis, os ascósporos germinam, originando o apressório e a hifa de penetração (*peg*) que perfura e penetra pela cutícula do órgão vegetal, formando hifas secundárias responsáveis pelos sintomas da doença (McOnie, 1964; McOnie, 1967). Em geral, a visualização das lesões no flavedo só é possível quando os frutos atingem seu tamanho final e inicia-se a maturação, muitas vezes após a colheita, durante o armazenamento e o transporte (Feichtenberger et al., 2005).

Na superfície das lesões visíveis principalmente sobre frutos maduros encontram-se os picnídios, estruturas responsáveis pela produção dos conídios, os quais tem papel na disseminação de curta distância (Smith, 1996). Os conídios emergem do

picnídio através do ostíolo e rapidamente são transportados pelas águas da chuva, irrigação ou orvalho, alcançando a superfície de um tecido suscetível e assim iniciando novas infecções. As folhas infectadas quando caem no solo do pomar formam novos pseudotécios, dando continuidade ao ciclo (Kiely, 1948; Kotzé, 1981; Robbs et al., 1985) (Fig. 1).

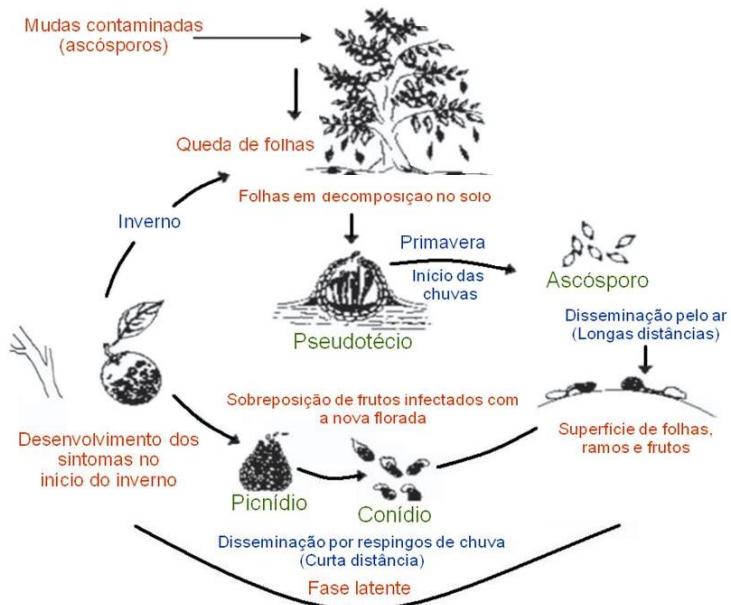


Figura 1. Ciclo da doença Pinta Preta dos citros. Adaptado de SEAB (2009).

Como já referido, os ascósporos são a principal forma de inóculo (Alcoba et al., 2000; Kotzé, 2000), por serem capazes de alcançar longas distâncias. Porém os conídios são também uma importante forma de inóculo uma vez que frutos maduros infectados coabitam com frutos sadios na mesma planta (Kotzé, 1996; Spósito, 2003).

### 2.3. Medidas de Manejo da Pinta Preta dos Citros

Para a redução dos prejuízos causados pela doença, o Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus, 2005) aconselha o uso de mudas sadias, boas condições de nutrição e sanidade das plantas, desinfestação de veículos, máquinas e equipamentos, retirada de restos vegetais e remoção de frutas temporâneas infectadas, controle de ervas daninhas, utilização de quebra ventos e irrigação nos períodos secos para evitar queda excessiva de folhas. Para o controle da doença a maioria dos citricultores também utiliza o controle químico.

## **2.4. Controle químico da Pinta Preta dos Citros**

A principal forma de controle da PPC, tem sido o emprego de fungicidas, devido ao longo período de suscetibilidade dos frutos (no mínimo 24 semanas). Portanto, são necessárias várias aplicações de fungicidas, que podem representar 10% a 13,2 % no custo final de uma caixa de laranja (Baldassari et al., 2007).

Os fungicidas de contato à base de cobre (sulfato de cobre, hidróxido de cobre, oxicloreto de cobre e óxido cuproso) e os ditiocarbamatos (mancozeb e propineb), e com ação sistêmica os do grupo dos benzimidazóis (carbendazim e tiofanato metílico) e as estrobilurinas (piraclostrobina, azoxistrobina, trifloxistrobina) são os fungicidas que apresentam comprovada eficiência no controle da PPC (Feichtenberger et al., 2005). Todos são utilizados isoladamente ou em combinação, com concentrações e épocas de aplicação já bem definidas (Feichtenberger et al., 2003).

Conforme o destino dos frutos, para comercialização *in natura* ou produção de suco, a aplicação dos fungicidas é adequada, visto que o aspecto externo dos frutos é importante apenas no primeiro caso. Para exportação de frutas frescas, os fungicidas à base de cobre em mistura com óleo podem ser usados somente nas primeiras pulverizações. Para as pulverizações posteriores, é recomendada a utilização de benzimidazóis ou estrobilurinas misturadas a óleo emulsível, para evitar a fitotoxicidade aos frutos, além de minimizar a promoção de manchas, lesões e injúrias comumente provocadas pelos fungicidas à base de cobre (Fundecitrus, 2005; Feichtenberger, 2007).

Preocupante, é a seleção de linhagens patogênicas resistentes aos princípios ativos desses insumos. Tanto os fungicidas à base de benzimidazóis como os de ação translaminar (estrobilurinas) são eficientes, porém exercem alta pressão para seleção de isolados resistentes devido aos seus sistemas específicos de ação (Ghini & Kimati, 2000; Rodrigues, 2010). Em alguns estudos já foram identificados isolados resistentes de *G. citricarpa*, como o que foi relatado em relação ao uso de carbendazim (Rodrigues et al., 2007) e de benomil (Possiede et al., 2009). Outro fator agravante é a resistência cruzada desenvolvida com o uso de fungicidas pertencentes a um mesmo grupo químico, como os benzimidazóis: carbendazim e o tiofanato metílico (Ghini & Kimati, 2000). Com este risco de resistência aos fungicidas, é recomendável a aplicação de, no

máximo, duas pulverizações por safra com fungicidas do mesmo grupo químico, além de uma alternância dos fungicidas (Fundecitrus, 2005; Feichtenberger, 2007).

Além da resistência causada pelo uso excessivo destes insumos químicos, também, de acordo com Toffano (2010), há uma crescente preocupação com os impactos sócio/ambientais, o que tem estimulado a busca por novas metodologias eficazes para o controle deste fitopatógeno. Assim, agricultores e pesquisadores começaram a considerar o uso de métodos alternativos no combate de doenças (Godoy, 2008; Punja & Utkhede, 2003).

## **2.5. Controle alternativo de *G. citricarpa***

Alguns estudos já indicaram métodos alternativos para o controle deste fitopatógeno como:

- Manejo Integrado com Quitosana (Rapussi et al., 2009).
- Manejo Integrado com Óleo Mineral (Vinhos, 2011).
- Manejo Integrado com Cobertura Verde (Rossêtto, 2009; Bellotte et al., 2013).
- Manejo Integrado com Utilização de Roçadeiras (Rigolin & Tersi, 2005; Laranjeira et al., 2005; Almeida, 2009)
- Manejo Integrado com Utilização de Podas (Laranjeira et al., 2005; Fundecitrus, 2004).
- Manejo Integrado das Formas de Plantio (Andrade et al., 2009)
- Manejo Integrado com Etileno (Bellotte et al., 2001; Baldassari et al., 2007).
- Redução da População do patógeno, utilizando mais de uma técnica de controle citada acima (Spósito et al., 2011; Scaloppi et al., 2012).
- Irradiação UV-C (Canale et al., 2011).
- Biofertilizantes (Kupper et al., 2006; Kupper, 2013).

## **2.6. Controle biológico da Pinta Preta dos Citros**

Foram realizados poucos estudos em relação ao controle biológico da PPC. Entre eles, foi relatada a utilização de *Saccharomyces cerevisiae* Meyer (Pascholati, 1998; Fialho, 2004) e a possibilidade de utilização de compostos orgânicos voláteis produzidos pela levedura. Nestes dois trabalhos o desenvolvimento de *G. citricarpa* foi inibido (Fialho et al., 2010).

Das bactérias do gênero *Bacillus*, como *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1), obtidas dos produtos comerciais Dipel® WP e Dimy Pel®, e *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-567), utilizadas no controle de *G. citricarpa*, com exceção do produto comercial Dipel®, demonstraram potencial inibidor de *G. citricarpa*: o número de picnídios por lesão de *G. citricarpa*, e o número de lesões por fruto, foi reduzido, (Lucon et al., 2010).

Guimarães (2008) utilizou como antagonista o fungo *Trichoderma koningii* isolado da superfície de folhas de tangerina Montenegrina, alcançando resultados satisfatórios no controle do *G. citricarpa*, tanto em ensaios *in vitro*, quanto *in vivo* realizados no mesmo pomar de onde o antagonista foi isolado. Pandolfo (2011), utilizando o mesmo isolado de *T. koningii* demonstrou a redução da severidade e incidência da PPC.

Outros organismos ou mesmo combinações de micro-organismos podem ter eficiências diferentes quando comparados em experimentos em condições de campo. Bernardo & Bettoli (2010) por exemplo, utilizaram para controlar *G. citricarpa* em frutos cítricos, *T. harzianum*, *B. subtilis* e um biofertilizante, que apresentava a carga microbiana composta principalmente por bactérias ( $3 \times 10^6$  ufc.mL<sup>-1</sup>) [*Bacillus* spp ( $3,2 \times 10^5$  ufc.mL<sup>-1</sup>), *Pseudomonas* spp ( $1,5 \times 10^4$  ufc.mL<sup>-1</sup>) e, em menor escala, actinobactérias ( $1,1 \times 10^2$  ufc.mL<sup>-1</sup>)]. O melhor resultado foi alcançado no tratamento com o biofertilizante, seguido pelo tratamento com *B. subtilis* ( $10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup>) e, por último o tratamento com *Trichoderma*. O tratamento com *Trichoderma* apresentou maior índice da doença, quando comparado com o controle, possivelmente pelo fungo, originado do solo, não ter se adaptado ao ambiente da parte aérea das plantas ou ainda pelo isolado avaliado não ser eficiente para o patossistema testado. O tratamento com

*Bacillus* (na concentração  $1\times10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup>) apresentou uma diminuição no índice da doença.

Kupper et al. (2011) salientam que, resultados relacionados ao antagonismo entre microrganismos como os do gênero *Trichoderma*, alcançados em condições de laboratório, nem sempre se refletem no controle de doenças em condições no campo. Além disso, observaram no mesmo trabalho que *B. subtilis* foi capaz de controlar o *G. citricarpa*, mas a eficiência sob condições de campo, provou ser instável, requerendo novos estudos com vista a selecionar isolados mais eficientes e o melhor período de aplicação.

Existe ainda a possibilidade de utilização de microrganismos endofíticos como relatado por Souza et al. (2004), que utilizaram bactérias endofíticas e obtiveram a inibição do crescimento de *G. citricarpa*.

Apesar destes resultados indicarem a possibilidade de controlar biologicamente a PPC e outras doenças, há poucas opções de insumos de baixo impacto certificados para o controle de doenças no Brasil, mesmo para a agricultura orgânica, sendo usualmente empregados agroquímicos como a calda bordalesa para o controle de *G. citricarpa* (Fischer et al., 2013).

Estudos mais específicos sobre os mecanismos utilizados pelos agentes de biocontrole devem ser realizados para a maior eficácia contra este fitopatógeno.

## **2.7. *Trichoderma* como agente de controle biológico**

Espécies de *Trichoderma* são os microrganismos mais utilizados como agentes de biocontrole de fungos fitopatogênicos (Howell, 2003; Lisboa et al., 2007; Inch et al., 2011; Wijesinghe et al., 2011; Martínez-Medina et al., 2014). Estes organismos são considerados agentes de biocontrole de diversos fitopatógenos como *Fusarium*, *Rhizoctonia* e *Botrytis* (Belete et al., 2015; El-Komy et al., 2015; Kotasthane et al., 2015; Rao et al., 2015; Talla et al., 2015; Vos et al., 2015). Alguns são conhecidos também pelas suas capacidades de induzir a resistência sistêmica contra doenças bem como fatores de crescimento de plantas (Singh et al., 2014; Lamdan et al., 2015; Rao et al., 2015; Salas-Marina et al., 2015; Vos et al., 2015).

O biocontrole exercido por *Trichoderma* pode ocorrer por diversos mecanismos como a competição por nutrientes e ou pelo local de infecção, antibiose, indução de respostas de defesa e de resistência nas plantas hospedeiras e, interferência com fatores de patogenicidade e micoparasitismo (Ruiz-Herrera, 1992; Schirmböck et al., 1994; Punja & Utkhede, 2003; Benítez et al., 2004; Brunner et al., 2005; Harman, 2006).

A antibiose por linhagens de *Trichoderma* ocorre através da produção de compostos tóxicos voláteis e não voláteis, que atuam no impedimento da colonização por outros microrganismos. Recebem destaque os metabólitos de baixo peso molecular e antibióticos, já identificados e estudados (Schirmböck et al., 1994; Vey et al. 2001, Mendóza et al., 2015).

Metabólitos com efeito fungicida difundido no meio de cultura, são responsáveis pela inibição do crescimento do micélio, além de promover a desorganização de células e a lise de hifas de alguns fungos (Ahmed et al., 2003). Howell (2003) observou a inibição do crescimento de *Fusarium oxysporum*, por meio de mecanismos específicos como a difusão e produção de metabólitos voláteis e não voláteis (pironas, isocianatos, péptidos e trichocinas).

Micoparasitismo é considerado o principal mecanismo exercido por fungos das espécies de *Trichoderma* (Kubicek et al., 2001; Gruber & Zeilinger, 2014, Troian et al., 2014). Envolve a liberação de enzimas extracelulares degradadoras de parede celular dos fungos patogénicos. Durante este processo o fungo antagonista perfura a parede celular e penetra nas hifas dos fungos fitopatogênicos, absorvendo o conteúdo nutritivo e consequentemente provocando a sua morte (Kubicek et al., 2001; Viterbo et al., 2002; Bech et al., 2014; Troian et al., 2014).

McIntyre et al. (2004) ressaltam a importância da combinação de enzimas e antibióticos para uma eficiência maior nos processos de antagonismo, assim como o observado por Howell (2003) observou que quando houve a combinação de antibióticos com diversos tipos de enzimas hidrolíticas e aplicadas sobre *B. cinerea* e *F. oxysporum*, estes atuaram em sinergismo, indicando que a degradação da parede celular do patógeno é necessária para o estabelecimento da interação, pois quando as enzimas foram utilizadas após a aplicação de antibióticos os resultados sobre os fitopatógeno foram menos eficientes, sugerindo a necessidade do sinergismo desses dois mecanismos.

Embora a literatura sobre o antagonismo demonstrado por espécies de *Trichoderma* seja extensa, nos últimos anos muitos pesquisadores têm buscado esclarecimentos sobre a interação molecular entre estas espécies e outros fungos. Alguns pesquisadores buscam esclarecer os processos de micoparasitismo de *T. harzianum* ALL42 (como espécie modelo) através de identificação de genes e proteínas (quitinases e glucanases), pelas análises de transcriptoma (Steindorff et al., 2014) e proteoma (Monteiro et al., 2010; Ramada, 2010).

### 2.7.1. Quitinases

Entre as enzimas degradadoras de parede celular liberadas pelas espécies de *Trichoderma*, estão as quitinases. Suas propriedades, seu envolvimento nos processos antagonistas e sua importância no controle biológico têm despertado interesse (Viterbo et al., 2002; Marcello et al., 2010; Monteiro et al., 2010). Os sistemas quitinolíticos, assim como os celulolíticos, mais bem estudados, são produzidos por fungos do gênero *Trichoderma*, sendo a espécie *T. harzianum* com maior número de trabalhos identificando a presença de quitinases no controle biológico (Lorito et al., 1998). Em relação a espécie mais estudada, sabe-se que o sistema quitinolítico de *T. harzianum* é formado por duas  $\beta$ -1,4-N-acetilglucosaminidas (E.C.3.2.1.96) e quatro endoquitinases (E.C.3.2.1.14) (Lorito et al., 1994).

No processo antagonista a ação das quitinases (E.C.3.2.1.14) recai sobre a quitina, um dos principais polímeros constituintes da parede celular dos fungos filamentosos. A quitina compreende cerca de 10 a 20% da parede celular. É um homopolímero de N-acetyl-glicosamina (E.C.3.2.1.96) com ligações  $\beta$ -1,4 intracadeia e ligações de hidrogênio intercadeia, originando as microfibrilas responsáveis pela integridade da parede celular destes organismos (Loguerio-Leite & Esposito, 2004).

Alguns estudos têm sido realizados para entender como a produção de quitinases é induzida durante a interação com o fungo alvo (hospedeiro). Inbar & Chet (1995) demonstraram que o complexo enzimático é secretado após contato físico do antagonista com lecitinas da parede do fungo alvo, sugerindo ser este o primeiro evento da interação. Segundo Harman et al. (2004), o padrão de indução enzimática difere de uma espécie de *Trichoderma* para outra, mas acredita-se na produção e secreção de

quitinases constitutivamente em baixos níveis por todas. Após o ataque inicial dessas enzimas sobre a parede celular do patógeno, oligômeros de quitina são liberados induzindo rapidamente a liberação de maiores volumes de quitinases e o ataque continua e se intensifica. Segundo Viterbo et al. (2002) e De La Cruz et al. (1995), oligômeros de quitina também induzem a expressão de outros genes de enzimas hidrolíticas (proteases: endopeptidases E.C.3.4.21-99 e carboxipeptidases E.C.3.4.11-18,  $\beta$ -1,3-glucanases: exoglucanase E.C.3.2.1.58 e endoglucanase E.C.3.2.1.6/E.C.3.2.1.75 e  $\beta$ -1,6-glucanases: E.C.3.2.1.21) que agem de forma sinérgica degradando a parede dos fungos hospedeiros.

### **2.7.2. Beta-1,3-glucanases**

A maioria dos fungos possui a capacidade de sintetizar  $\beta$ -glucanas para os espaços extracelular e citoplasmático, sendo que elas estão localizadas principalmente na parede celular. A natureza e a localização das  $\beta$ -glucanas na parede, sugerem que elas podem ser degradadas e utilizadas como fontes nutricionais, depois da exaustão de nutrientes externos ou por mudanças na composição da parede celular durante a morfogênese (Haran et al., 1996). As  $\beta$ -glucanas da parede então são hidrolisadas por  $\beta$ -glucanases, que são classificadas de acordo com o tipo de ligação  $\beta$  do substrato em que agem e pelo mecanismo de ataque (Pitson et al., 1993). A maior parte das  $\beta$ -glucanas presentes na parede celular de fungos filamentosos são as  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6-glucanas (Hong & Meng, 2003).

As  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,2 e  $\beta$ -1,6-glucanases são amplamente distribuídas em fungos, sendo que as últimas são menos comuns em fungos não-filamentosos (Marquardt et al., 1996). Cada isoforma das glucanases pode ocorrer em situações diferentes, dependendo da fonte de carbono utilizada no crescimento dos fungos (Noronha et al., 2000). Muitas  $\beta$ -1,3-glucanases de fungos hidrolisam polissacarídeos extracelularmente para um eventual transporte para o interior da célula e assimilação, viabilizando assim, o uso de  $\beta$ -glucanas como única fonte de carbono (De La Cruz et al., 1995).

As  $\beta$ -1,3-glucanases hidrolisam a cadeia  $\beta$ -1,3-glucana, polímero constituído de resíduos de *D*-glicose ligados em uma configuração  $\beta$ -1,3, por um de dois mecanismos possíveis: (a) as exo- $\beta$ -1,3-glucanases hidrolisam as  $\beta$ -glucanas pela clivagem

sequencial de resíduos de glicose das extremidades não-redutoras, liberando glicose como produto; e (b) as endo- $\beta$ -1,3-glucanases hidrolisam a cadeia de  $\beta$ -glucanas em sítios aleatórios liberando pequenos oligossacarídeos (Troian, 2014).

Tanto as  $\beta$ -1,3 quanto as  $\beta$ -1,6-glucanases são capazes também de inibir a germinação de esporos e o crescimento celular de fitopatógenos (De La Cruz et al., 1995). A espécie que apresenta maior número de trabalhos relatando a produção de glucanases no processo de controle biológico é *T. harzianum* (Lorito et al., 1998; De Marco et al., 2003; De Marco & Felix, 2007). Atuando também em sinergismo com outras enzimas hidrolíticas para lisar a parede celular dos fitopatógenos hospedeiros (De La Cruz et al., 1995).

Assim, muitas  $\beta$ -1,3-glucanases foram isoladas e caracterizadas em *Trichoderma* spp., e alguns genes clonados, como *bgn13.1* e *lam1.3* de *T. harzianum*; *glu78* de *T. atroviride*; *lamA1* que codifica uma endo- $\beta$ -1,3(6)-glucanase e *Tv-bgn2* de *T. virens*. Regiões conservadas de exo- $\beta$ -1,3-glucanases também foram utilizadas para construção de sondas para pesquisa em uma biblioteca genômica de *T. virens* resultando no isolamento de dois supostos genes (*Tv-bgn1* e *Tv-bgn2*) que codificam endo- $\beta$ -1,3-glucanases (Benítez et al., 2004; Martin et al., 2007).

No estudo realizado por Steindorff (2010) utilizando parede celular de *Fusarium solani* como fonte de carbono, foi observado a expressão de proteínas por *T. harzianum* relacionadas ao micoparasitismo após 36 horas de cultivo. Enzimas hidrolíticas relacionadas ao biocontrole foram obtidas, e as mais expressas foram  $\beta$ -glucanase (endo- $\beta$ -1,3-glucanase) e exoquinase. Devido a parede dos fungos fitopatógenos ser compostas principalmente por quitina e  $\beta$ -1,3-glucana estas enzimas tem um papel fundamental na sua hidrólise.

A expressão e liberação de enzimas para o meio extracelular é influenciada pelo tipo de substrato a que o microrganismo tem acesso. Giese et al. (2003), observaram que a produção de glucanases de *T. harzianum* e *T. asperellum* aumentou significativamente quando estes utilizaram paredes celulares de *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* como únicas fontes de carbono, sugerindo que a regulação da expressão de  $\beta$ -1,3-glucanase nestes antagonistas pode ser influenciada pela quantidade de  $\beta$ -glucano presente no meio de cultivo, que atua como agente indutor. Da mesma forma, Suárez et al. (2005), também concluíram que a resposta proteica de *T. harzianum*

varia tanto quantitativamente quanto qualitativamente de acordo com a parede celular utilizada durante o seu crescimento, sugerindo a sua capacidade para alterar a produção dessas proteínas de acordo com o fungo alvo.

### **2.7.3. Proteases**

As proteases são divididas, de acordo com o seu modo de ação em: (a) endopeptidases: clivam ligações no interior da cadeia polipeptídica; e exopeptidases: atuam na extremidade da cadeia polipeptídica (Monteiro, 2008).

De acordo com Suárez et al. (2007) as proteases participam em processos de degradação de proteínas celulares estruturais dos fitopatógeno, desestabilizando a integridade celular destes e facilitando a penetração e colonização por *Trichoderma*, além de auxiliarem na inativação de enzimas produzidas pelos fitopatógenos durante o processo de infecção das plantas.

Em comparação com trabalhos que visam a caracterização, isolamento e clonagem das quitinases e  $\beta$ -1,3-glicanases, ainda existem poucos estudos com o mesmo objetivo para as proteases, embora estas também atuem em processos de micoparasitismo (Troian, 2014).

Apesar dos poucos estudos sobre as proteases, genes de algumas proteases serínicas (*p8048*, *ss10*) (Suárez et al., 2007; Liu & Yang, 2009) e de proteases aspárticas (*papA*, *p6281*) (Delgado-Jarana et al, 2002; Suárez et al., 2005) de *T. harzianum*, já foram clonados e caracterizados.

### **2.7.4. Proteômica**

A proteômica é a análise do proteoma, sendo este o complemento proteico expresso por um genoma, célula, tecido ou organismo. Devido ao seu dinamismo, é possível observar no proteoma alterações da expressão assim como modificações pós-traducionais nas proteínas, como consequência de estímulos internos ou externos, e refletindo assim, as condições em que o organismo ou célula se encontram (Pandey & Mann, 2000; Bhaduria et al., 2007).

Nos anos 2000, o desenvolvimento nas técnicas que permitem a análise de proteínas, assim como a concomitante liberação de sequências do genoma, revelaram-se essenciais para o crescimento das publicações de proteômica, principalmente de fungos filamentosos. Apesar disso, ainda existem inúmeras dificuldades em torno de geração de amostras e interpretação dos dados de espectrometria de massa (MS), etapas muito importantes em tais estudos (Kim et al., 2007; Passel et al., 2013).

A proteômica tem sido amplamente utilizada para explorar o potencial de fungos em aplicações biotecnológicas e médicas (Oda et al., 2006; Kniemeyer, 2011; Oliveira & Graaff, 2011), tendo igualmente sido empregada para estudar molecularmente as interações planta-fungos (Bhaduria et al., 2010; González-Fernández & Jorrín-Novo, 2012), e fungos antagonistas-fungos fitopatogênicos (Monteiro et al., 2010).

O primeiro passo em qualquer estudo de proteômica, é a extração de proteínas. A separação subsequente é realizada principalmente por eletroforese bidimensional (2D-PAGE), apesar de a eletroforese unidimensional (1D-PAGE) muitas vezes ser utilizada para avaliar os resultados preliminares (Fernandes, 2015). Resumidamente, esta técnica separa as proteínas através de duas corridas de eletroforese, a isoeletrofocalização (IEF) e a SDS-PAGE que, quando combinadas são capazes de revelar uma quantidade considerável de proteínas e suas isoformas (Görg et al., 2004). A IEF, a separação de primeira dimensão, separa as proteínas de acordo com o seu ponto isoeletérico (*pI*). As proteínas são então, separadas por peso molecular (*MW*) por SDS-PAGE. Após a separação, as proteínas são detectados por um método de coloração adequado, e em seguida, excisados e digeridos enzimaticamente para produzir fragmentos de peptídeos que são posteriormente analisados por Espectrometria de Massas (MS) (Fernandes, 2015). Assim, 2D-PAGE permitem discriminar proteínas que são diferencialmente expressas entre duas condições biológicas, assim como isoformas e proteínas com *pIs* ou *MW* próximos (Jensen, 2006).

Estas metodologias permitem uma visão abrangente das proteínas expressas em um estado biológico específico, devido à alta resolução, precisão e capacidade de separação por géis 2D (Rogowska-Wrzesinska et al., 2013). Os estudos do proteoma fornecem também informações mais completas relacionadas a vias de sinalização, conjunto de proteínas reguladoras, modificações pós-traducionais e outras informações importantes em estados fisiológicos normais e anormais de células e/ou organismos, bem como as interações e interdependência dos processos fisiológicos (Rocha et al.,

2005).

A proteômica permitiu a identificação de inúmeras enzimas degradadoras da parede celular. Estes estudos permitem conhecer mais claramente eventos importantes de micoparasitismo, assim como proteínas envolvidas nas vias de sinalização celular auxiliares no biocontrole (Massart & Jijakli, 2007). Embora para a maioria das espécies de *Trichoderma*, ainda não esteja disponível um genoma completo, têm sido utilizadas técnicas de hibridização subtrativa, proteômica e EST's (*expressed sequence tags*) para melhor interpretação de dados. Através de diferentes condições de crescimento, estes estudos têm mostrado o arsenal genético destes fungos, porém ainda sem esclarecer totalmente os eventos individuais que ocorrem durante os processos de micoparasitismo (Vizcaíno et al., 2006; Vizcaíno et al., 2007; Scherm et al., 2008).

Mesmo com estas dificuldades, Grinyer et al. (2004) construiram um mapa proteico de referência de uma estirpe de *T. harzianum*, sendo este o primeiro trabalho de análise proteômica realizado com este fungo. Devido à falta de um genoma publicado de *T. harzianum* (na época deste estudo), dois espectrômetros de massas (Maldi-TOF e LC-MS/MS) foram utilizados para se obter um maior número de proteínas identificadas no trabalho.

Alguns anos mais tarde Grinyer et al. (2007) fizeram o mapeamento proteômico da sub-unidade 20S do proteasoma de *T. reesei*, identificando algumas proteínas UPR (*unfolded protein response*) como a proteína regulada por glicose, chaperonas que incluíram HSP 70, HSP98, e o regulador negativo UPR, serina/treonina fosfatase, algumas proteínas de interação também foram identificadas, como a 14-3-3 gliceraldeído 3-fosfato deshidrogenase, transaldolase, enolase, ATPases e fatores de elongação e tradução.

As amostras destinadas à análise por MS, podem ser inseridas diretamente no espectrômetro de massa, ou o equipamento pode ser acoplado a uma técnica de separação, podendo ser em fase gasosa, líquida ou eletroforese capilar. Através de um método de ionização apropriado são gerados íons, logo, estes são separados por meio de sua relação massa/carga ( $m/z$ ) em um analisador de massa e detectados qualitativamente e ou quantitativamente por meio de um detector de íons. A magnitude do sinal elétrico em função da razão  $m/z$  é convertida por um processador de dados, o qual gera o espectro de massa correspondente (Gross, 2004).

Graças aos avanços nas áreas de genômica, transcriptômica, metabolômica, proteômica e secretômica, tem sido potencializada a aplicação da MS em estudos biológicos, principalmente na identificação, de proteínas e estudos de modificações pós-traducionais em diferentes condições (Hoffmann & Strotbart, 2007; Feng et al., 2008). De acordo com Blackburn et al. (2010), a Espetrometria de Massas (MS) é uma técnica utilizada para análise de características quantitativas e qualitativas de peptídeos, proteínas e proteomas. A cromatografia líquida acoplada à Espectrômetria de Massa (LC/MS/MS) é uma combinação potente de ferramentas para a análise de proteínas, determinando e quantificando as biomoléculas (proteínas, mas também carboidratos, lipídeos e oligonucleotídeos), além da possibilidade de fragmentá-las para melhor elucidar sua estrutura e confirmar sua identificação.

As proteínas são comparadas através das massas moleculares reais com massas teóricas, contrastadas com um banco de dados, sendo assim possível a identificação da composição química de um composto ou amostra (Sparkman, 2006).

### **2.7.5. Secretômica**

Segundo Tjalsma et al. (2000) o secretoma é uma fração do proteoma total de um determinado organismo, sendo o conjunto de proteínas secretadas por um tipo de célula ou mesmo um conjunto celular, assim como os mecanismos responsáveis pela secreção destas proteínas.

Para melhor compreensão da identidade e função das proteínas extracelulares que participam dos mecanismos de degradação da parede celular de fitopatógenos, e possibilitando a aplicação dessas enzimas na biotecnologia, tem sido indispensável a análise do secretoma de fungos filamentosos (Bouws et al., 2008).

Grynier et al. (2005) identificaram proteínas extracelulares secretadas por *T. atroviride* crescido em caldo de cultura suplementado com micélio desativado do fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, como única fonte de carbono. Os autores também observaram nessa condição, maior expressão de proteínas relacionadas com a degradação de parede celular, como a β-1,3-glucanase.

Suárez et al. (2005) avaliaram a secreção de proteínas extracelulares de *T. harzianum* na presença de quitina e de paredes celulares de fungos fitopatogênicos

como *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* e *Phytiuum ultimum*, demonstrando diferenças significantes nos mapas bidimensionais das proteínas extracelulares e a presença de proteases do tipo tripsina e de uma nova protease aspártica (P6281), proteínas que têm um papel fundamental na atividade parasítica de *Trichoderma* sp.

Yang et al. (2009) analisaram o secretoma de *T. harzianum* ETS 323, na presença de várias fontes de carbono, relatando maior expressão de proteínas quando o fungo era crescido em caldo de cultura contendo micélio desativado do fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Uma de L-aminoácido oxidase (LAAO) e duas endochitinases foram expressas exclusivamente nessa condição. Os autores sugerem que a parede celular de *B. cinerea* é de fato o principal alvo de *T. harzianum* ETS 323 no mecanismo de controle biológico. Outras proteínas não diretamente associadas a degradação de parede celular também foram identificadas, como as relacionadas com a indução de resposta de defesa da planta como visto anteriormente por Djonovic et al. (2006).

Monteiro et al. (2010) também avaliaram respostas micoparasíticas de *T. harzianum* ALL42 quando crescido em meios contendo diferentes paredes celulares de fitopatógenos (*Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium* sp.) observaram uma variação tanto no enrolamento da hifa quanto nas proteínas secretadas. Identificaram 7 proteínas de 6 genes diferentes ( $\alpha$ - manosidase, fosfatase ácida,  $\alpha$ -1,3-glicanase, carboxypeptidase 2, glicosidase I e endoquitinase 42 kDa) das 63 bandas de proteínas retiradas dos géis.

Do Vale et al. (2012) cultivaram *T. harzianum* em meio com celulose, e identificaram 56 proteínas no secretoma, através de uma combinação de 2DE, MALDI-MS e MS/MS (Autoflex II), e de LC-MS/MS (LTQ Orbitrap-XL). Foram encontradas além de celulases, as quitinases e as endoquitinases, refletindo os recursos utilizados por *T. harzianum* no controle biológico.

Recentemente, Ramada et al. (2015) avaliaram o arsenal de hidrolases secretadas por *T. harzianum* na presença de *Fusarium solani*, como quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases, glucoamilases,  $\alpha$ -1,3-glucanases e proteases, já descritas como atuantes em processos de micoparasitismo.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Identificar as proteínas envolvidas nos mecanismos de biocontrole de *Trichoderma atroviride* T17 e *Trichoderma harzianum* T1A contra *Guignardia citricarpa* Gc3, agente causal da Pinta Preta dos Citros, através da elucidação do seu secretoma.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Selecionar o meio de cultura (sólido e líquido) mais eficiente para o desenvolvimento de *G. citricarpa*;
2. Analisar a inibição de crescimento de *G. citricarpa* em meio sólido com a utilização do meio extracelular de *T. atroviride* T17 crescido em meio mínimo e MTV;
3. Avaliar a atividade enzimática (quitinase e β-1,3 glucanase) nos meios extracelulares de culturas dos isolados de *T. atroviride* T17 e *T. harzianum* T1A;
4. Analisar as diferenças nos perfis enzimáticos determinados pelos diferentes substratos carbônicos nos caldos de crescimento de *T. atroviride* T17 e *T. harzianum* T1A;
5. Identificar e qualificar as proteínas no caldo de cultura de *T. atroviride* T17 e *T. harzianum* T1A, responsáveis pelo controle biológico de *G. citricarpa* Gc3, através de espectrometria de massa;
6. Comparar o secretoma de *T. atroviride* T17 e *T. harzianum* T1A.

## CAPÍTULO 4 – Avaliação de meios de cultura para crescimento de *G. citricarpa*

### 4.1. Materiais e métodos

Devido à diversidade de meios de cultura descritos na literatura, e seu crescimento mais lento em relação a maioria dos fungos, optou-se por determinar os meios mais eficientes para o crescimento de *G. citricarpa* Gc3 em meios sólido e líquido (para obtenção do micélio desativado). Foram avaliados os seguintes meios:

#### 4.1.1. Meio de cultivo sólido

1. **Folha:** meio de folha de laranjeira (200 g), dextrose (20 g) e agar (20 g) em 1000 mL de água destilada – Nozaki et al. (2004).
2. **CDA:** meio de cenoura (200 g), dextrose (20 g) e agar (20 g) em 1000 mL de água destilada – Adaptado de Caixeta et al. (2008).
3. **Casca:** meio com casca de laranja (200 g), dextrose (20 g) e agar (20 g) em 1000 mL de água destilada – Adaptado de Nozaki et al. (2004).
4. **Suco:** meio de suco de Laranja, dextrose e agar (modificado de Murdock et al., 1952), 10 g de caseína hidrolisada, 3 g de extrato de levedura, 4 g de dextrose, 2,5 g de fosfato de potássio, 200 mL de suco de laranja, 800 mL de água destilada e 17 g de agar.

Em todos os meios o pH foi ajustado para 4,7.

Em todos os meios testados, as condições de crescimento foram idênticas (crescimento de *G. citricarpa* durante 20 dias a 25 °C com fotoperíodo de 12 h). Os diâmetros dos micélios foram medidos a cada 7 dias.

#### 4.1.2. Meio de cultivo líquido

Todos os meios descritos no cultivo sólido foram avaliados, porém, sem adição de agar, em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio, pelo período de 10 dias com 180 rpm de agitação a 22 °C. A biomassa resultante foi filtrada em papel Whatman nº.1 e lavada três vezes em água destilada autoclavada, seca a 50 °C até o peso da amostra não sofrer mais alteração, moída em almofariz, aliquotada, autoclavada e armazenada em frascos âmbar a -20 °C.

## 4.2. Resultados e Discussão

Em meio sólido o patógeno alcançou melhor crescimento em meio CDA. Em apenas 14 dias dos 20 dias totais de crescimento já estabelecidos na literatura, enquanto que os outros meios testados apresentaram seu crescimento estabilizado em 20 dias e inferiores aos de CDA (Fig. 2). Assim, este foi o meio escolhido para o crescimento *in vitro* (meio sólido) no presente estudo. O meio de cultivo em que o fitopatógeno apresentou menor crescimento, em comparação aos outros meios, foi com suco de laranja, além de modificações morfológicas da colônia de *G. citricarpa*, onde observou-se um crescimento determinado do fitopatógeno (máximo de 4 cm de crescimento médio), e logo um crescimento sobreposto, ou seja, o fitopatógeno acabava degradando sua própria parede celular para usar como nutrientes capazes de promover a continuação de seu crescimento sobre ele mesmo (Fig. 3 e Fig. 4).

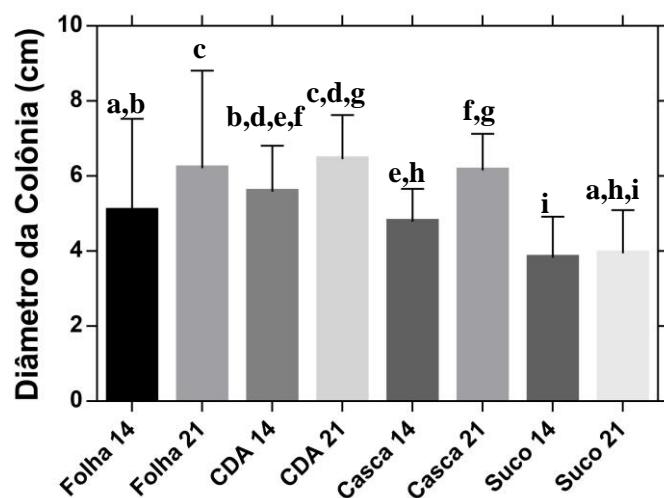


Figura 2. Diâmetro das colônias de *G. citricarpa* em diferentes meios de cultura (Folha - de laranjeira, CDA, Casca e Suco - de laranja) em placas de Petri. Análise estatística realizada utilizando ANOVA seguida de um teste de comparações múltiplas de Tukey. Letras iguais correspondem a dados sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

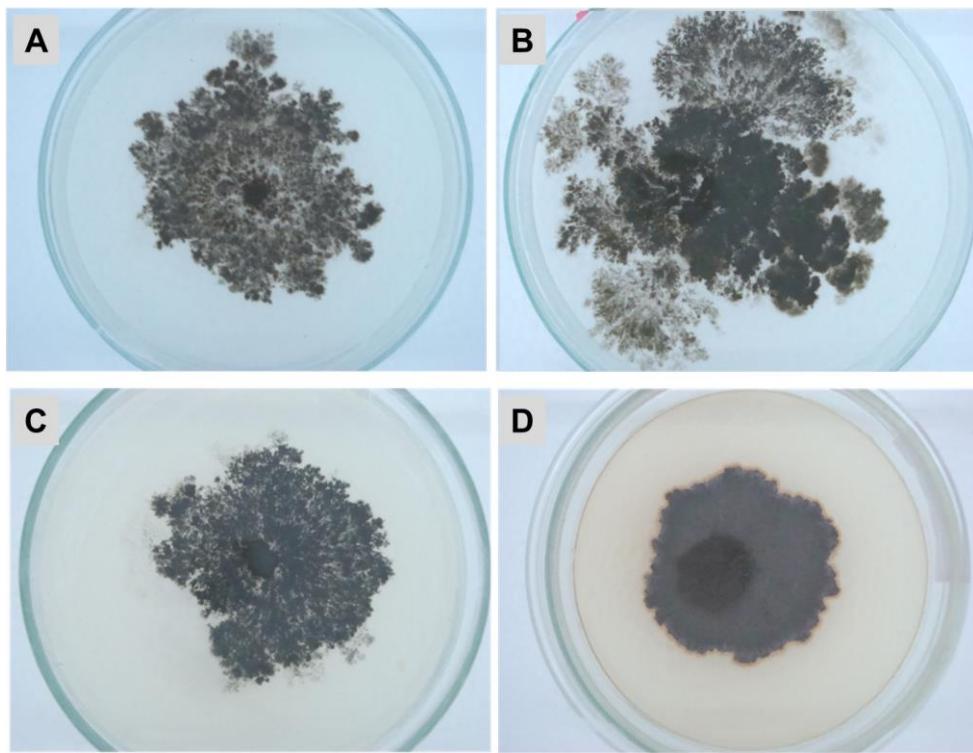


Figura 3. Placas de Petri com crescimento micelial de *G. citricarpa* nos diferentes meios de cultura: (A) Meio Folha de laranjeira, (B) CDA, (C) Casca de laranja e (D) Suco de laranja.

Os resultados obtidos assemelham-se aos de Caixeta et al. (2008), que observaram que o meio CDA proporcionou um maior crescimento micelial de *G. citricarpa*. Enquanto que alguns isolados estudados não apresentaram diferença significativa de crescimento nos meios CDA e AA (agar-água).

É importante ressaltar que Caixeta et al. (2008) utilizaram  $108 \text{ g/L}^{-1}$  de dextrose no meio CDA, enquanto no presente estudo pode-se observar um crescimento elevado com apenas  $20 \text{ g/L}^{-1}$  de dextrose.

Em meio líquido, pelo contrário, o meio que originou uma maior quantidade de biomassa foi meio Suco (suco de laranja sem agar, modificado de Murdock et al., 1952), seguido do meio líquido CDA (Fig.4).

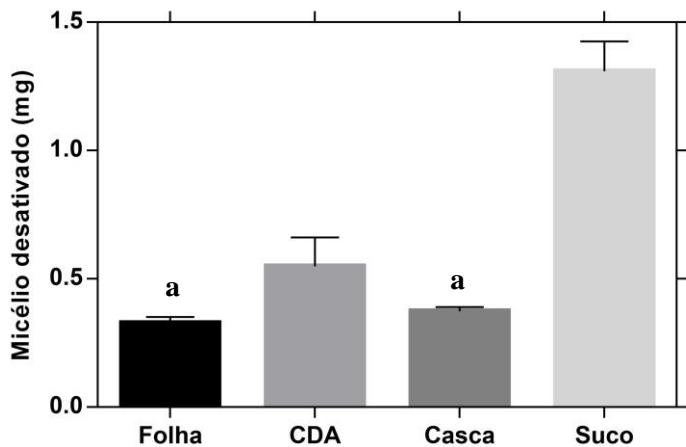


Figura 4. Biomassa de *G. citricarpa* após crescimento em diferentes meios de cultura líquidos: Folha de laranjeira, CDA, Casca e Suco de laranja. Análise estatística realizada utilizando ANOVA seguida de um teste de comparações múltiplas de Tukey. Letras iguais correspondem a dados sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

A partir dos resultados obtidos pode-se observar um comportamento diferenciado de *G. citricarpa*, conforme as condições de cultivo, demonstrando-se a importância da definição da metodologia de acordo com os objetivos propostos para utilização deste fitopatógeno, tendo em vista que se trata, como já dito, de um microrganismo de crescimento lento. Além de seu crescimento ocorrer penetrando o substrato em meio sólido, o que acaba por dificultar a retirada do micélio deste meio para inoculação em meio líquido e consequentemente obtenção da biomassa a ser utilizada como fonte de carbono na análise de secretômica de *T. atroviride* T17 e *T. harzianum* T1A.

## **CAPÍTULO 5 - Avaliação da presença de princípios inibidores de crescimento de *G. citricarpa* no filtrado da cultura de *T. atroviride* T17**

*Trichoderma atroviride* assim como *T. harzianum* foram crescidos em meio mínimo (MM - Pontecorvo et al., 1953) para obtenção de seu micélio e consequente transferência para o meio MTV- meio básico de *T. viride* (Mandels & Weber, 1969) com diferentes fontes de carbono para avaliação das proteínas extracelulares por meio de técnicas de secretômica. Os meios MM e MTV serão descritos na sequência.

Com o intuito de verificar se nestes meios (MM e MTV), houve secreção de compostos com atividade antifúngica de *T. atroviride*, que poderiam inibir o crescimento de *G. citricarpa*, os filtrados foram obtidos e após adição de agar, foram utilizados como meio para crescimento do patógeno em meio sólido.

### **5.1. Materiais e métodos**

#### **5.1.1. Crescimento de *T. atroviride* em Meio Mínimo**

*Trichoderma atroviride* T17 foi cultivado em placas de Petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Agar) por 5 dias a 25 °C. O micélio foi removido da superfície do meio de cultura com o auxílio da alça de Drigalski e solução salina autoclavada, formando uma suspensão com uma concentração de  $1 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>. Foram inoculados 2 mL da suspensão de conídeos em 98 mL de Meio Mínimo (MM – Pontecorvo et al., 1953, modificado) contendo, em g/L<sup>-1</sup>: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5,6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 27,6; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,2; peptona, 4; uréia, 1,2; de pH 5,0, e 1% (w/v) dextrose, em frascos Erlenmeyer de 250 mL. As culturas foram cultivadas a 25 °C em incubadora orbital, com agitação a 180 rpm durante 72 h.

#### **5.1.2. Inibição do crescimento de *G. citricarpa* em Meio Mínimo**

O filtrado, obtido a partir da separação do micélio de *T. atroviride* do MM através de papel filtro Whatman nº.1, foi dividido em duas porções. À primeira foi adicionada agar (15%) (MM com secretoma sem dextrose) e à segunda parte foi adicionada agar (15%) e dextrose (20%) (MM com secretoma e dextrose). Como controle utilizou-se um MM agarizado sem adição de secretoma (com 20% de

dextrose). Todos os meios foram autoclavados e utilizados para crescimento de *G. citricarpa* durante 20 dias a 25 °C.

## 5.2. Resultados e discussão

### 5.2.1. Inibição do crescimento de *G. citricarpa* em meio sólido

Os resultados obtidos dos diferentes tratamentos foram avaliados pela comparação do crescimento médio do micélio do fitopatógeno (Fig. 5). Verificou-se que existem diferenças significativas ( $p=0,006$ ) entre os diferentes meios testados. Especificamente, a adição de secretoma de *T. atroviride* ao meio induziu uma diminuição significativa ( $p=0,000$ ) em relação ao meio controle (MM sem secretoma) (Fig. 5). É importante ressaltar que o crescimento do patógeno no MM com secretoma e dextrose, apresentou crescimento inferior ao do controle, embora não estatisticamente significativo.

Estes resultados indicam que o MM onde foram cultivados *T. atroviride* T17 apresenta compostos secretados (não identificados) capazes de inibir o crescimento de *G. citricarpa*.

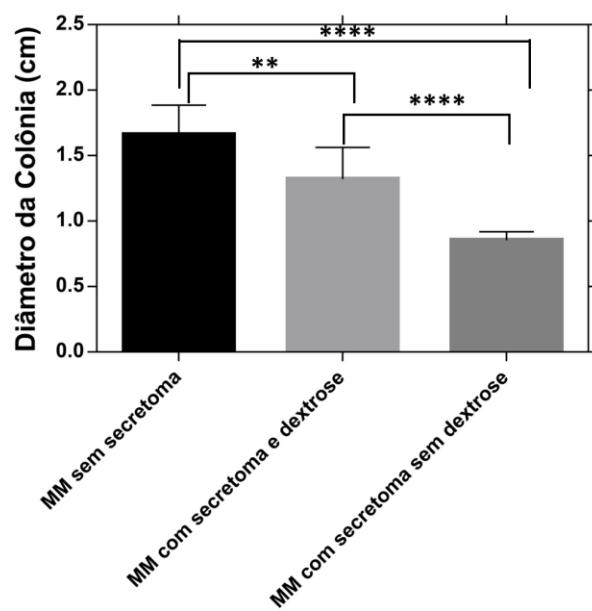


Figura 5. Diâmetro da colônia de *G. citricarpa* crescida em MM sem secretoma, MM com secretoma e dextrose e MM com secretoma sem dextrose. Análise estatística realizada utilizando teste One way ANOVA, seguida de um teste de comparações múltiplas de Tukey.

Já Fialho (2004) utilizou o filtrado do cultivo de *S. cerevisiae* CR-1 com o objetivo de avaliar o efeito de metabólitos produzidos e liberados por esta linhagem capazes de inibir o desenvolvimento do fitopatógeno. Embora *S. cerevisiae* CR-1 tenha mostrado ser antagonista de *G. citricarpa*, o autor observou que o filtrado contendo o secretoma não reduziu o crescimento micelial do patógeno.

Ainda poucos estudos demonstram a inibição de *G. citricarpa* através de metabólitos voláteis e não voláteis, ou metabólitos secundários de fungos antagonistas que possam melhor esclarecer o controle biológico desta doença pela utilização de agentes de controle biológico e principalmente desses componentes secretados pelos antagonistas já no meio inicial utilizado para seu crescimento (MM). Ressaltando a importância de estudos mais aprofundados sobre a composição deste meio, identificando quais são estes componentes secretados por *Trichoderma atroviride* e melhor compreensão da sua atuação sobre o fitopatógeno *G. citricarpa*.

## CAPÍTULO 6 - Inibição do crescimento de *G. citricarpa* em meio MTV com diferentes fontes de carbono e nitrogênio

Com o intuito de verificar se, após crescimento no meio MTV, a secreção de compostos por *T. atroviride* apresenta atividade inibidora de *G. citricarpa*, influenciada pela fonte de carbono a que *T. atroviride* está exposto, foram realizadas experiências utilizando fontes de carbono simples (dextrose) e complexas (micélio desativado de *G. citricarpa* e *T. atroviride*). O meio extracelular assim obtido foi utilizado para crescimento do patógeno em meio sólido.

### 6.1. Materiais e métodos

A biomassa de *T. atroviride* obtida em MM (metodologia descrita no item 5.1.1. do Capítulo 5), foi coletada e lavada três vezes com água destilada autoclavada e reinoculada em meio MTV (Mandels & Weber, 1969 modificado, contendo em gL<sup>-1</sup>: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,4; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,3; peptona, 1; uréia, 0,3; CaCl<sub>2</sub>, 0,3; 100 µL de solução de micronutrientes – 10 mL de água destilada; F<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,15; ZnSO<sub>4</sub>, 0,14; CoCl<sub>2</sub>, 0,2) com quatro diferentes fontes de carbono:

(M1) 1 % Dextrose;

(M2) 0,5 % Dextrose + 0,5 % micélio desativado de *G. citricarpa*;

(M3) 1 % micélio desativado de *G. citricarpa*;

(M4) 1 % de micélio desativado de *T. atroviride*.

Para cada condição (meio de cultura/tempo de cultivo) foram preparadas três réplicas. *Trichoderma atroviride* foi incubado num agitador orbital, a 180 rpm a 25 °C. As amostras foram coletadas após 48 h, 72 h e 96 h de incubação. Para cada amostragem, a cultura correspondente foi filtrada em papel filtro Whatman nº.1.

Todos os filtrados (M1, M2, M3 e M4) colhidos foram preparados com acréscimo de 1% de dextrose, ainda parte dos filtrados além de dextrose foram acrescidos de 50% dos sais do meio MTV (M1%, M2%, M3% e M4%). Assim, para cada tempo de coleta da amostra, obtiveram-se duas amostras, garantindo que os eventuais efeitos de inibição do patógeno ocorreriam pela presença do secretoma e não pela falta de nutrientes no meio. Após a adição de 2% de agar, os meios foram

autoclavados e distribuídos em placas de Petri e *G. citricarpa* foi inoculado na superfície dos meios sólidos e incubadas por 20 dias a 25 °C com fotoperíodo controlado.

## 6.2. Resultados

Observou-se que *G. citricarpa* Gc3, teve um crescimento reduzido em M1, independentemente do tempo de crescimento de *T. atroviride*. Este resultado indica uma possível falta de sais no meio de cultura, nomeadamente de uma fonte nitrogênio, o que está de acordo com o facto destes terem sido completamente utilizados por *T. atroviride*. De acordo com esta hipótese, de fato, no meio em que houve suplementação com sais (M1%) houve um crescimento importante (Fig. 6) quando se utilizou como meio de cultivo M1%-48h (correspondente a 48 h de incubação de *T. atroviride*). No entanto, quando foram utilizadas as amostras correspondentes aos outros dois tempos de crescimento de *T. atroviride* (72 h e 96 h) o diâmetro das colônias de *G. citricarpa* diminuiu significativamente, mesmo após a suplementação com dextrose e sais (M1%). Sendo assim, na presença do filtrado de *T. atroviride* cultivado em 1% de dextrose como única fonte de carbono (M1), *G. citricarpa* sofre inibição em consequência da possível presença de algum metabólito secretado pelo antagonista neste meio.

Em M2 houve uma significativa diminuição no crescimento de *G. citricarpa*, que se mostrou mais significativa para os tempos de 72 e 96 h de incubação de *T. atroviride*. Neste caso, o efeito da concentração de sais parece ter alguma importância, mas os princípios ativos secretados pelo *T. atroviride* em M2 são ainda mais importantes. Ressalta-se também que os resultados obtidos para 48 h em M2 aproxima-se dos alcançados em M1, onde a concentração de metabólitos ainda era baixa (Fig. 6).

Em M3 houve uma acentuada redução de *G. citricarpa*, como já era esperado, pois neste meio *T. atroviride* havia crescido na presença de micélio desativado do patógeno, produzindo uma maior quantidade de princípios inibidores de desenvolvimento fúngico. Mesmo com acréscimo de sais (M3%), esta inibição foi evidente (Fig 6).

Em M4 os resultados, demonstram que houve inibição do crescimento do patógeno, resultados semelhantes ao observados na presença do patógeno, já que os

estes dois meios utilizam micélios fúngicos desativados como única fonte de carbono (Fig. 6).

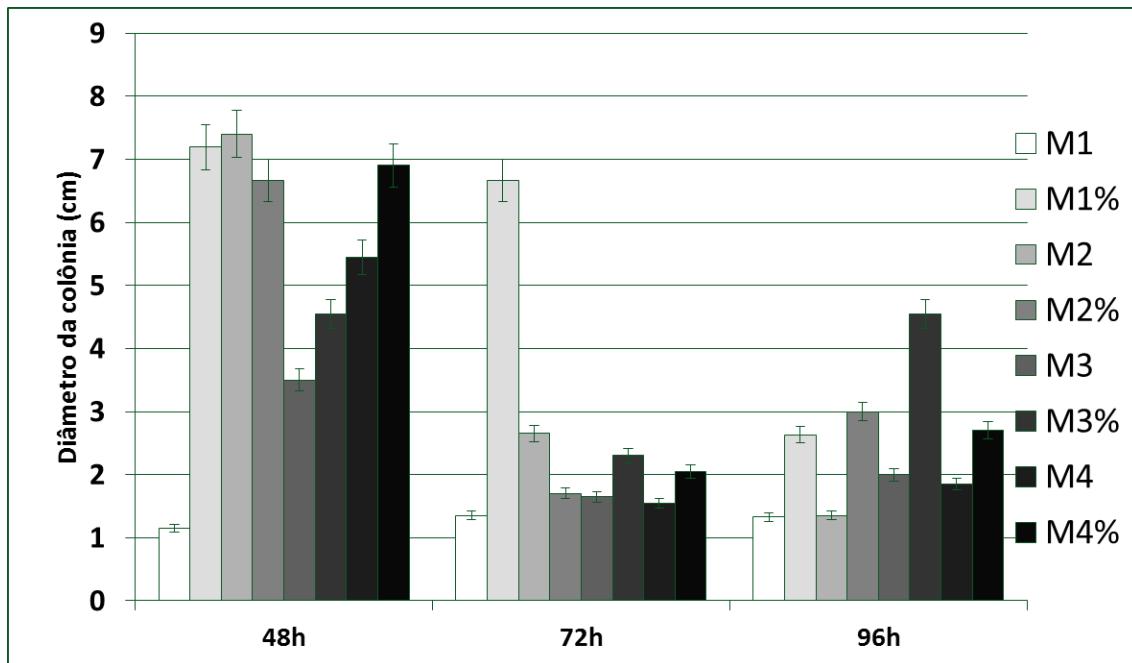


Figura 6. Médias do diâmetro das colônias de *G. citricarpa* desenvolvidas em meio de cultura no período de 20 dias à 25 °C com fotoperíodo de 12 h, contendo meio extracelular de *T. atroviride* T17 com diferentes fontes de carbono sem acréscimo de sais (M1, M2, M3, M4) e com acréscimo de sais utilizada para o início de um cultivo de *T. atroviride* (M1%, M2%, M3%, M4%) e diferentes tempos de indução de *T. atroviride* (48, 72 e 96 h). Todos os tratamentos receberam 1 % de dextrose.

Tabela 1. Análise estatística dos resultados de inibição de crescimento de *G. citricarpa* em meio sólido contendo secretoma de *T. atroviride* T17 crescido em meio MTV com diferentes fontes de carbono, utilizando teste two-way ANOVA seguida de um teste de comparações múltiplas de Tukey. ns – não significante.

Teste de comparações múltiplas de Tukey	Significância	Valor de p
M1 vs. M1 %	Sim	< 0,0001
M1 vs. M2	Sim	< 0,0001
M1 vs. M2 %	Sim	< 0,0001
M1 vs. M3	Sim	< 0,0001
M1 vs. M3 %	Sim	< 0,0001
M1 vs. M4	Sim	< 0,0001
M1 vs. M4 %	Sim	< 0,0001
M1 % vs. M2	Sim	< 0,0001
M1 % vs. M2 %	Sim	< 0,0001

M1 % vs. M3	Sim	< 0,0001
M1 % vs. M3 %	Sim	< 0,0001
M1 % vs. M4	Sim	< 0,0001
M1 % vs. M4 %	Sim	< 0,0001
M2 vs. M2 %	Não	ns
M2 vs. M3	Sim	< 0,0001
M2 vs. M3 %	Sim	< 0,001
M2 vs. M4	Sim	< 0,001
M2 vs. M4 %	Não	ns
M2 % vs. M3	Sim	< 0,0001
M2 % vs. M3 %	Sim	< 0,001
M2 % vs. M4	Sim	< 0,001
M2 % vs. M4 %	Não	ns
M3 vs. M3 %	Não	ns
M3 vs. M4	Não	ns
M3 vs. M4 %	Sim	< 0,0001
M3 % vs. M4	Não	ns
M3 % vs. M4 %	Sim	< 0,001
M4 vs. M4 %	Sim	< 0,001

Foi observado que o acréscimo de 1 % de dextrose a todos os meios, promoveu o crescimento de *G. citricarpa*, exceto o meio M1. Esperava-se que, neste meio, a concentração de nitrogênio fosse a mais baixa, o que terá contribuído para um efeito negativo no crescimento de *G. citricarpa* dada a falta de sais presentes no meio, que terão sido consumidos por *T. atroviride*. Esta hipótese é corroborada pelo aumento do crescimento de *G. citricarpa* quando há um acréscimo de sais.

Fialho (2004) ressalta que um dos mecanismos que pode estar envolvido no controle de *G. citricarpa* por *S. cerevisiae*, é a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares. Neste sentido, e embora os filtrados de *T. atroviride* possivelmente apresentem outros metabólitos que não sejam as enzimas hidrolíticas, devido à desnaturação ocorrida pela autoclavagem dos meios, ressalta-se a importância de melhor esclarecimento quais as moléculas que induzem a inibição de *G. citricarpa*, principalmente no tempo de 72 h, onde foi verificada uma nítida inibição em relação aos outros tempos.

Assim, novos estudos devem ser realizados para melhor identificação dos componentes orgânicos presentes nestes diferentes meios e tempos de exposição que *T. atroviride* foi exposto, possibilitando esclarecer esta inibição de *G. citricarpa*.

## CAPÍTULO 7 - Artigo submetido à revista *Biological Control*

### **Secretome analysis of *Trichoderma atroviride* T17 biocontrol of *Guignardia citricarpa***

Fernanda Blauth de Lima<sup>1\*</sup>, Carina Félix<sup>2</sup>, Nádia Osório<sup>2</sup>, Artur Alves<sup>2</sup>, Rui Vitorino<sup>3</sup>, Pedro Domingues<sup>3</sup>, António Correia<sup>2</sup>, Rute. T. da Silva Ribeiro<sup>1</sup>, Ana Cristina Esteves<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>2</sup>Department of Biology and CESAM, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

<sup>3</sup>Department of Chemistry and QOPNA, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

\*Corresponding author:

Fernanda Lima

Department of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Street Francisco Getúlio  
Vargas, 1130, 95070-560, Rio Grande do Sul, Brazil

Telephone/ Fax: (+5554) 3218-2100

e-mail: nandalima85@gmail.com

## **Abstract**

The fungal species *Guignardia citricarpa* is an important pathogen in citriculture. Members of the fungal genus *Trichoderma* are recognized as biocontrol agents but studies on the interactions between both fungi are scarce. This study aimed to identify extracellular proteins secreted by *Trichoderma atroviride* T17 that are related to the control of *G. citricarpa*. Two-dimensional gel electrophoresis (2D) was used to study the patterns of proteins secreted by *T. atroviride* T17 in medium containing glucose (control) and in medium containing *G. citricarpa* GC3 inactivated mycelium. We identified 59 of the 116 spots differentially expressed (50.86%) by LC-MS/MS. Of these, we highlight the presence of glycoside hydrolases (CAZy families 3, 43, 54, 76 and 93), chitinase, mutanase,  $\alpha$ -1,3-glucanase,  $\alpha$ -1,2-mannosidase, carboxylic hydrolase ester, carbohydrate-binding module family 13, glucan 1,3- $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -galactosidase and Neutral protease 2. These proteins are related to mycoparasitism processes, stimuli and therefore to the biological control of plant defense responses.

The results obtained are in agreement with reports describing an increase in the secretion of proteins related to mycoparasitism and biological control and a reduction in the secretion of proteins related to the metabolism of *Trichoderma* species grown in the presence of the pathogen. Moreover, these results are pioneer in understanding the *Trichoderma* interaction with *G. citricarpa*. For the first time, we identified potential candidate proteins that may have a role in the antagonism mechanism of *G. citricarpa* by *T. atroviride* T17. Thus our results shed a light into the molecular mechanisms that *T. atroviride* use to control *G. citricarpa*.

**Keywords:** *Trichoderma atroviride*, *Guignardia citricarpa*, biological control, proteomics, pathogen antagonism

## **Introduction**

The citrus industry has a major relevance in the economy, leading to the creation of new jobs, to capital formation, to income generation and also in regional development where it operates. A worldwide importance of citrus industry is the import and export trades of these products and by-products. Neves et al. (2010) stated that the sector held a total of 230,000 direct and indirect jobs in Brazil and an annual payroll of 174 million dollars. The monoculture of citrus is threatened by abiotic and biotic stressors that favor the development of diseases. Black spot disease, caused by the fungus *Guignardia citricarpa* Kiely (*Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa) is of major concern causing black lesions on fruit making them unfit for sale.

Black spot disease occurrence has been reported in Argentina, Brazil, China, Philippines, Indonesia, Japan, Mozambique, New Zealand, Peru, Kenya, Taiwan, Uruguay (Sutton and Waterson 1966), and recently in the United States (Adaskaveg et al. 2010, Schubert et al. 2012), suggesting the cosmopolitan occurrence of this pathogen, which develops in tropical regions (Paul et al. 2005). Although this disease does not damage the internal fruit quality, with symptoms restricted to the flavedo (Aguilar-Vildoso et al. 2002), it disables the *in natura* trade of fruits (Aguilar-Vildoso et al. 2002, Timmer et al. 2008). Additionally, the pathogen leads to great losses due to premature decline, reducing the productivity of plants. In severe attacks, losses up to 80% have been observed (Klotz 1978, Spósito et al. 2004).

The control of the symptoms of this disease is mainly made via the use of chemicals that are applied four to five sprays per crop. This strategy adds increased production costs while it has severe toxicity issues associated (Bernardo and Bettoli 2010). According to Hortifrutti Brazil (2012), producers estimate that the cost of agrochemicals reaches 30% of the production cost. An additional complication of using this type of control is the selection of resistant strains to the active ingredients. Rodrigues et al. (2007) found isolates of *G. citricarpa* resistant to the fungicide carbendazim in Brazilian plantations, probably generated by the intensive use of agrochemicals and the selection pressure exerted by them. In addition to the resistance caused by the excessive use of these chemicals, there is also a growing concern about the socio/ environmental impacts (Ali 2014), which has stimulated the search for new

effective methods to control this pathogen. It is the objective of these new strategies to replace or decrease fungicide applications, consequently reducing costs for the farmers/exporters as well as reducing ecological costs. One alternative is the use of antagonistic microorganisms with potential to inhibit some stages of the disease or the life cycle of pathogens (Strobel 2006, Vinale et al. 2006, Isaias et al. 2014, Miao et al. 2015, Parmar et al. 2015).

Species of *Trichoderma* are considered effective biocontrol agents of several fungal pathogens such as *Fusarium*, *Rhizoctonia* and *Botrytis* (Belete et al. 2015, El-Komy et al. 2015, Kotasthane et al. 2015, Rao et al. 2015, Talla et al. 2015, Vos et al. 2015). Some species of *Trichoderma* are also known for their ability to induce systemic resistance against plant diseases (Singh et al. 2014, Lamdan et al. 2015, Rao et al. 2015, Salas-Marina et al. 2015, Vos et al. 2015). The biocontrol exercised by *Trichoderma* can occur by several mechanisms such as mycoparasitism (Gruber and Zeilinger 2014, Troian et al. 2014). Mycoparasitism occurs due to the activity of degrading extracellular cell wall enzymes from other fungi, allowing the penetration of the antagonistic fungus and the death of the pathogen (Viterbo et al. 2002, Bech et al. 2014, Troian et al. 2014). The process of mycoparasitism involves sequential events that include the reconnaissance and the penetration into the host culminating into its death. After detection and recognition of a pathogen, *Trichoderma*'s hyphae are directed towards the pathogen. The attack occurs when *Trichoderma* secretes cell wall degrading enzymes (endochitinases,  $\beta$ -glucosidase, mannosidases, acid phosphatases and proteases) that act synergistically to control pathogens such as *Botrytis cinerea*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium* sp, among others (Monteiro et al. 2010). These enzymes are capable of hydrolyzing the cell wall of the host, releasing oligomers that activate the expression of genes involved in mycoparasitism (Vinale et al. 2008). When the host and the mycoparasite establish physical contact, the mycoparasite adheres to the host via apressorium surrounding the host hyphae (Chet et al. 1998). The mycoparasite then enters the lumen of the hyphae of the host, assimilating and metabolizing the protoplasmic content (Suárez et al. 2007). Fungi of the genus *Trichoderma* are considered excellent hyperparasites, attacking hyphae, and reproduction and survival structures of plant pathogens, reducing the infective capacity of the pathogen (Benhamou and Chet 1996). This is a broad description of the mycoparasitism mechanism and variations may occur according to the host that is

involved. Monteiro et al. (2010) reported that the mycoparasitic response of pathogen *T. harzianum* ALL42 is host dependent with variations in both hyphae winding and secreted proteins.

Despite the recognized potential of *Trichoderma* as a biological control agent of plant pathogens (Inch et al. 2011, Wijesinghe et al. 2011, Martinez-Medina et al. 2014), the number of studies on *Trichoderma* action on *G. citricarpa*, or regarding the mechanisms used by *Trichoderma* in controlling this pathogen are scarce. Among the few studies involving these two fungi (antagonist/pathogen) those by Guimarães (2008) and Pandolfo (2011) stand out. These authors reported the antagonistic action of *T. koningii* towards *G. citricarpa* *in vitro*, suggesting *Trichoderma* potential as a biological control agent citrus disease. But these authors do not indicate which are the mechanisms used by *Trichoderma* enabling it to act as biocontrol agent of this phytopathogen.

The strain used in his work was selected due to its biocontrol over *Guignardia*: the Biological Control Laboratory of Plant Diseases (University of Caxias do Sul, Brazil), in partnership with producers from the Vale do Caí-RS (Brazil), showed that strain T17 of *T. atroviride* is able to reduce on the symptoms of black spot of citrus in orchards (unpublished results).

Proteomics allow unraveling proteins involved in the interaction between organisms (Yang et al. 2009, Vincent et al. 2012, Lemos et al. 2010). Therefore, this study aims to identify the molecular mechanisms of interaction between *T. atroviride* T17 and *G. citricarpa* GC3, with emphasis in the identification of extracellular proteins, using proteomics methodologies.

## Material and methods

### *Guignardia citricarpa* isolation and identification

*Guignardia citricarpa* Gc3 belongs to the in house culture collection of the Biological Control Laboratory of Plant Diseases (University of Caxias do Sul, Brazil). This strain was isolated from orange with symptoms of the citrus black spot disease and identified by morphology (electron microscopy).

Molecular identification of *G. citricarpa* Gc3 was carried out by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) region, as described by Alves et al. (2004). Fungal isolate was grown in PDA (Potato Dextrose Agar), for 20 days, at 25 °C with controlled

photoperiod (12/12h) (Guimarães, 2008). Genomic DNA was isolated from fresh mycelium following the method the method of Santos and Phillips (2009).

After DNA isolation, the ITS region was amplified using the primers ITS1 and ITS5 (White et al. 1990) as described by Alves et al. (2004). *Taq* polymerase, nucleotides and buffers were supplied by MBI Fermentas (Vilnius, Lithuania) and PCR reaction mixtures were prepared according to Alves et al. (2004). The amplified PCR products were purified with the JETQUICK PCR Purification Spin Kit (GENOMED, Löhne, Germany). The PCR products were sequenced by STAB Vida Lda (Portugal). ITS sequences were checked manually, and nucleotide arrangements at ambiguous positions were clarified using both primer direction sequences. The ITS sequence was then used in a BLAST search against the GenBank nucleotide sequence database.

### **Cultivation and deactivation of *Guignardia citricarpa***

The pathogen was cultured in Potato Dextrose Agar (PDA), for 30 days at 25°C with controlled photoperiod. Afterwards, mycelium was scraped off and inoculated into 100mL of Potato Dextrose Broth medium (PDB) for 10 days, 25°C, 180 rpm. The mycelium was collected by filtration (Whatman Filter paper No.1), washed three times in sterile distilled water, and dried at 50°C until the sample weight stabilized. Subsequently, the mycelium was ground in a mortar, aliquoted, autoclaved and stored in amber vials at -20°C until use. For this point forward we will refer to this deactivated mycelium as *G. citricarpa* inactivated mycelium.

### **Cultivation of *T. atroviride* T17 and extraction of extracellular proteins**

*Trichoderma atroviride* T17, was isolated from apple tree and identified (morphology by microscopy) by the Biological Control Laboratory of Plant Diseases (University of Caxias do Sul, Brazil). The molecular identification of *T. atroviride*, was performed as described above, for *G. citricarpa* Gc3.

*Trichoderma atroviride* T17 was grown on PDA for 5 days at 25°C. To obtain a suspension of  $1.10^6$  conidia.mL<sup>-1</sup>, the medium surface was washed with 2ml of NaCl (0.9%, w/v) using a sterile Drigalski handle.

Two mL of the conidial suspension were inoculated into 98mL of minimum medium [broth containing in gL<sup>-1</sup>: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.45;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.15; peptone, 0.5; urea, 0.15; pH 5.0, 1% (w/v) glucose] and incubated at 25°C for 72 hours (180rpm).

Subsequently, the mycelium was collected by filtration, washed with sterile distilled water and re-inoculated into 100mL medium MTV (in broth containing  $\text{gl}^{-1}$ :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.4;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3; urea, 0.3;  $\text{CaCl}_2$ , 0.3; peptone, 1; 100 $\mu\text{L}$  solution [ $\text{FeSO}_4$ , 5g/100mL;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.5g/100mL;  $\text{ZnSO}_4$ , 1.4g/100mL;  $\text{CoCl}_2$ , 2g/100mL]) supplemented with:

- (1) 1% (w/w) glucose (control medium) and
- (2) 1% (w/w) *G. citricarpa* inactivated mycelium (Tseng et al., 2008; Yang et al., 2009) and incubated at 25°C (180rpm) for 24h, 48h, 72h, 96h and 120h.

The extracellular medium was collected by filtration (Whatman Filter paper No.1), aliquoted and stored at -80°C until use. Protein extraction was made as described earlier (Fernandes et al. 2014, method 1).

All assays were made in quintuplicate.

### **Protein Quantification**

Protein concentration was determined using the BCA kit from Thermo Scientific, according to the manufacturer's instructions, using Bovine Serum Albumine as standard. The whole procedure was performed in triplicate.

### **Determination of enzyme activity**

Activity of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase were quantified in the extracellular medium of *T. atroviride* as described earlier by Reissig (1957) and Noronha and Ulhoa (1996), respectively.

### **Protein separation by 1D-electrophoresis**

In order to evaluate the quality of protein extraction, all samples were subjected to 1D-electrophoresis (SDS-PAGE) prior to separation by 2D. For SDS-PAGE, 30  $\mu\text{g}$  of protein extract were diluted (1:1) in 8 M urea, 100 mM Tris, 100 mM bicine, 2% SDS, 2% 2-mercaptoethanol, and heated for 5 min at 100°C. Proteins were separated by 12.5

% SDS-PAGE gel electrophoresis, according to Laemmli (1970), for 120 min at 120 V, in a Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad, USA).

Proteins were visualized by colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) staining (Neuhoff et al. 1988). Each gel image was acquired using the GS-800 calibrated imaging densitometer (Bio-Rad, USA) as described (Sarmento et al. 2009).

### **Protein separation by 2D-electrophoresis**

For 2D-electrophoresis, 150 µg of protein extract were loaded onto IPG strips (pH 4-7, 13 cm, GE Healthcare ) that were actively rehydrated (50 V, 10h, 20°C) with 250 µL of rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris-base, 2% DTT, 2% IPG buffer pH 4-7 NL and bromophenol blue). IEF was performed on a Ettan IPGphor 3 system (GE Healthcare, Sweden) at 20°C limited to 50 µA/strip according to the following parameters: 1h at 150 V, 2h at 500 V, 6h 500-1000 V, 3h 1000-8000 V and 8000 V until 20000 Vhr. Prior to second dimension, the IPG strips were reduced and alkylated for 20 min with 1% (w/v) DTT and afterwards with 2.5% (w/v) iodoacetamide in 5 mL equilibration buffer [75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6 M Urea, 30% (w/v) glycerol, 2% SDS and traces of bromophenol blue], respectively. After equilibration, the strips were juxtaposed to 12.5% lab cast SDS-PAGE gels on a PROTEAN II xi Cell (Bio-Rad, USA) system. Proteins were separated initially at 2 W/gel (2h) and then at 6 W/gel (limited to 200 V) until the dye marker reached the end of the gel.

Proteins were visualized by Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) staining. Each gel image was acquired using the GS-800 calibrated imaging densitometer (Bio-Rad, USA). CBB stained 2-DE gels were analysed with PDQuest software (Bio-Rad, USA) to determine the number of protein spots per gel.

2-DE gels from the two groups (*T. atroviride* T17 grown in the presence of 1% glucose or in the presence of *G. citricarpa*) were compared by a Mann-Whitney Signed Rank Test ( $p$  value  $\leq 0.05$ ). Only the significantly different spots were retained for identification, taking into account a cut-off of twofold increase or decrease in spot intensity. Spots absent in either the control group or the *G. citricarpa* induced group were also included for identification.

### **Tryptic digestion, mass spectrometry analysis and protein identification**

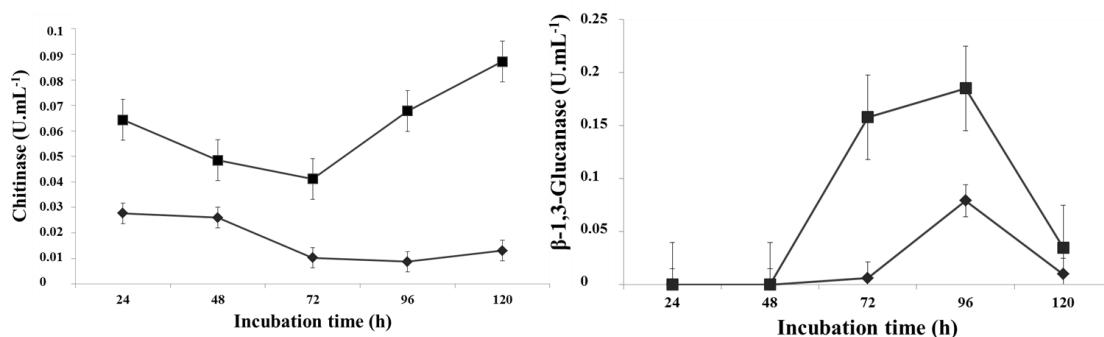
Tryptic digestion was performed according to Carvalhais et al. (2015). Protein spots were excised from the gel using a pipette tip. The gel pieces were washed three times with 25 mM ammonium bicarbonate/50 % ACN, one time with ACN and dried in a SpeedVac (Thermo Savant). Twenty five  $\mu$ L of 10 $\mu$ g/mL sequence grade modified bovine trypsin (ABSCIEX) in 25mM ammonium bicarbonate was added to the dried gel pieces and the samples were incubated overnight at 37°C. Extraction of tryptic peptides was performed by addition of 10% of formic acid (FA)/50% ACN three times being lyophilized in a SpeedVac (Thermo Savant). Tryptic peptides were resuspended in 10  $\mu$ L of a 50% acetonitrile/0.1% formic acid solution. The samples were mixed (1:1) with a matrix consisting of a saturated solution of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid prepared in 50% acetonitrile/0.1% formic acid. Aliquots of samples (0.5  $\mu$ L) were spotted onto the MALDI sample target plate. Peptide mass spectra were obtained on a MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (4800 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, Europe) in the positive ion reflector mode. Spectra were obtained in the mass range between 1000 and 4000 Da with ca. 900 laser shots. For each sample spot, a data dependent acquisition method was created to select the 5 most intense peaks, excluding those from the matrix, trypsin autolysis, or acrylamide peaks, for subsequent MS/MS data acquisition. Spectra were processed and analyzed by the Global Protein Server Workstation (Applied Biosystems), which uses internal MASCOT software (v2.1.0 Matrix Science, London, UK) on searching the peptide mass fingerprints and MS/MS data. NCBI protein sequence database (October 2014) was used for all searches under taxonomy of fungi and *Trichoderma*. Database search parameters as follows: carbamidomethylation and propionamide of cysteine as a variable modification as well as oxidation of methionine, and the allowance for up to two missed tryptic cleavages. The peptide mass tolerance was 25 ppm and fragment ion mass tolerance was 0.3 Da. Positive identifications were accepted up to 95% of confidence level. Since the identification relied in MS/MS data by homology, positive identifications were accepted when *b*- or *y*- series were covered by at least 4 ion fragments in sequential.

The location of extracellular proteins was predicted using BaCelLo predictor (Pierleoni et al. 2006) and the theoretical pI searched with Compute pI/MW tool available on ExpASy (Gasteiger et al. 2005).

## Results and discussion

Despite the considerable interest in the identification of important enzymes in mycoparasitism relationships, no studies had been carried out, until now, to identify the production of chitinases or glucanases by *T. atroviride* in the presence *G. citricarpa*.

The activity of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase of *T. atroviride* T17 in medium containing glucose and *G. citricarpa* inactivated mycelium as sources of carbon was measured for 120h after inoculation. Figure 1 shows that the presence of inactivated mycelium of the pathogen induces differences in secretion (higher activity) of these enzymes (Fig.1).



**Figure 1.** Enzymatic activity of the secretome of *T. atroviride* T17 grown on 1% glucose (♦) and on the presence of 1% of mycelium of *G. citricarpa* as carbon source (■). A – Chitinase activity. B -  $\beta$ -1,3-glucanase activity.

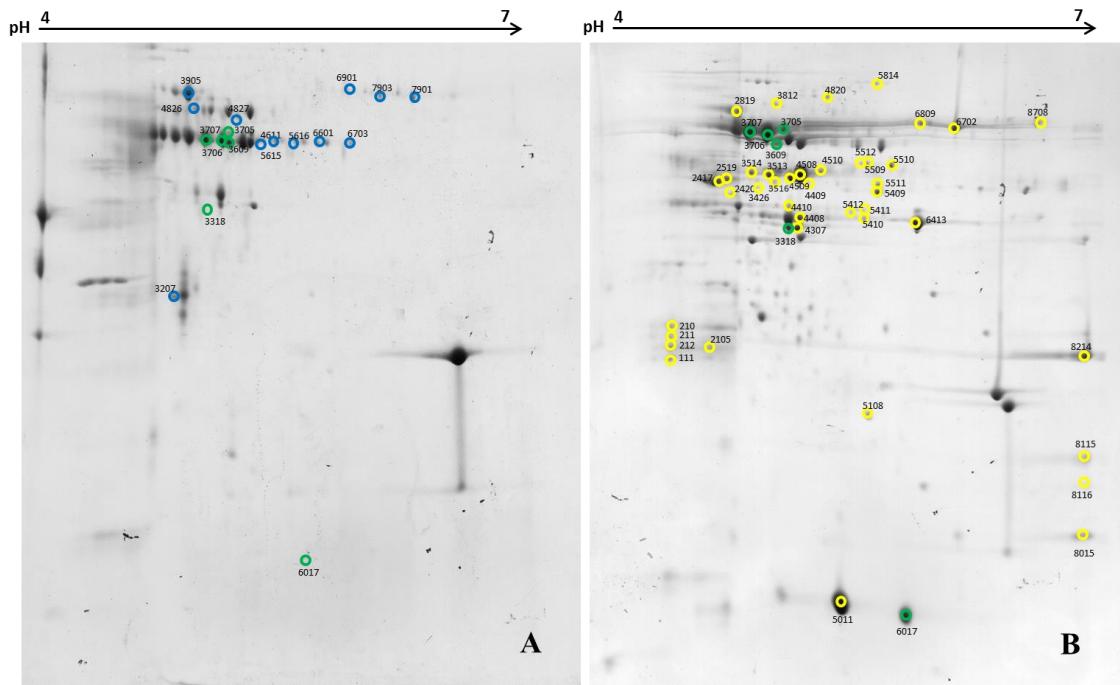
These results are similar to those described by Giese et al. (2003), which reported that the production of chitinases and glucanases by *T. harzianum* and *T. asperellum* increased significantly when cell walls of *Pythium* sp., *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* were used as the sole carbon source. These results suggest that the regulation of the expression of  $\beta$ -1,3-glucanase in these fungi can be influenced by the amount and complexity of the of  $\beta$ -glucans present in the culture medium, which acts as an agent of growth inhibitor of the pathogenic fungi.

Fungal cell walls are composed mainly by  $\beta$ -1,3 and 1,6-glucans (polymers of glucose) linked to chitin (polymer GlcNAc) via  $\beta$ -1,4 bonds. This complex chitin/glucan is linked to other polysaccharides whose composition varies with the species (galactomannan, mannan and galactosamine galactan). These polysaccharides constitute 80-85% of the mass of cell wall while glycoproteins constitute the remaining 15-20% (Latgé 2007, 2010). Accordingly, Rana et al. (2012) reported that chitinases are constitutively produced by mycoparasites. Gajera et al. (2012) also reported high

chitinase activity of *Trichoderma* sp. antagonism of *Aspergillus niger*. Glucanases have also been suggested to be involved in mycoparasitism processes by species of *Trichoderma* (Viterbo et al. 2002). *In vitro* studies showed that a 78 kDa glucanase of *Trichoderma*, in synergism with an endochitinase of 43 kDa, inhibit the growth of *Sclerotium rolfsii*. Marcello et al. (2010), evaluated the activity of a *T. asperellum*  $\beta$ -1,3 glucanase depends on the carbon source (glucose, starch, chitin, chitosan, or cell walls of *Rhizoctoni solani*). The higher specific enzymatic activity was detected in the extracellular medium of the fungus grown in the presence of starch ( $0.020 \text{ U.mL}^{-1}$ ) and cell walls of *R. solani* ( $0.013 \text{ U.mL}^{-1}$ ), which suggested that there is induction of this with the increase of the complexity of the carbon source. But the complexity of the carbon source accounts not only for the induction of enzymatic activity but also for the specificity of the pathogen/biocontrol agent (Monteiro et al. 2010).

The induction of these hydrolytic activities (chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase) suggests that these enzymes may be involved in the mycoparasitism process by *T. atroviride* T17 against *G. citricarpa*, assisting in the control of this disease. Many studies have reported the fact that chitin and  $\beta$ -1,3-glucans are structural components of the fungal cell wall, suggesting that chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanases produced by *Trichoderma* are the key pieces of cell lysis enzymes during mycoparasitic action (Kullnig et al. 2000, Kubicek et al. 2001, Mohamed et al. 2010). But surely other enzymes are involved. To clarify the involvement of other proteins in the mycoparasitism mechanism, we analyzed the secretome of *T. atroviride* T17 by proteomics (Mota et al. 2016, Souza et al., 2016).

The combination of bi-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry is a powerful approach for proteomics studies and has already been used for characterizing filamentous fungi (Monteiro et al. 2010, Do Vale et al. 2012, Ramada et al. 2015). In our study, the analysis of 2-DE gels showed an up-regulation of proteins secreted by *T. atroviride* T17 when exposed to the pathogen inactivated mycelium ( $166 \pm 23$  spots), in opposition to the control medium ( $78 \pm 8$  spots). From these, 116 secreted spots were differentially expressed and it was possible to identify 59 unique proteins (Fig.2).



**Figure 2.** Bi-dimensional average gels of control (A) and *G. citricarpa* induction (B) secretomes of *T. atroviride* T17. Five biological replicates were used for each condition. Gels were stained with CBB-250. Protein spots identified in blue are exclusive of control; in green were up-regulated in the presence of *G. citricarpa* and in yellow are exclusive of *G. citricarpa* induction. The identifications are summarized in Table 1.

**Table 1.** Summary of the extracellular proteins identified in *T. atroviride* control medium and in the presence of *G. citricarpa*. Theoretical pI and MW were determined with Compute pI/Mw tool available at ExPASy and the subcellular localization deduced with BaCelLo. GH stands for glycoside hydrolase.

**Spots exclusive of the secretome of *T. atroviride* grown in the presence of *G. citricarpa***

Spot	Protein	Acession number	Function	Subcellular localization	Theoretical Mw (Da)	Theoretical pI
8708	GH family 3	G9P180	mycoparasitism	Extracellular	76464.4	6.07
5509	Carboxylic ester hydrolase	G9N561	mycoparasitism	Extracellular	59907.1	6.10
5510	Carboxylic ester hydrolase	G9NG36	mycoparasitism	Cytoplasmic	59164.9	5.95
3516/ 4409/ 4508/ 4510/ 5409/ 5511	GH family 54	G9NYH4	mycoparasitism	Extracellular	53069.2	5.19
4408/ 4410	Acid phosphatase	A0A024SJA0	mycoparasitism	Extracellular	47788.1	5.59
4307	Chitinase	Q1KPW0	mycoparasitism	Extracellular	46268.4	5.03
111/21 0/ 211/21 2	GH family 76	G9P117	mycoparasitism	Extracellular	43550.3	4.75
2105	GH family 93	G9P982	mycoparasitism	Extracellular	39240.4	5.08

<b>8015</b>	Putative N,O-diacetyl muranidase	A0A024RV44	mycoparasitism	Extracellular	24264.9	5.87
<b>2420</b>	GH family 43	G9P8J0	mycoparasitism	Extracellular	48895.3	4.98
<b>6702/6809</b>	Glucan 1,3-beta-glucosidase	Q9P491	biological control	Extracellular	81896.3	5.41
<b>5512</b>	Uncharacterized protein	G9NXA4	biological control	Extracellular	69200.7	5.42
<b>2417/2519</b>	Alpha-1,2-Mannosidase	G9P5N3	biological control	Extracellular	56116.1	4.87
<b>3513/3426/4509</b>	Alpha-galactosidase	G9NGV2	biological control	Extracellular	47187.8	5.12
<b>8115</b>	Neutral protease 2	G9NZY0	biological control	Extracellular	36149.3	5.98
<b>5410/5411/5412/6413</b>	Uncharacterized protein	G9P8Z8	plant defense	Extracellular	47248.9	5.99
<b>3514</b>	Alpha-1,3-glucanase	A5X8W2	mycoparasitism /biological control	Extracellular	67482.8	5.07
<b>5814</b>	Uncharacterized protein (fragment)	G9NV71	metabolism	Extracellular	153133.6	6.23
<b>4820</b>	Uncharacterized protein	G9NHF4	metabolism	Extracellular	76838.1	5.63
<b>3812</b>	Glucoamylase	G9P135	metabolism	Extracellular	68596.6	5.00
<b>8214</b>	Uncharacterized protein	G9P6E2	metabolism	Extracellular	42271.1	6.40
<b>8116</b>	Uncharacterized protein	G9NM07	metabolism	Extracellular	25425.4	5.49
<b>2819</b>	Uncharacterized protein	G9NXU1	-	Extracellular	79319.9	4.99
<b>5108</b>	Uncharacterized protein	G9NH60	-	Extracellular	37291.4	5.13
<b>5011</b>	Uncharacterized protein	G9P426	-	Extracellular	24931.0	5.19

#### Spots exclusive of control medium

<b>6703</b>	Glucan 1,3-beta-glucosidase	Q9P491	biological control	Extracellular	81896.3	5.41
<b>3905/4826</b>	Glucoamylase	G9P135	metabolism	Extracellular	68596.6	5.00
<b>6901/7901/7903</b>	Uncharacterized protein	G9NX29	metabolism	Extracellular	62517.1	5.70
<b>4827</b>	Uncharacterized protein	G9NEQ8	metabolism	Extracellular	58376.1	5.19
<b>4611/5615/5616/6601</b>	Uncharacterized protein	G9P8Z2	metabolism	Extracellular	48158.6	5.64
<b>3207</b>	GH family 16	G9NV80	metabolism	Extracellular	30180.1	4.87

#### Spots more expressed in the medium with deactivated *G. citricarpa* mycelium

<b>3706/3707</b>	Mutanase	Q5GQ79	mycoparasitism	Extracellular	67616.0	5.13
<b>3705</b>	Glucan 1,3-beta-glucosidase	Q9P491	biological control	Extracellular	81896.3	5.41
<b>6017</b>	Carbohydrate-binding module family 13	G9NP07	mycoparasitism /biological control	Extracellular	15780.5	9.30
<b>3609</b>	Glucoamylase	G9NJG0	metabolism	Extracellular	66692.4	5.43
<b>3318</b>	Putative phospholipase C	G9NVB6	metabolism	Extracellular	69262.5	5.04

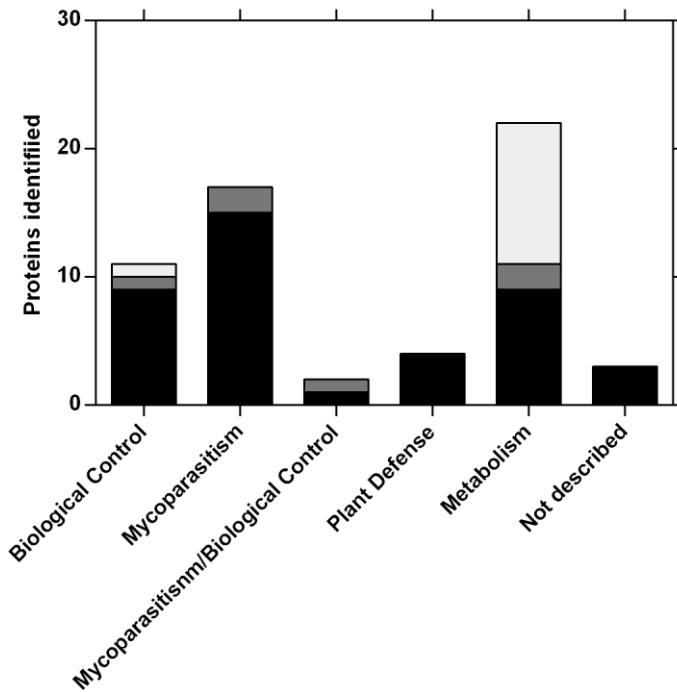
Of the 59 identified proteins (table 1), 41 were present in the medium containing *G. citricarpa* inactivated mycelium and 18 proteins were secreted by *T. atroviride* in the control medium. All proteins identified were deduced to be extracellular (localization was determined using the BaCeLlo tool, Table 1).

Multiple forms of the same enzyme were observed in the secretome of *T. atroviride* T17. According to Mahajan and Master (2010) this is a phenomenon that is frequently observed when fungal secretomes are analysed by 2-DE. Similar results were observed by Gómez-Mendoza et al. (2014) in the secretome of *T. harzianum* cultivated on different substrates (glucose, cellulose, xylan, and sugarcane bagasse). Some authors reported that this variation is possibly a result of differential splicing of mRNA, and post-translational modifications such as glycosylation (Subramaniyan and Prema 2002, Polizeli et al. 2005).

Most of the proteins overexpressed by *T. atroviride* (70.1%) exposed to the pathogen inactivated mycelium are related to mycoparasitism processes, biological control or induction of plant protection responses (Fig. 3,4, Table 1). Proteins from the glycoside hydrolase families (CAZy nomenclature) 3, 43, 76 and 93 were detected only in the medium containing mycelium of *G. citricarpa*, while GH16 and GH54 were found in both media tested. The presence of chitinase (Q1KPW0) and of endoglucanases (Q9P491) were confirmed, and putative N,O-diacetyl muramidase (A0A024RV44), neutral protease 2 (deuterolysin, G9NZY0),  $\alpha$ -1,2-mannosidase (G9P5N3), and  $\alpha$ -1,3-glucanase (A5X8W2) were detected exclusively in medium containing the pathogen (Table 1).

According to Atanasova et al. (2013) glycoside hydrolase families act mainly as degrading enzymes of fungal cell walls. The secretion of these enzymes by *Trichoderma* was already described as having a central role in the process of mycoparasitism. Our data support the reports of Atanasova: a larger representation of GH enzymes in the medium containing the mycelium of pathogen *Rhizoctonia solani* (22.3% of identified proteins) than in the medium containing only glucose (1.7% of all identified proteins).

In medium containing 1% glucose as carbon source, we found mostly proteins related to *T. atroviride* primary metabolism (glucoamylase, glycoside hydrolase family 16 and some uncharacterized protein), representing 91.7% of the identified proteins (Fig. 3, Table 1).



**Figure 3.** Annotation of the proteins secreted by *T. atroviride*: exclusive of medium with 1% mycelium of *G. citricarpa* (black bars), exclusive of control medium (light grey bars), or up-regulated in medium with fungal mycelium (medium grey bars).

Only 10% of the identified proteins were observed in both media, with higher expression in medium containing mycelium of *G. citricarpa* (Fig. 3, Table 1): glucan 1,3-beta-glucosidase (Q9P491), mutanase (Q5GQ79), glucoamylase (G9NJG0), putative phospholipase C (G9NVB6) and carbohydrate-binding module family 13 (G9NP07), suggesting a constitutive expression of these enzymes. The presence of proteins related to biological control in the control medium is an indication that this species, even under control growth conditions, is able to secrete proteins that assist in the defense of the plant. This suggests an evolutionary adaptation of the fungal species to cooperation with its host, acting as an antagonist of potential pathogens. Similar results to those found in this study were reported by other authors who studied the secretion of proteins by *Trichoderma* grown in liquid culture containing autoclaved mycelium or cell walls of pathogenic fungi, like *R. solani*, *B. cinerea*, *F. solani* and *M. phaseolina* (Geremia et al. 1993, Goldman and Goldman 1998, Pozo et al. 2004, Almeida et al. 2007, Suárez et al. 2007, Tseng et al. 2008, Yang et al. 2009, Monteiro et al. 2010, Pereira et al. 2014), where the presence of a pathogen induced the secretion of proteins related to biological control.

Glycoside hydrolases represented 23.7% of all the proteins identified in the secretome *T. atroviride* T17 (total of both media) (table 1), corroborating the data of Druzhnina et al. (2012). These authors analyzed the composition and properties of the secretome of *T. reesei*, *T. atroviride* and *T. virens* and reported that glycoside hydrolases represented more than 12% of total secreted proteins. It has been shown that  $\beta$ -1,3-glycanases and chitinases, as well as glycoside hydrolases, and other proteases are synthesized by *Trichoderma* species under conditions which simulate the nutritional stress under mycoparasitism (Kubicek et al. 2001). According to Kubicek et al. (2011) the saprophytic behavior of *Trichoderma* spp. is evidenced by the large number of carbohydrate-active enzymes.

Studies using several carbon sources (Do Vale et al. 2012) showed that cellulose also induces an up-regulation of hydrolytic enzymes (chitinase, endo-N-acetylglucosaminidases, hexosaminidases, galactosidase, xylanase, exo-1,3-glucanase, endoglucanases, xylosidases,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, N-acetylhexosaminidases) by *T. harzianum*. According to these authors, the results highlight the importance of this fungus as a rich source of hydrolytic enzymes for bioconversion and biocontrol applications. The genomes of the mycoparasites *Trichoderma* spp. are rich in genes encoding enzymes such as chitinases and glucanases (Kubicek et al. 2011), which are induced by the cell walls of fungi (Duo-Chuan 2006, Viterbo et al. 2002). Recent studies have shown that inserting *Trichoderma* chitinase encoding genes into plants, leads to an increase of the resistance of these plants to a broad range of pathogenic ascomycetes and basidiomycetes (Stefani and Hamelin 2010).

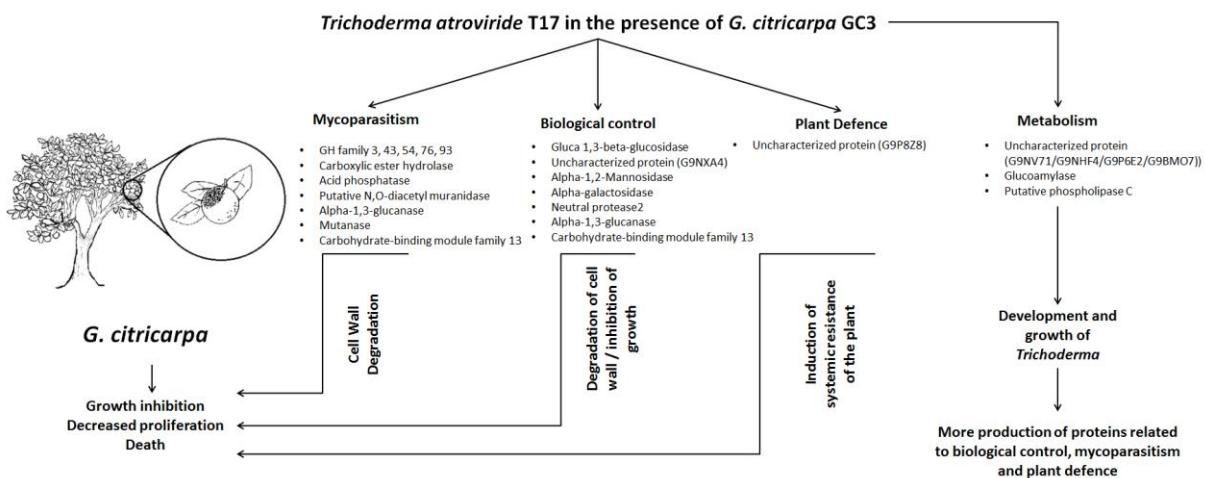
The neutral protease 2 (peptidase M35, a Zn<sup>2+</sup> metalloendopeptidase, G9NZY0), also known as deuterolisyn, belongs to the large arsenal of proteases described expressed by *Trichoderma* (Rawlings et al. 2012, Druzhinina et al. 2012). The large set of *Trichoderma* proteases offers an advantage to opportunistic species of *Trichoderma*, related not only to plant colonization but also to biological control. According to Rawlings et al. (2012), the total number of *T. atroviride* proteases is 3.85% of all predicted protein-coding genes. From these, around 20% of *Trichoderma* proteases have a signal peptide and therefore enter the secretory pathway. Carpenter et al. (2005) found incomplete sequences of metallo-endopeptidases expressed during the mycoparasitic interactions between *T. hamatum* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Until now it was observed that the proteomics response of *T. atroviride* varied qualitatively (expression

of different protein) when compared with other *Trichoderma* species, as well as with the use of other carbon sources. This justifies that although there is a large representation of proteases on the genome of *Trichoderma*, we did not find such an expression when *T. atroviride* was exposed to deactivated mycelium *G. citricarpa*. Besides the specificity related to the *Trichoderma*, the secretion of proteases is also controlled by the pH of the external medium, suggesting a pH dependent transcriptional response (Benítez et al. 2004). Seidl et al. (2009) also demonstrated that the *T. atroviride* attack to *R. solani* was accompanied by the expression of several families of extracellular proteases carriers and oligopeptides and amino acids. Thus, it is clear that proteases participate in the degradation of structural cell proteins destabilizing the cellular integrity of the phytopathogen and facilitating penetration and colonization of *Trichoderma*. Proteases are also involved in the inactivation of enzymes produced by plant pathogens during the infection process (Suárez et al. 2007). Despite its importance for mycoparasitism, the number of characterization studies, isolation and/or cloning of proteases is still low when compared to chitinase and  $\beta$ -1,3-glycanases related reports.

We have found that *T. atroviride* T17 expresses an acid phosphatase (A0A024SJA0) after being exposed to *G. citricarpa* inactivated mycelium (table 1). These enzymes are known for promoting the hydrolysis of the organic phosphate producing a soluble inorganic form of phosphate that is easily used by plants, assisting plant nutrition and growth. Microbial phosphatases have been described as the most efficient in the hydrolysis of phosphates when compared to plant phosphatases (Tarañdar et al. 2001). Many experiments have shown that fungi from the genus *Trichoderma* inhibit the growth and activity of mycorrhizal fungi, when in contact with pathogens (Martinez et al. 2003, McAllister et al. 1994). That is, in contact with phytopathogenic fungi, *Trichoderma* fails providing this acid phosphatase for the plant and directs it for pathogen control. Alpha-1,2-mannosidase plays an important role in processing manooligosaccharide from mannoproteins. This enzyme catalyzes the hydrolysis of the terminal alpha-D-glucosyl-(1,3)-D-mannosyl unit from the GlcMan<sub>9</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub> oligosaccharide component of the glycoproteins produced in the Golgi membrane. The enzyme also acts in the process of N-glycans newly formed and in the degradation of mature glycoproteins. *Trichoderma atroviride* T17 expresses an  $\alpha$ -mannosidase (G9P5N3) only in the medium containing pathogen inactivated mycelium. According to Schoffelmeer et al. (1999) these enzymes may also be related to the degradation of the

amorphous fraction of the cell walls of fungi, aiding with the deglycosylation of glycoproteins present in the cell wall of fungi. Similar results were observed by Mota et al. (2016) when *T. harzianum* was grown in the presence of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* or *F. solani* inactivated cell walls.

One important feature is that the presence of the pathogen mycelium stimulated the reduction of expression of proteins related to the metabolism simultaneously stimulating most secreted proteins involved in biological control of the pathogenic process and mycoparasitism, which suggests that the metabolic machinery of *T. atroviride* T17 is devoted to the attack of fungi (Fig. 4).



**Figure 4.** Schematic representation of biocontrol exerted by *T. atroviride* T17 over *Guignardia citricarpa* GC3.

Moreover, many species of *Trichoderma* are commercially produced: Tricodex® (*T. harzianum* Rifai strain T39) used in the control of the fungi causing post-harvest rot apple; Trichodermil® (*T. harzianum* based), acts on various pathogens of different cultures, (Ricard 1981, Melo 1998). Another compound, GlioGard® has as active agent *T. virens* and is used to prevent seedling damping-off caused by *Pythium* and *Rhizoctonia* species (Lumsden and Locke, 1989). A strain of *T. stromaticum* was incorporated in Tricovab® the biofungicide formulation for controlling witch's broom disease of cocoa since 1996.

Thus, studies have sought new efficient strains for biological control, as well as the use of enzymes in new biofungicides formulations. Hydrolytic enzymes capable of degrading the walls of the pathogens cells are also receiving special attention (Hermosa et al. 2000, Mohamed et al. 2010).

## **Conclusions**

The results indicate that the proteins secreted by *T. atroviride* T17 in the presence of *G. citricarpa* Gc3 inactivated mycelium are related to cell wall degradation (mycoparasitism), biological control and systemic resistance induction of the plant. Thus, the results support the use of this strain as a biological control agent against *G. citricarpa*. In addition, identified enzymes can prove useful in the formulation of new compounds with fungicidal activity more efficient and less aggressive to the environment and to producers.

It is never too much to emphasize the importance of evaluating the production and expression of enzymes for each pathogen of interest, since, as stated by González et al. (2011), the enzyme expression is influenced by the strain, culture conditions and the specificity of the cell wall of each pathogen assayed.

## **Acknowledgments**

This study was partially supported by FEDER funding through COMPETE program and by national funding through FCT within the research project ALIEN (PTDC/ AGR-PRO/2183/2014) and to CESAM (UID/AMB/50017/2013). The authors acknowledge FCT financing to A Alves (IF/00835/2013), AC Esteves (BPD/102572/2014) and C Felix (BD/97613/2013). F Lima acknowledges CAPES for the PhD scholarship to develop part of the research project: Proteomic analysis of *T. atroviride* and *Trichoderma harzianum* against *Guignardia citricarpa*, pathogenic agent of Black spot of Citrus at the University of Aveiro and FAPERGS for the PhD scholarship in Biotechnology at the University of Caxias do Sul (Brazil).

## **References**

- Adaskaveg, J.E., Förster, H., Sommer, N.F., 2010. Principles of post-harvest pathology and management of decays of edible horticultural crop. In: Kader, A.A. (Ed.). Postharvest technology of horticultural crops. Oakland: University of California Publication. 163-195.

Aguilar-Veldoso, C.I., Ribeiro, J.G.B., Feichtenberger, E., Goes, A., Spósito, M.B., 2002. Technical manual procedures of citrus black spot. Brasília: MAPA/DAS/DDIV, 72p. Brazil.

Ali, S.H., 2014. Social and Environmental Impact of the Rare Earth Industries. Resources 3; 123-134; doi:10.3390/resources3010123

Almeida, F.N., Cerqueira, F.M., Silva, R.M., Ulhoa, C.J., Lima, A.L., 2007. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*, evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. Biotechnol. Lett. 29: 1189-1193.

Alves, A., Correia, A., Luque, J., Phillips, A.J.L., 2004. *Botryosphaeria corticola*, sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph, *Diplodia mutila*. Mycologia 96: 598–613.

Atanasova, L., Crom, S.L., Gruber, S., Coupier, F., Seidl-Seiboth, V., Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S., 2013. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. BMC Genomics 14:121. doi:10.1186/1471-2164-14-121.

Bech, L., Busk, P.K., Lange, L., 2014. Cell wall degrading enzymes in *Trichoderma asperellum* grown on wheat bran. Fungal Genom. Biol. 4:116. doi: 10.4172/2165-8056.1000116.

Belete, E., Ayalew, A., Ahmed, S., 2015. Evaluation of local isolates of *Trichoderma* spp. against black root rot (*Fusarium solani*) on faba bean. J. Plant Pathol. Microb. 6(6): 279. doi:10.4172/2157-7471.1000279.

Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Códon, A.C., 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Internat. Microbiol. 7(4): 249–260.

Benhamou, N., Chet, I., 1996. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* 86(4):405-416.

Bernardo, E.R.A., Bettoli, W., 2010. Biocontrol and alternative products for managing citrus black spot in organic cropping systems. *Trop. Plant Pathol.* 35 (1): 37-42.

Carpenter, M.A., Stewart, A., Hidgway, H.J., 2005. Identification of novel *Trichoderma hamatum* genes expressed during mycoparasitism using subtractive hybridisation. *FEMS Microbiol. Lett.* 251: 105–112.

Carvalhais, V., Cerveira, F., Vilanova, M., Cerca, N., Vitorino, R., 2015. An immunoproteomic approach for characterization of dormancy within *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Mol. Immunol.* 65(2): 429–435.

Chet, I., Benhamou, N., Haran, S., 1998. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: *Trichoderma* and *Gliocladium* – enzymes, biological control and commercial applications (Harman, G.E.; Kubicek, C.P., eds). London, Taylor and Francis Ltda, 2: 153-172.

Do Vale, L.H.F., Gómez-Mendoza, D.P., Kim, M.S., Pandey, A., Ricart, C.A.O., Filho, E.X.F., Sousa, M.V., 2012. Secretome analysis of the fungus *Trichoderma harzianum* grown on cellulose. *Proteomics* 12 (17): 2716–2728.

Druzhinina, I.S., Shelest, S., Kubicek, C.P., 2012. Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. *FEMS Microbiol. Lett.* 337(1): 1–9.  
Duo-Chuan, L., 2006. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*. 161(6): 345-60.

El-Komy, M.H., Saleh, A.A., Eranthodi, A., Molan, Y.Y., 2015. Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. *Plant Patholol. J.* 31(1): 50-60.

Gajera, H.P., Vakharia, D.N., 2012. Production of lytic enzymes by *Trichoderma* isolates during in vitro antagonism with *Aspergillus niger*, the causal agent of collar rot of peanut. *Braz. J. Microbiol.* 43(1): 43-52.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M., Appel, R., Bairoch, A., 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker, J. (ed.). *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press. pp. 571–607.

Geremia, R.A., Goldman, G.H., Jacobs, D., Ardiles, W., Vila, S.B., Van Montag, M., Herrera-Estrela, A.M., 1993. Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, prb1, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol. Microbiol.* 8: 603-613.

Giese, E.C., Corradi Da Silva, M.L., Barbosa, A.M., 2003. Fungal glucanases: production and applications of  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -1,6-glucanases. *Rev. Bioteclol. Ciênc. Desenvol.* (30): 97-104.

Goldman, M.H.S., Goldman, G.H., 1998. *Trichoderma harzianum* transformant has high extracellular alkaline proteinase expression during specific mycoparasitic interactions. *Genet. Mol. Biol.* 21 (3): 1415-4757.

Gómez-Mendoza, D.P., Junqueira, M., Do Vale, L.H.F., Domont, G.B., Filho, E.X.F., Sousa, M.V., Ricart, C.A.O., 2014. Secretomic survey of *Trichoderma harzianum* grown on plant biomass substrates. *J. Proteome Res.* 13 (4): 1810–1822.

Gruber, S., Zeilinger, S., 2014. The Transcription Factor Ste12 Mediates the Regulatory Role of the Tmk1 MAP kinase in mycoparasitism and vegetative hyphal fusion in the filamentous fungus *Trichoderma atroviride*. *PLoS ONE* 9(10):e111636. doi:10.1371/journal.pone.0111636

Guimarães, A., 2008. Bioprospecção de microrganismos epífíticos de tangerina cv. Montenegrina para o Manejo da mancha preta dos citros causada por *Guignardia*

*citricarpa*, Kiely. 91f. Dissertação (Mestrado- Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Hermosa, M.R., Grondona, I., Iturriaga, E.A., Diaz-Minguez, J.M., Castro, C., Monte, E., Garcia-Acha, I., 2000. Molecular and characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. Appl. Environ. Microbiol. 66 (5): 1890-1989.

Hortifruti Brasil, 2012. *Citros: Sustentabilidade citrícola é desafiada pelos altos custos de produção*. CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Edição Especial. Ano 11, nº 112. 46p.

Inch, S., Walker, D.J., Gilbert, J., Daayf, F., Fernando, W.G.D., Piercey-Normore, M., 2011. The development of a model to predict the potential efficacy of *Trichoderma harzianum* isolates on perithecial production of *Gibberella zaeae* based on secondary metabolite production. Can. J. Plant Pathol. 33(3): 337-346.

Isaias, C.O., Martins da Silva, J.B.T., Da Silva, J.P., De Mello, S.C.M., 2014. Antagonistic action and bioactive metabolites of *Trichoderma* spp. against the pathogens *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae*. Summa Phytopathol. 40(1): 34-41.

Klotz, L.J., 1978. Fungal, bacterial, and nonparasitic diseases and injuries originating in the seedbed, nursery, and orchard. In: REUTHER, W.; CALAVAN, E.C.; CARMAN, G.E. (Ed.). The citrus industry. Riverside: University of California, v.4, p.1-66.

Kotasthane, A., Agrawal, T., Kushwah, R., Rahatkar, O.V., 2015. *In-vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* and their response towards growth of cucumber, bottle gourd and bitter gourd. Eur. J. Plant Pathol. 141(3): 523-543.

Kubicek, C.P., Mach, R.L., Peterbauer, C.K., Lorito, M., 2001. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. J. Plant Pathol. 83(2):11–23.

Kubicek, C.P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D.A., Druzhinina, I.S. et al. 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol.* 12:R40. doi: 10.1186/gb-2011-12-4-r40.

Kullnig, C., Mach, R.L., Lorito, M., Kubicek, C.P., 2000. Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma* ech 42 gene expression before mycoparasitic contact. *App. Environ. Microbiol.* 66(5):2232-2234.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685. doi:10.1038/227680a0

Lamdan, N.L., Shalaby, S., Ziv, T., Kenerly, C.M., Horwitz, B.A., 2015. Secretome of *Trichoderma* interacting with maize roots: role in induced systemic resistance. *Mol. & Cell. Proteomics* 14:1054-1063.

Latgé, J.P., 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol. Microbiol.* 66(2):279-290.

Latgé, J.P., 2010. Tasting the fungal cell Wall. *Cell. Microbiol.* 12(7): 863-872.

Lemos, M.F.L., Soares, A.M.V.M., Correia, A.C., Esteves, A.C., 2010. Proteins in ecotoxicology - how, why and why not? *Proteomics* 10(4), 873–887. doi: 10.1002/pmic.200900470

Lumsden, R.D., Locke, J.C., 1989. Biological control of damping-off caused by *Phytophthora ultimum* and *Rhizoctonia solani* in soilless mix. *Phytopathology* 79(3): 361-366.

McAllister, C.B., García-Romera, I., Godeas, A., Ocampo, J.A., 1994. Interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*: effects on plant growth, arbuscular mycorrhizas and the saprophyte inoculants. *Soil Biol. Biochem.* 26(10): 1363-1367.

Mahajan, S., Master, E.R., 2010. Proteomic characterization of lignocellulose-degrading enzymes secreted by *Phanerochaete carnosa* grown on spruce and microcrystalline cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86(6): 1903-14.

Marcello, C.M., Steindorff, A.S., Silva, S.P., Silva, R.N., Bataus, L.A.M., Ulhoa, C.J., 2010. Expression analysis of the exo- $\beta$ -1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiol. Res.* 165(1): 75-81.

Martinez, A., Obertello, M., Pardo A., Ocampo, J.A., Godeas, A., 2003. Interactions between *Trichoderma pseudokoningii* strains and the arbuscular fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. *Mycorrhiza* 14(2):79-84.

Martínez-Medina, A., Alguacil, M.D.M., Pascual, J.A., Wees, S.C.M.V., 2014. Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants. *J. Chem. Ecol.* 40 (7): 804-815.

Melo, I.S., 1998. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo, I. S., Azevedo, J. L. (Ed.) *Cont. Biol.* 1:17-30.

Miao, C.P., Mi, Q.L., Qiao, X.G., Zheng, Y.Z., Chen, Y.W., Xu, L.H., Guan, H.L., Zhao, L.X., 2015. Rhizospheric fungi of *Panax notoginseng*: diversity and antagonism to host phytopathogens. *J. Ginseng Res.* 1-8. doi: 10.1016/j.jgr.2015.06.004

Mohamed, H.A., Haggag, W.M., Attallah, A.G., 2010. Genetic enhancement of *Trichoderma viride* to over produce different hydrolytic enzymes and their biocontrol potentiality against root rot and white mold diseases in bean plants. *Agricult. Biol. J. North America* 1(3): 273-284.

Monteiro, V.N., Silva, R.N., Steindorf, A.S., Costa, F.T., Noronha, E.F., Ricart, C.A.O., Sousa, M.V., Vainstein, M.H., Ulhoa, C.J., 2010. New insights in *Trichoderma*

*harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. Curr. Microbiol. 61(4): 298-305.

Mota, P.R., Ribeiro, M.S., Georg, R.C., Silva, G.R., de Paula, R.G., Silva, R.N., Ulhoa, C.J. 2016. Expression analysis of the α-1,2-mannosidase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. Biological Control 95: 1–4.

Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W., 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie brilliant blue G-250 and R-250. Electrophoresis, 9: 255-262.

Neves, M.F., Trombim, V.G., Milan, P., Lopes, F.F., Cressoni, F., Kalak, R., 2010. O Retrato da Citricultura Brasileira. In: Neves, M. F. (Coord.). 1º ed. Ribeirão Preto: Markestrat, 138 p.

Noronha, E.F., Ulhoa, C.J., 1996. Purification and characterization of an endo β-1,3-glycanase from *Trichoderma harzianum*. Canad. J. Microbiol. 42(10):1039-1044.

Pandolfo, J.D., 2011. *Otimização do Manejo da pinta preta causada por Guignardia citricarpa Kiely na produção ecológica de tangerinas cv. Montenegrina sob a ótica da pesquisa participativa*. Tese (Doutorado em Fitotecnia: Fitopatologia). 177p. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Brazil.

Parmar, H.J., Hassan, M.M., Bodarl, N.P., Umrania, V.V., Patel, S.V., Lakhani, H.N., 2015. *In vitro* antagonism between phytopathogenic fungi *Sclerotium rolfsii* and *Trichoderma* strains. Int. J. App. Sci. Biotechnol. 3(1): 16-19.

Paul, I., Van Joarsveld, A.S., Korsten, L., Hattingh, V., 2005. The potential global geographical distribution of Citrus Black Spot caused by *Guignardia citricarpa* (Kiely): likelihood of disease establishment in the European Union. Crop Protection 24(4)297-308.

Pereira, J.L., Queiroz, R.M.L., Charneau, S.O., Felix, C.R., Ricart, C.A.O., da Silva, F.L., Steindorff, A.S., Ulhoa, C.J., Noronha, E.F., 2014. Analysis of *Phaseolus vulgaris* response to its association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the presence or absence of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. PLoS ONE 9(5): e98234.

Polizeli, M.L., Rizzatti, A.C., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Amorim, D.S., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. App. Microbiol. Biotechnol. 67(5): 577-91.

Pozo, M.J., Baek, J.M., Garcia, J.M., Henerley, C.M., 2004. Functional analysis of *tvsp1*, a serine protease-encoding gene in the biocontrol agent *Trichoderma virens*. Fungal Genet. Biol. 41: 336-348.

Rana, I.A., Loerz, H., Schaefer, W., Becker, D., 2012. Over expression of chitinase and chitosane genes from *Trichoderma harzianum* under constitutive and inducible promoters in order to increase disease resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). Mol. Plant Breeding 3(4): 37-44.

Ramada, M.H., Steindorff, A.S., Bloch, C. Jr, Ulhoa, C.J., 2015. Secretome analysis of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivated in different media supplemented with *Fusarium solani* cell wall or glucose. Proteomics. doi: 10.1002/pmic.201400546.

Rao, G.S., Reddy, N.N.R., Surekha, C.H., 2015. Induction of plant systemic resistance in legumes *Cajanus cajan*, *Vignaradiata*, *Vigna mungo* against plant pathogens *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata* – a *Trichoderma viride* mediated reprogramming of plant defense mechanism. Int. J. Recent Sci. Res. 6 (5): 4270-4280.

Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Bateman, A., 2012. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Research 40: D343–D50.

Reissig, J.L., Strominger, J.L., Leloir, L.F., 1957. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.* 217: 959- 966.

Ricard, J.L., 1981. Commercialization of *Trichoderma* based myco-fungicide, some problems and solutions. *Biocont. News Inform.* 2: 95-98.

Rodrigues, M.B.C., Spósito, M.B., Aguilar-Vildoso, C.I., Andreote, F.D., Araújo, W.L., Pizzirani-Kleiner, A.A., 2007. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta dos citros. *Pesq. Agropec. Bras.* 3(42): 323-327.

Salas-Marina, M.A., Isordia-Jasso, M., Islas-Osuna, M.A., Delgado-Sánchez, P., Jiménez-Bremont, J.F., Rodríguez-Kessler, M., Rosales-Saavedra, M.T., Herrera-Estrella, A., Casas-Flores, S., 2015. The Epl1 and Sm1 proteins from *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma virens* differentially modulate systemic disease resistance against different life style pathogens in *Solanum lycopersicum*. *Front. Plant Sci.* 6: (77). doi: 10.3389/fpls.2015.00077

Santos, J.M., Phillips, A.J.L., 2009. Resolving the complex of *Diaporthe (Phomopsis)* species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. *Fungal Diversity* 34: 111– 125

Sarmento, A. C., Lopes, H., Oliveira, C.S., Vitorino, R., Samyn, B., Sergeant, K., Barros, M.T., 2009. Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* L. *Planta* 230(2); 429–439. doi: 10.1007/s00425-009-0948-9

Schoffelmeer, E.A.M., Klis, F.M.J., Sietsma, H., Cornelissen, B.J.C., 1999. The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet. Biol.* 27:275-282.

Schubert, T.S., Dewdney, M.M., Peres, N.A., Palm, M.E., Jeyaprakash, A., Sutton, B., Mondal, S.N., Wang, N.Y., Rascoe, J., Picton, D.D., 2012. First report of citrus black spot caused by *Guignardia citricarpa* on sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] in North America. *Plant Disease* 96: 1225.

Seidl, V., Song, L., Lindquist, E., Gruber, S., Koptchinskiy, A., Zeilinger, S., Schmoll, M., Martínez, P., Sun, J., Grigoriev, I., Herrera-Estrella, A., Baker, S.E., Kubicek, C.P., 2009. Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. *BMC Genomics* 10:567. doi:10.1186/1471-2164-10-567

Singh, B.N., Singh, A., Singh, B.R., Singh, H.B., 2014. *Trichoderma harzianum* elicits induced resistance in sunflower challenged by *Rhizoctonia solani*. *J. App. Microbiol.* 116 (3): 654–666.

Souza, A.A., Leitão, V.O., Ramada, M.H., Mehdad, A., Georg, R.C., Ulhôa, C.J., Freitas, S.M. 2016. *Trichoderma harzianum* Produces a New Thermally Stable Acid Phosphatase, with Potential for Biotechnological Application. *PLoS ONE* 11(3): e0150455. doi:10.1371/journal.pone.0150455

Spósito, M.B., Bassanezi, R.B., Amorim, L., 2004. Resistência à mancha preta dos citros avaliada por curvas de progresso da doença. *Fitopatol. Bras.* 29: 532–537.

Stefani, F.O.P., Hamelin, R.C., 2010. Current state of genetically modified plant impact on target and non-target fungi. *Environ. Rev.* 18:441–475.

Strobel, G., 2006. *Muscador albus* and its biological promise. *J. Indus. Microbiol. Biotechnol.* 33: 514-522.

Suárez, M.B., Vizcaíno, J.A., Llobell, A., Monte, E., 2007. Characterization of genes encoding novel peptidases in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413 using the TrichoEST functional genomics approach. *Cur. Genetics* 51(5): 331-342.

Subramaniyan, S., Prema, P., 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critic. Rev. Biotechnol.* 22(1): 33-64.

Sutton, B.C., Waterson, J.M., 1966. *Descriptions of pathogenic fungi and bacteria* *Guignardia citricarpa*. Commonwealth Mycological Institute, n.85, 2p. Surrey, England.

Talla, S.G., Raju, A.S.R., Karri, S., Kumar,Y.S., 2015. Production and antagonistic effect of *Trichoderma* spp. against pathogenic microorganisms (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phasealina* and *Rhizoctonia solani*). Afric. J. Biotechnol. 14(8): 668-675.

Tarafdar, J.C., Yadav, R.S., Meena, S.C., 2001. Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. J. Plant Nutrit. Soil Sci. 164(3): 279-282.

Tseng, S.C., Liu, S.Y., Yang, H.H., Lo, C.T., Peng, K.C., 2008. Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* EST323 in response to *Rhizoctonia solani*. J. Agricul. Food Chem. 56: 6914-6922.

Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Graham, J.H., 2008. Compendium of citrus diseases. 2 nd. Ed., St. Paul: APS Press. 2000. In: Tseng, S.C.; Liu, S.Y.; Yang, H.H.; Lo, C.T.; Peng, K.C. Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* EST323 in response to *Rhizoctonia solani*. J. Agricul. Food Chem. 56: 6914-6922.

Trojan, R.F., Steindorff, A.S., Ramada, M.H.S., Arruda, W., Ulhoa, C.J., 2014. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. Biotechnol. Lett. 36 (10): 2095-2101.

White, T.J., Birns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds) PCR Protocols: A Guide to Methods and Amplifications. San Diego, California: Academic Press.Academic Press. p. 315-322.

Wijesinghe, C.J., Wijeratnam, R.S.W., Samarasekara, J.K.R.R., Wijesundera, R.L.C., 2011. Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple caused by (*Thielaviopsis paradoxa*). Crop Protection 30(3): 300–306.

Yang, H.H., Yang, S.L., Peng, K.C., Lo, C.T., Liu, S.Y., 2009. Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. Mycol. Res. 113: 924-932.

Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E.L., Lorito, M., Sivasethamparm, K., 2006. Major secondary metabolites strains active against different phytopathogens. Lett. App. Microbial. 43: 143-148.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M., 2008. *Trichoderma*-plant- pathogen interactions. Soil Biol. Biochem. 40(1): 1–10.

Vincent, D., Tan, K.C., Cassidy, L., Solomon, P.S., Oliver, R.P., 2012. Proteomic techniques for plant-fungal interactions. In Melvin D. Bolton and Bart P.H.J. Thomma (eds.), Plant Fungal Pathogens: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 835: 75-96, doi: 10.1007/978-1-61779-501-5\_5

Viterbo, A., Ramot, O., Chernin, L., Chet, I., 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. Antonie van Leeuwenhoek 81(1): 549–556.

Vos, C.M.F., De Cremer, K., Cammue, B.P.A., De Coninck, B., 2015. The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. Mol. Plant Pathol. 16(4): 400–412.

## CAPÍTULO 8 - Artigo submetido à *Journal of Proteomics*

### ***Trichoderma harzianum T1A constitutively secretes proteins involved in biological control of Guignardia citricarpa***

Fernanda Blauth de Lima<sup>1\*</sup>, Carina Félix<sup>2</sup>, Nádia Osório<sup>2</sup>, Artur Alves<sup>2</sup>, Rui Vitorino<sup>4,5</sup>, Pedro Domingues<sup>3</sup>, Rute. T. da Silva Ribeiro<sup>1</sup>, Ana Cristina Esteves<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>2</sup>Department of Biology and CESAM, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

<sup>3</sup>Department of Chemistry and QOPNA, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

<sup>4</sup>Department of Medical Sciences, Institute of Biomedicine – iBiMED, University of Aveiro, Aveiro, Portugal

<sup>5</sup>Department of Physiology and Cardiothoracic Surgery, Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal

\*Corresponding author:

Fernanda Lima

Department of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Street Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560, Rio Grande do Sul, Brazil

Telephone/ Fax: (+5554) 3218-2100

e-mail: nandalima85@gmail.com

## **Abstract**

*Guignardia citricarpa* is a fungal pathogen responsible for Citrus Black Spot disease, an important disease to the citrus industry. However, the studies that address the reduction or replacement of conventional fungicides for its control are scarce. *Trichoderma harzianum* is the most widely species used as a biological control agent, although there are no studies clarifying the mechanisms used by the antagonist in the control *G. citricarpa*. Therefore, the aim of the present study was to identify the extracellular proteins secreted by this fungus that are related to the control of *G. citricarpa*. Bidimensional electrophoresis (2D) was performed to obtain the patterns of proteins secreted by *T. harzianum* T1A in glucose medium (control) and in medium containing mycelium of *G. citricarpa* Gc3. From the 178 differentially significantly expressed spots, 65 proteins were identified by mass spectrometry. Of the proteins identified, 63.6 % were related not only to mycoparasitism, but also to plant defense response stimulation and biological control. Glycoside hydrolase families 2, 17, 31, 55, 71, 76, chitinase, mutanase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -1,3-exoglucanase,  $\beta$ -1,6-glucanase, L-amino acid oxidase, serine protease and Epl 1 protein, represent 54 % of the total proteins and are related to pathogen control. Our results show, for the first time, that *Trichoderma harzianum* T1A secretes proteins related to the control of Black Citrus disease, and induction of plant resistance, even in the absence of a pathogen challenge. When challenged by the pathogen, *T. harzianum* T1A reduces the total amount of secreted proteins, especially the proteins related to primary metabolism, but increases the secretion of proteins related to fungal interaction. This pattern explains the high potential of *T. harzianum* T1A as a biological control agent of *G. citricarpa*, which may help to reduce the use of fungicides currently applied to control the disease.

**Keywords:** Secretome analysis, Biological control, Plant resistance, Citrus Black Spot disease

## **Biological Significance**

This study gives an overview of the extracellular changes induced by the fungal pathogen *G. citricarpa* in *T. harzianum* T1A. Moreover, this study provides the first evidence that this strain constitutively expresses proteins that are involved in the control of fungal pathogens and in the induction of plant defenses, even in the absence of the fungal prey.

## **Highlights**

- The secretome of *T. harzianum* was evaluated before and after prey challenge.
- *T. harzianum* T1A is able to control *G. citricarpa* via mycoparasitism and oxidative stress.
- *T. harzianum* T1A is also able to induce plant defenses even in the absence of the prey.

## **Introduction**

*Trichoderma* is a saprophyte fungus with a worldwide distribution, commonly found in soil, cellulosic materials and also as a parasite of other fungi (Schuster and Schmoll 2010). *Trichoderma* species are recognized for their antagonist ability towards various pathogens: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* (Belete et al. 2015, El-Komy et al. 2015, Kotasthane et al. 2015, Rao et al. 2015, Talla et al. 2015, Vos et al. 2015). This feature has promoted an increase in the interest on these fungi. *Trichoderma harzianum* is one of the species most studied and used in biological control of various pathogenic fungi (*A. alternata*, *B. cinerea*, *Cochliobolus heterostrophus*, *F. oxysporum*, *R. solani*, *S. rolfsii*) and nematodes that cause losses in agriculture (Kotasthane et al. 2015, Lamdan et al. 2015, Rao et al. 2015, Salas-Marina et al. 2015).

Because of the concern surrounding food safety and the environmental impacts on agriculture, caused by the use of classic fungicides, biological control agents have

received increased recognition. The biological control agents are being used more often as a complement or replacement of agrochemicals (Whipps and Lumsden 2001, Wijesinghe et al. 2011, Martínez-Medina et al. 2014).

Some authors report that the secondary metabolites produced by *Trichoderma* with antifungal action as well as the mycoparasitism mechanisms, competition for space and nutrients and defense response induction and resistance in host plants are mechanisms that act synergistically (Sempere and Santamarina 2010). The ability of *Trichoderma* to control different plant pathogens is also due to the production and secretion of hydrolytic enzymes, and its rapid adaptation to adverse environments. Although a synergism occurs between the different mechanisms used by *Trichoderma*, mycoparasitism is considered the main mechanism of biocontrol (Kubicek et al. 2001, Gruber and Zeilinger 2014, Troian et al. 2014). In this mechanism there is the intervention of extracellular enzymes that degrade the cell wall of pathogenic fungi (Viterbo et al. 2002, Bech et al. 2014, Troian et al. 2014), especially chitinases, lipases, proteases and glucanases (Mohamed et al. 2010, Monteiro et al. 2010, Do Vale et al. 2012).

However, there are few studies about interaction between *Trichoderma* and *Guignardia citricarpa* (= *Phyllosticta citricarpa*), an important fungal pathogen for the citrus industry. This pathogen causes Citrus Black Spot disease. The disease does not damage the internal quality of the fruit, with symptoms restricted to flavedo (Aguilar-Vildoso et al. 2002) but it disables the *in natura* trade of fruits (Tseng 2008, Aguilar-Vildoso et al. 2002) with consequent economic losses. In severe attacks, *G. citricarpa* can cause premature fall, reducing plant productivity, with losses of up to 80 % (Klotz 1978, Spósito et al. 2004). The main way to control this disease is the use of fungicides (four to five sprays per season), reducing the outbreaks, but significantly increasing the cost of production and the environmental costs (Bernardo and Bettoli 2010). The growing concern about the environmental impacts of the disease caused by *G. citricarpa*, has stimulated the search for new effective methods to control this pathogen. It is aimed to replace or reduce fungicide applications and consequently lower costs in producing and exporting. Despite the recognized potential of *Trichoderma* as an effective biological control agent of plant pathogens (Inch et al. 2011, Wijesinghe et al. 2011, Martínez-Medina et al. 2014), there is a shortage number of studies of *Trichoderma* action on *G. citricarpa*, or about the mechanisms used by *Trichoderma* in

control of this phytopathogen. Among these, the studies involving these two fungi (antagonist/pathogen) of Guimarães (2008) and Pandolfo (2011) stand out, but only demonstrate that *Trichoderma* is effective in the control of this phytopathogen, without indicating the mechanisms used to control the antagonist. These authors reported the antagonist action of *T. koningii* towards *G. citricarpa* *in vitro*, suggesting *Trichoderma* as a potential biocontrol agent of Citrus Black Spot.

In this context, this paper aims to clarify the biocontrol mechanisms of *T. harzianum* T1A against *G. citricarpa*. The species *Trichoderma harzianum* was chosen because it is the most widely used *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases (Singh et al. 2014, Belete et al. 2015, El-Komy et al. 2015, Talla et al. 2015, Vos et al. 2015). This strain was selected due to its effect on *Guignardia*: the Biological Control Laboratory of Plant Diseases (University of Caxias do Sul, Brazil), in partnership with producers from the Vale do Caí-RS (Brazil), showed that strain T1A of *T. harzianum* is able to reduce on the symptoms of Citrus Black Spot in orchards (unpublished results). Due to the relevance of extracellular proteins in biocontrol mechanisms, we focused on the secretome to elucidate the mechanisms used by *T. harzianum* T1A as an antagonist of *G. citricarpa*.

## Materials and methods

### Cultivation and deactivation of *Guignardia citricarpa* Gc3

*Guignardia citricarpa* was cultured in Potato Dextrose Agar (PDA), for 20 days at 25 °C with controlled photoperiod (12/12h) Guimarães (2008). The mycelium was scraped off with a spatula and inoculated into 100 mL of Potato Dextrose Broth medium (PDB) for 10 days at 25 °C and 180 rpm. For deactivation, the mycelium was removed by filtration (Whatman No.1 paper) and rinsed with sterile distilled water, dried at 50 °C, ground in a mortar, aliquoted, autoclaved and stored in amber vials at -20 °C until use (Yang et al., 2009).

### Cultivation of *Trichoderma harzianum* T1A and extraction of extracellular proteins

*Trichoderma harzianum* T1A was grown on PDA for 5 days at 25 °C. The medium surface was washed with 2 mL of the NaCl solution 0.9 % (with sterile Drigalski handle), to obtain a suspension of  $1.10^6$  conidia.mL<sup>-1</sup>.

Into 98mL of minimum medium broth [in gL<sup>-1</sup>: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5.6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 27.6; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1.2; peptone, 4; urea, 1.2; de pH5.0, 1% (w/v) glucose and incubated at 25 °C for 72 h (180 rpm)], 2 mL of the conidial suspension were inoculated. Subsequently, mycelium was collected by filtration, washed with sterile distilled water and re-inoculated into 100mL MTV medium (in gl<sup>-1</sup>: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.4; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.3; urea, 0.3; CaCl<sub>2</sub>, 0.3; peptone, 1; 100 µL solution [FeSO<sub>4</sub>, 50 gL<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 15 gL<sup>-1</sup>; ZnSO<sub>4</sub>, 14 gL<sup>-1</sup>; CaCl<sub>2</sub>, 20 gL<sup>-1</sup>]) supplemented with: (1) 1% (w/w) glucose (control medium) or (2) 1% (w/w) mycelium of *G. citricarpa* (Tseng et al. 2008, Yang et al. 2009) and incubated at 25 °C (180rpm) for 24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 120 h.

### **Protein Extraction and Quantification**

The extracellular medium was collected by filtration (Whatman No.1 paper), aliquoted and stored at -80 °C until use. The protein extraction was made as described earlier by Fernandes et al. 2014 (method 1). All assays were made in quintupled.

Protein concentration was determined using the BCA kit from Thermo Scientific (Rockford, USA), according to the manufacturer's instructions, using Bovine Serum Albumin as standard. The procedure was performed in triplicate.

### **Determination of enzyme activity**

The quantification of the activities of chitinases and β-1,3-glucanases in the extracellular medium of *T. harzianum* was carried out according to Wang et al. 2002 and Noronha and Ulhoa 1996 (respectively).

### **Protein separation by 1D-electrophoresis**

With the intention of evaluate the quality of protein extraction, all samples were subjected to 1D-electrophoresis (SDS-PAGE) prior to separation by 2D-electrophoresis, as described by Esteves et al. (2014). Proteins were separated by 12.5 % SDS-PAGE, according to Laemmli (1970), in a Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad, USA), for 120 min at 120 V. Proteins were visualized by colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) staining (Neuhoff et al. 1988). According to Sarmento (2009), gel's images were acquired using the GS-800 calibrated imaging densitometer (Bio-Rad, USA).

## **Protein separation by 2D-electrophoresis**

This method was according to Fernandes et al. (2014). For 2D-electrophoresis, 150 µg of protein extract were loaded onto IPG strips (pH 4-7, 13 cm, GE Healthcare) that were actively rehydrated (50 V, 10 h, 20 °C) with 250 µL of rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris-base, 2% DTT, 2 % IPG buffer pH 4-7 NL and bromophenol blue). IEF was performed on a Ettan IPGphor 3 system (GE Healthcare, Sweden) at 20 °C limited to 50 µA/strip according to the following parameters: 1 h at 150 V, 2 h at 500 V, 6 h 500-1000 V, 3 h 1000-8000 V and 8000 V until 20000 Vhr. Prior to the second dimension, the IPG strips were reduced and alkylated for 20min with 1% (w/v) DTT and afterwards with 2.5% (w/v) iodoacetamide in 5 mL equilibration buffer [75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6 M Urea, 30% (w/v) glycerol, 2% SDS and traces of bromophenol blue], respectively. After equilibration, the strips were juxtaposed to 12.5% lab cast SDS-PAGE gels on a PROTEAN II xi Cell (Bio-Rad, USA) system. Proteins were separated initially at 2 W/gel (2 h) and then at 6 W/gel (limited to 200 V) until the dye marker reached the end of the gel.

Proteins were visualized by Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) staining. Gel images were acquired as described above using the GS-800 calibrated imaging densitometer (Bio-Rad, USA). Stained 2-DE gels were analysed with PDQuest software (Bio-Rad, USA) to determine the number and intensity of protein spots per gel.

2D gels from the two groups (*T. harzianum* T1A grown in control medium or in the presence of *G. citricarpa*) were compared by a Mann-Whitney Signed Rank Test (*p* value ≤ 0.05). Only the significantly different spots were retained for identification, taking into account a cut-off of twofold increase or decrease in spot intensity. Spots absent in either the control group or the *G. citricarpa* induced group were also included for identification.

## **Tryptic digestion, mass spectrometry analysis and protein identification**

2DE differentially expressed spots were manual excised from gels and prepared for tryptic digestion. Briefly, after excision, spots were destained, reduced with 10mM DTT, alkylated with 55mM iodoacetamide and dried in a Speed Vac. Gel pieces were then rehydrated with ABC buffer (50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) containing trypsin (10µg/mL; TPCK modified Trypsin, ABSCIEX) and incubated overnight at 37°C. Extraction was

performed with formic acid and acetonitrile and the supernatant containing tryptic peptides was dried in a Speed Vac. Protein identification was done by mass spectrometry using a 4800 MALDI-TOF/TOF (ABSCIEX, Foster City, CA) in both MS and MS/MS mode. Positively charged ions were analyzed in the reflectron mode over the *m/z* range of 800–4000 Da. Four precursors from each MS spectrum were selected automatically for MS/MS analysis. Using collision-induced dissociation assisted with air and with energy of 2 kV. Raw spectra were processed and analyzed by the Global Protein Server Workstation (Applied Biosystems), which uses internal MASCOT software (v2.1.0 Matrix Science, London, UK) on searching the peptide mass fingerprints and MS/MS data. NCBI protein sequence database (October 2014) was used for all searches under taxonomy of *Trichoderma*. Database search parameters were as follows: carbamidomethylation and propionamide of cysteine as a variable modification as well as oxidation of methionine, and the allowance for up to two missed tryptic cleavages. Mass tolerance was defined as 30 ppm for peptide and 0.3 Da for fragment ion. Criteria for positive identifications rely on up to 95 % of confidence level and in case of one peptide, it must contain b- or y- series covered by at least 4 ion fragments in sequential.

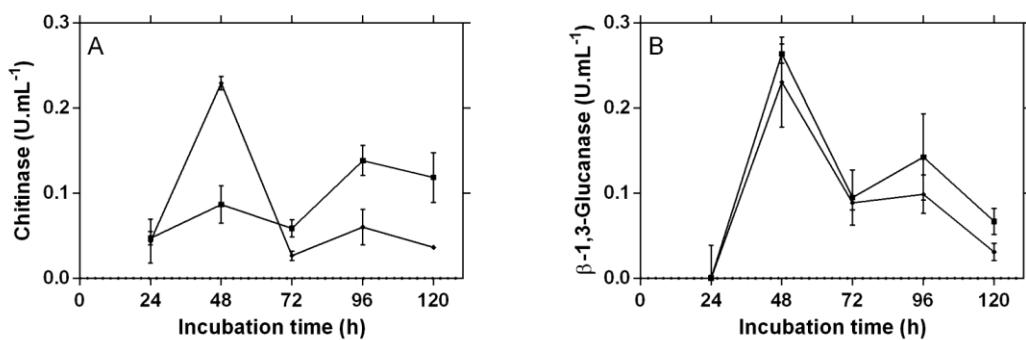
The location of extracellular proteins was predicted using BaCelLo predictor (Pierloni et al. 2006) as described earlier (Fernandes et al., 2014) and the theoretical pI searched with Compute pI/Mw tool available on ExpASy (Gasteiger et al. 2005).

## Results and Discussion

We evaluated the chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase activities of *T. harzianum* grown in media containing glucose or mycelium of *G. citricarpa* as carbon sources. The relevance of these enzymes in mycoparasitism mechanisms (Rana et al. 2012, Viterbo et al. 2002) is related to the fact that fungal cell walls are mainly composed of chitin-glycan complexes ( $\beta$ -1,3/ $\beta$ -1,6-glycans and chitin), linked to other polysaccharides (galactomannan, mannan and galactosamine galactan) (Latgé 2007, 2010).

The highest chitinase activity was detected after 48h of incubation in control medium (Fig. 1A). Afterwards, a decrease of chitinase activity was observed. An opposite pattern, with an increase in the activity after 72 h of incubation, was found for *T. harzianum* grown in the presence of the pathogen mycelium (Fig. 1A). The activity of

$\beta$ -1,3-glucanase was similar in the two media tested, with higher expression in the early hours of growth (Fig. 1B), suggesting that the production of this enzyme is mainly destined for the primary metabolism of *T. harzianum*. Nonetheless, the increase on the activity detected after 72h of incubation (in the presence of *G. citricarpa* mycelium) may be related to the degradation of the cell wall of the pathogen. Concerning chitinases activity, the results suggest that *T. harzianum* uses chitin for its growth and metabolism. But, the presence of the mycelium of *G. citricarpa* leads to an increase of the chitinase activity by *Trichoderma*, which contributes for the degradation of the cell walls of the pathogen.

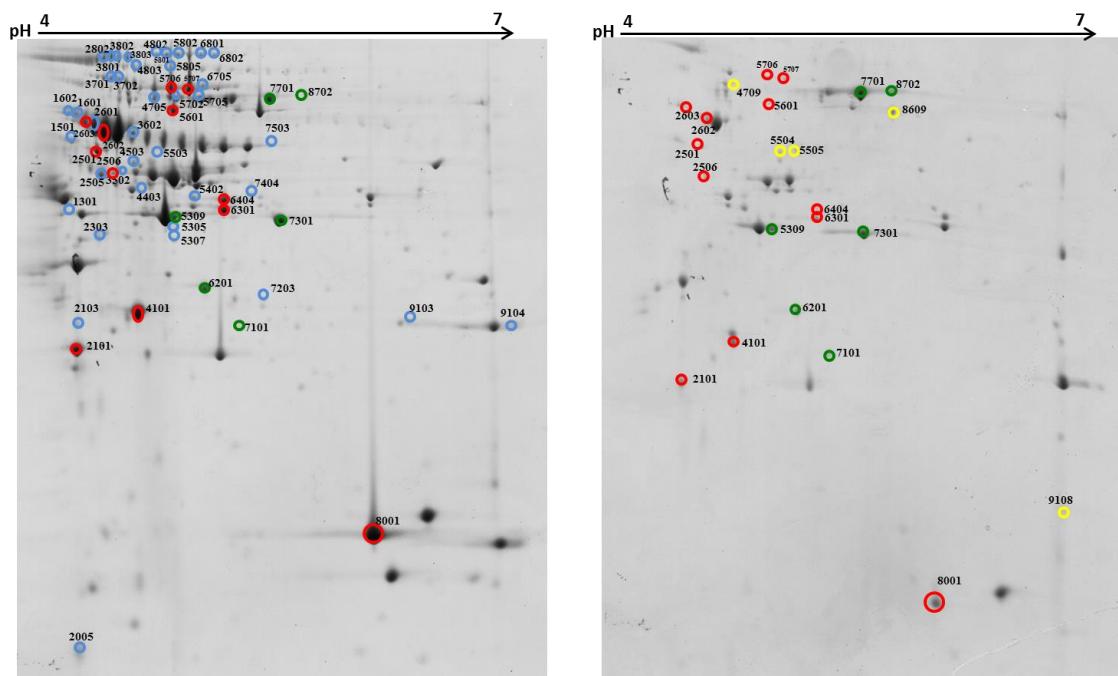


**Figure 1.** Enzymatic activity of the secretome of *T. harzianum* T1A grown on control medium [1% glucose (◆)] and on the presence of 1% of mycelium of *G. citricarpa* as carbon source (■). A – Chitinase activity. B -  $\beta$ -1,3-glucanase activity.

An approach based on 2D gel electrophoresis (2-DE) was selected for the analysis of the secretome of *T. harzianum* since this approach was already validated for filamentous fungi (Fernandes et al. 2014). For comparison purposes, protein extraction was carried out after 72 h of growth according to Tseng et al. (2008) and Yang et al. (2009). Furthermore, our data shows that after 72h, *T. harzianum* T1A shows the highest inhibition ratio of *G. citricarpa* *in vitro* (data not shown).

The analysis of 2-DE gels showed a general down-regulation of proteins secreted by *T. harzianum* T1A grown in the presence of *G. citricarpa* ( $144 \pm 11$  spots) when compared to the control medium ( $352 \pm 39$  spots). 178 spots were differentially secreted by *T. harzianum* T1A for the two tested carbon sources analyzed. From these, 65 proteins were identified by mass spectrometry (Fig. 2 and Table 1). We observed that

some proteins secreted by *T. harzianum* T1A were present as multiple spots [putative L-amino acid oxidase (Q8TFF5), beta-1,3 exoglucanases (O14402, A9YZW0), GH family 71 (G9MR60), mutanase (F2YBR1), GH family 31 (G9MQS0), GH family 17 (G9MZ09), beta-glucosidase (G9MUM1, G9NS06), glucoamylase (Q599K8) and putative alpha-1,2-mannosidase (A0A024SAZ5)], which is a phenomenon detected frequently in proteomic analysis by 2-DE (Mahajan & Master, 2010; Gómez-Mendonza et al., 2014), possibly as result of post-translational modifications of mRNA (such as glycosylation).



**Figure 2.** 2D average gels of control (A) and *G. citricarpa* induced (B) secretomes of *T. harzianum* T1A. Five biological replicates were used for each condition. Gels were stained with CBB-250. Protein spots identified in blue are exclusive of control; in green were up-regulated in the presence of *G. citricarpa*; in red were down-regulated in the presence of *G. citricarpa* and in yellow are exclusive of *G. citricarpa* induction. The identifications are summarized in Table 1.

**Table 1.** Summary of the extracellular proteins identified in *T. harzianum* T1A control medium and in the presence of *G. citricarpa*. Theoretical pI and MW were determined with Compute pI/Mw tool (ExPASy) and the subcellular localization deduced with BaCelLo. The fold changes (spots differentially expressed by *T. harzianum* T1A in control medium and in the presence of *G. citricarpa*) were determined by PDQuest software (*p* value <0.05). The fold changes (spots differentially expressed by *T. harzianum* T1A in the presence of *G. citricarpa*) were determined by PDQuest software (*p* value <0.05).

Spot	Proteins	Accession Number	Nº of Peptides	Protein Score	Protein Score C. I. %	MW (kDa)	Function	Fold change
9108	Endo-1,4-beta-xylanase	P48793	7	186	100	20703.4	xylan catabolic process	a)
5505	Putative L-amino acid oxidase	Q8TFF5	7	68	100	50201.4	oxidoreductase activity	a)
5504	Putative L-amino acid oxidase	Q8TFF5	5	149	100	50201.4	oxidoreductase activity	a)
8609	Mutanase	F2YBR1	8	112	100	67638.3	glucan 1,3-alpha-glucosidase activity	a)
4709	Uncharacterized protein	G9MPP2	8	139	100	79651.9	-	a)
5805	Beta-1,3-exoglucanase (Fragment)	Q86ZP7	11	69	100	85935.7	glucan exo-1,3-beta-glucosidase activity	b)
3801	Beta 1,3 exoglucanase	A9YZW0	4	75	100	107938.5	glucan exo-1,3-beta-glucosidase activity	b)
3802	Beta-1,3 exoglucanase	O14402	4	68	100	107912.5	glucan exo-1,3-beta-glucosidase activity	b)
3803	Beta 1,3 exoglucanase	A9YZW0	4	109	100	107912.5	glucan exo-1,3-beta-glucosidase activity	b)
4803	Beta 1,3 exoglucanase	A9YZW0	2	122	100	107938.5	glucan exo-1,3-beta-glucosidase activity	b)
6705	Beta 1,3 exoglucanase	A9YZW0	2	75	100	107938.5	glucan exo-1,3-beta-glucosidase activity	b)
1301	Beta-1,6-glucanase	B9VQ17	4	145	100	51862.3	glucosylceramidase activity	b)
4503	Glycoside hydrolase family 71	G9MR60	4	95	100	46479.1	hydrolase activity	b)
5503	Glycoside hydrolase family 71	G9MR60	4	112	100	46479.1	hydrolase activity	b)
9104	Serine endopeptidase	A4V8W7	4	70	100	42479.2	serine-type endopeptidase activity	b)

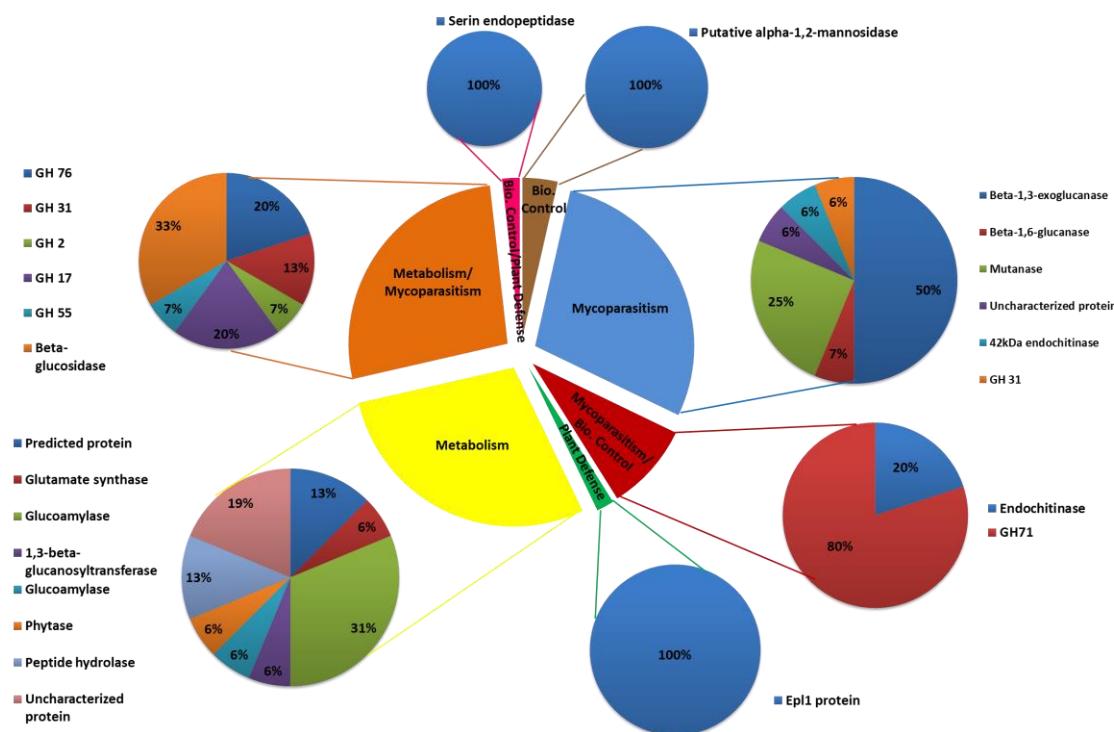
4705	Mutanase	F2YBR1	12	178	100	67638.3	glucan 1,3-alpha-glucosidase activity	b)
5702	Mutanase	F2YBR1	10	108	100	67638.3	glucan 1,3-alpha-glucosidase activity	b)
2103	Glycoside hydrolase family 76	G9MSS0	4	61	99	43971.9	hydrolase activity	b)
2505	Glycoside hydrolase family 31	G9MQS0	8	60	99	98793.1	hydrolase activity	b)
3502	Glycoside hydrolase family 31	G9MQS0	2	50	99	98793.1	hydrolase activity	b)
5705	Glycoside hydrolase family 2	G9MRB7	1	55	100	68590.0	hydrolase activity	b)
2005	Glycoside hydrolase family 76	G9P117	1	86	100	43550.3	hydrolase activity	b)
204	Glycoside hydrolase family 17	G9MZ09	5	135	100	51606.7	hydrolase activity	b)
205	Glycoside hydrolase family 17	G0RLL5	1	41	100	51606.7	hydrolase activity	b)
2205	Glycoside hydrolase family 17	G9MZ09	6	69	100	51606.7	hydrolase activity	b)
4802	Beta-glucosidase	G9MUM1	13	160	100	92942.9	beta-glucosidase activity	b)
5802	Beta-glucosidase	G9MUM1	21	249	100	92942.9	beta-glucosidase activity	b)
6801	Beta-glucosidase	G9MUM1	10	171	100	92942.9	beta-glucosidase activity	b)
6802	Beta-glucosidase	G9MUM1	4	68	100	92942.9	beta-glucosidase activity	b)
5801	Beta-glucosidase	G9NS06	5	66	100	92953.9	beta-glucosidase activity	b)
7503	Predicted protein (Fragment)	G0RR47	22	156	100	78622.7	-	b)
7404	Glutamate synthase	G9NSN7	26	164	100	233157.3	flavin adenine dinucleotide binding	b)
2601	Glucoamylase	Q599K8	12	138	100	66254.7	glucan 1,4-alpha-glucosidase	b)

							activity	
2802	Glucoamylase	Q599K8	7	146	100	66254.7	glucan 1,4-alpha-glucosidase activity	b)
3602	Glucoamylase	Q599K8	10	98	100	66254.7	glucan 1,4-alpha-glucosidase activity	b)
4403	1,3-beta-glucanosyltransferase	G9N1C8	4	63	100	56873.3	hydrolase activity, transferase activity	b)
3701	Putative alpha-1,2-mannosidase	A0A024SAZ5	6	58	100	89470.5	carbohydrate binding	b)
3702	Putative alpha-1,2-mannosidase	A0A024SAZ5	1	62	100	89470.5	carbohydrate binding	b)
7203	Predicted protein	G0RCP2	15	106	100	76835.2	serine-type peptidase activity	b)
2303	Glucoamylase	Q599K8	13	100	100	66254.7	glucan 1,4-alpha-glucosidase activity	b)
5402	Phytase	Q2PDJ7	2	68	100	34651.7	acid phosphatase activity	b)
1501	Peptide hydrolase	G9P7C7	9	65	99	55122.3	peptidase activity	b)
9103	Peptide hydrolase	G9MYA8	4	62	99	40007.6	peptidase activity	b)
5305	Uncharacterized protein	G9N6Z1	5	81	100	37049.2	catalytic activity	b)
5307	Uncharacterized protein	G9N6Z1	4	64	100	37049.2	catalytic activity	b)
1602	Uncharacterized protein	G9MK38	10	95	100	60359.4	oxidoreductase activity	b)
1601	Uncharacterized protein	A0A024RXH9	12	164	100	62470.8	oxidoreductase activity	b)
5309	Uncharacterized protein	G9MES4	8	65	100	68988.6	metallo endopeptidase activity, zinc ion binding	9.37
7301	42kDa endochitinase	D3JTC6	18	129	100	46381.7	chitinase activity	4.44
6201	Endochitinase	A4L4X3	4	74	100	34026.9	hydrolase activity	2.47
7701	Mutanase	F2YBR1	11	112	100	67638.3	glucan 1,3-alpha-glucosidase activity	31.45
8702	Mutanase	F2YBR1	2	73	100	67638.3	glucan 1,3-alpha-glucosidase	68.09

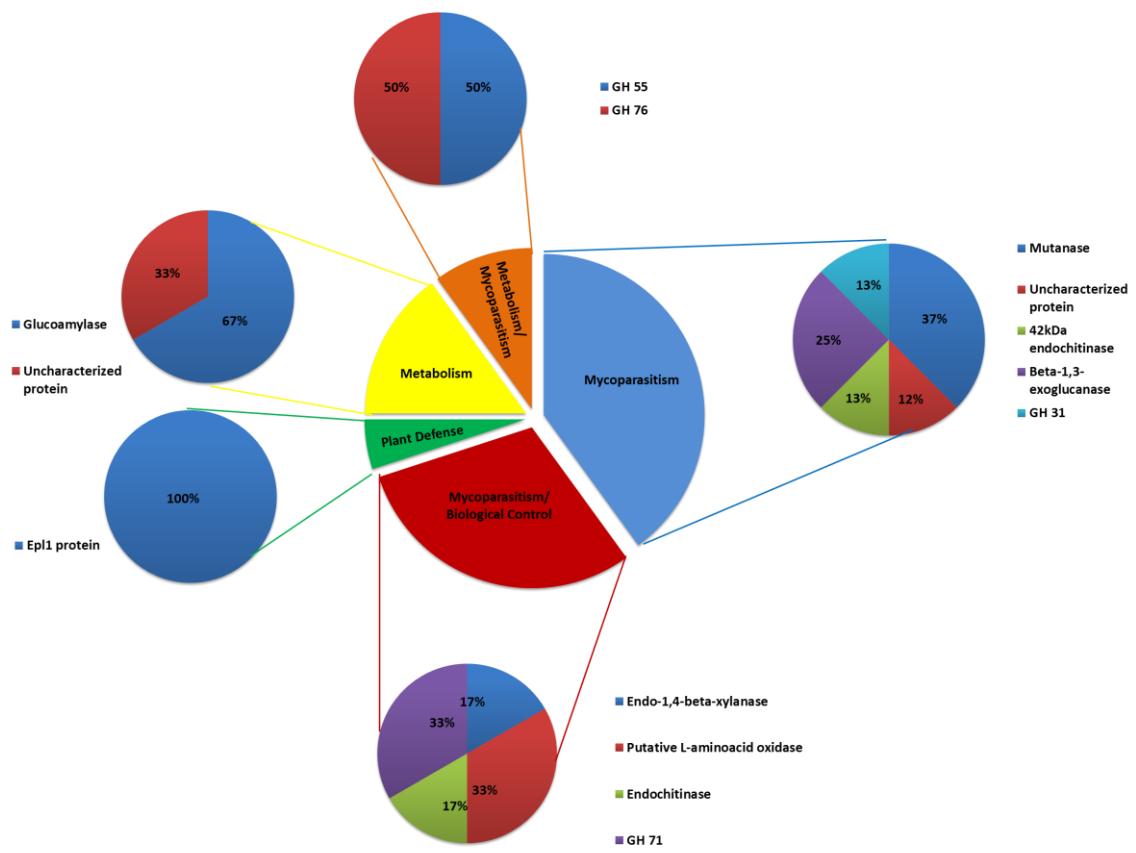
							activity	
7101	Uncharacterized protein	G9MSJ3	5	72	100	33937.4	-	20.10
5706	Beta-1,3-exoglucanase	Q86ZP7	1	67	100	85935.7	glucan exo-1,3-beta-glucosidase activity	0.03
2506	Glycoside hydrolase family 31	G9MQS0	7	64	100	98793.1	carbohydrate binding, hydrolase activity	0.40
5707	Beta-1,3 exoglucanase	O14402	7	109	100	107912.5	glucan exo-1,3-beta-glucosidase activity	0.16
8001	Epl1 protein	A0PCX8	4	64	100	14356.1	-	0.16
6404	Glycoside hydrolase family 71	G9MR60	4	59	100	46479.1	hydrolase activity	0.10
6301	Glycoside hydrolase family 71	G9MR60	4	89	100	46479.1	hydrolase activity	0.36
5601	Glycoside hydrolase family 55	G9MVG5	5	61	100	79961.7	hydrolase activity	0.05
4101	Glycoside hydrolase family 76	G9MSS0	4	129	100	43971.9	hydrolase activity	0.57
2602	Glucoamylase	Q599K8	14	176	100	66254.7	glucan 1,4-alpha-glucosidase activity	0.11
2603	Glucoamylase	Q599K8	7	99	100	66254.7	glucan 1,4-alpha-glucosidase activity	0.07
2501	Uncharacterized protein	G9MUE2	6	112	100	65801.8	phosphoric diester hydrolase activity, lipid metabolic process	0.12
2101	Uncharacterized protein	G9N7V2	5	24	92	35849.9	-	0.18

<sup>a)</sup>spots exclusive of the secretome of *T. harzianum* grown in the presence of *G. citricarpa*. <sup>b)</sup>spots exclusive of the secretome of *T. harzianum* grown in control medium.

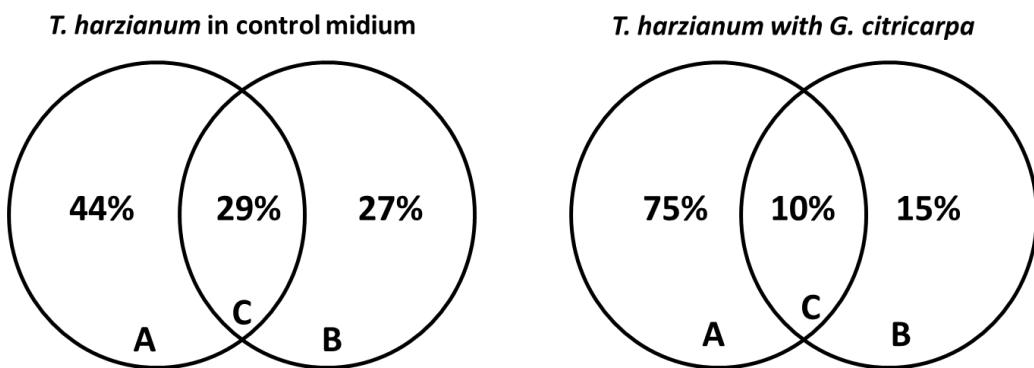
In the control medium, proteins related to metabolism and to biological control were observed (Figs. 3 and 5, Table 1 and 2). On the contrary, when *T. harzianum* was grown in the presence of *G. citricarpa*, we detected a decrease in the expression of proteins. But, simultaneously there was an increase in the expression of proteins related to biological control: 75% of the proteins expressed by *T. harzianum* in the presence of *G. citricarpa* are related to biological control of fungal pathogens (Fig. 4 and 5, Table 1 and 2).



**Figure 3.** Secretome of *T. harzianum* T1A grown in control medium (1% glucose). Proteins identified were distributed according to their corresponding functions (according to UniProt).



**Figure 4.** Secretome of *T. harzianum* T1A grown in the presence of 1 % mycelium of *G. citricarpa*. Proteins identified were distributed according to their corresponding functions (according to UniProt).



**Figure 5.** Left panel corresponds to the amount of proteins found in control medium secreted by *T. harzianum* T1A. The right panel corresponds to the right is the amount of proteins secreted by *T. harzianum* T1A in medium containing mycelium of *G. citricarpa*. (A) proteins related to biological control, plant defense and mycoparasitism, (B) proteins related to the metabolism, (C) proteins having both functions of A and B.

**Table 2.** Assignment of proteins identified in the secretome of *T. harzianum* to processes of mycoparasitism, biological control, plant defense and primary metabolism.

Spots exclusive of the secretome of <i>T. harzianum</i> grown in the presence of <i>G. citricarpa</i>				
Spot	Protein	Accession number	Function	References
9108	Endo-1,4-beta-xylanase	P48793	biological control/mycoparasitism	Collins et al. (2005), Tseng et al. (2008), Verma and Satyanarayana (2012), Marx et al. (2013)
5504, 5505	Putative L-amino acid oxidase	Q8TFF5	biological control/mycoparasitism	Gómez-Mendoza et al. (2014)
8609	Mutanase	F2YBR1	mycoparasitism	Ait-Lahsen et al. (2001), Sanz et al. (2005), Calo et al. (2006)
4709	Uncharacterized protein	G9MPP2	-	Kubicek et al. (2011)

Spots exclusive of control medium				
Spot	Protein	Accession number	Function	References
5805	Beta-1,3-exoglucanase (fragment)	Q86ZP7	mycoparasitism	Bolar et al. (2000), Harman (2000), Viterbo et al. 2002, Yang et al. (2009)
3801, 3802, 3803	Beta-1,3 exoglucanase	O14402	mycoparasitism	Bolar et al. (2000), Harman (2000), Viterbo et al. 2002, Yang et al. (2009)
4803, 6705	Beta 1,3 exoglucanase	A9YZW0	mycoparasitism	Bolar et al. (2000), Harman (2000), Viterbo et al. 2002, Yang et al. (2009)
1301	Beta-1,6-glucanase	B9VQ17	mycoparasitism	Montero et al. (2005)
4503, 5503	Glycoside hydrolase family 71	G9MR60	biological control/mycoparasitism	Ait-Lahsen et al. (2001), Atanasova et al. (2013), Marx et al. (2013)
9104	Serine endopeptidase	A4V8W7	biological control/Plant defense	Flores et al., 1997, Grinyer et al., 2005, Hanson and Howell 2004, De Marco and Felix 2002, Pozo et al., 2004
4705, 5702	Mutanase	F2YBR1	mycoparasitism	Ait-Lahsen et al. (2001), Sanz et al. (2005), Calo et al. (2006)
2103	Glycoside hydrolase family 76	G9MSS0	metabolism/ mycoparasitism	Atanasova et al. (2013), Marx et al. (2013)
2505, 3502	Glycoside hydrolase family 31	G9MQS0	metabolism/ mycoparasitism	Atanasova et al. (2013), Marx et al. (2013)
5705	Glycoside hydrolase family 2	G9MRB7	metabolism/ mycoparasitism	Atanasova et al. (2013), Marx et al. (2013)
2005	Glycoside hydrolase family 76	G9P117	metabolism/ mycoparasitism	Atanasova et al. (2013), Marx et al. (2013)
204, 205, 2205	Glycoside hydrolase family 17	G9MZ09	metabolism/ mycoparasitism	Atanasova et al. (2013), Marx et al. (2013)
4802, 5802, 6801, 6802	Beta-glucosidase	G9MUM1	metabolism/ mycoparasitism	Chet et al. (1998), Monteiro et al. 2010
5801	Beta-glucosidase	G9NS06	metabolism/ mycoparasitism	Chet et al. (1998), Monteiro et al. 2010
7503	Predicted protein (Fragment)	G0RR47	metabolism	Martinez et al. (2008)
7404	Glutamate synthase	G9NSN7	metabolism	Kubicek et al. (2011)

2601, 2802, 3602	Glucoamylase	Q599K8	metabolism	Marx et al. (2013)
4403	1,3-beta-glucanosyltransferase	G9N1C8	metabolism	Kubicek et al. (2011)
3701, 3702	Putative alpha-1,2-mannosidase	A0A024SAZ5	biological control	Monteiro et al. (2010)
7203	Predicted protein	G0RCP2	metabolism	Martinez et al. (2008)
2303	Glucoamylase	Q599K8	metabolism	Marx et al. (2013)
5402	Phytase	Q2PDJ7	metabolism	Sunil et al. (2012)
1501	Peptide hydrolase	G9P7C7	metabolism	Kubicek et al. (2011)
9103	Peptide hydrolase	G9MYA8	metabolism	Kubicek et al. (2011)
5305, 5307	Uncharacterized protein	G9N6Z1	metabolism	Kubicek et al. (2011)
1602	Uncharacterized protein	G9MK38	-	Kubicek et al. (2011)
1601	Uncharacterized protein	A0A024RXH9	-	-

#### Spots up-regulated in the medium with deactivated *G. citricarpa* mycelium

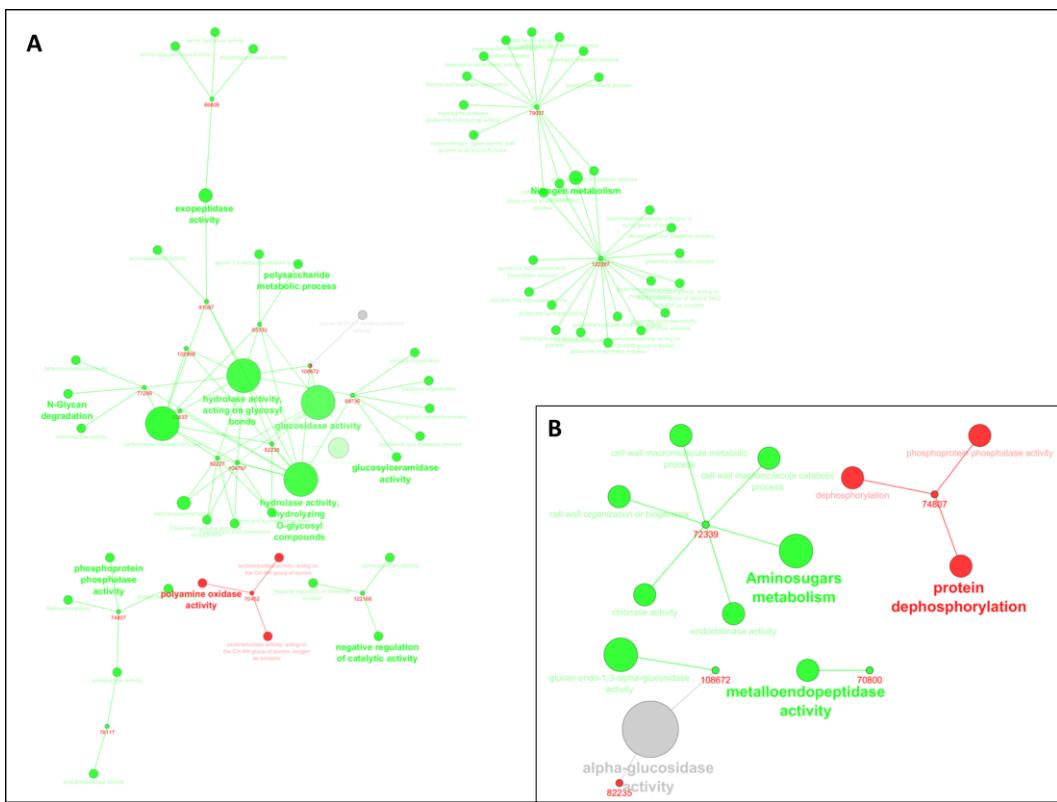
5309	Uncharacterized protein	G9MES4	mycoparasitism	Kubicek et al. (2011)
7301	42kDa endochitinase	D3JTC6	mycoparasitism	Chet et al. (1998), Monteiro et al. 2010
6201	Endochitinase	A4L4X3	biological control/ mycoparasitism	Chet et al. (1998), Monteiro et al. 2010
7701, 8702	Mutanase	F2YBR1	mycoparasitism	Ait-Lahsen et al. (2001), Sanz et al. (2005), Calo et al. (2006)
7101	Uncharacterized protein	G9MSJ3	-	Kubicek et al. (2011)

#### Spots down-regulated in the medium with deactivated *G. citricarpa* mycelium

5706	Beta-1,3-exoglucanase (Fragment)	Q86ZP7	mycoparasitism	Bolar et al. (2000), Harman (2000), Viterbo et al. 2002, Yang et al. (2009)
2506	Glycoside hydrolase family 31	G9MQS0	mycoparasitism	Atanasova et al. (2013), Marx et al. (2013)
5707	Beta-1,3 exoglucanase	O14402	mycoparasitism	Bolar et al. (2000), Harman (2000), Viterbo et al. 2002, Yang et al. (2009)
8001	Epl1 protein	A0PCX8	plant defense	Frischmann et al. (2012), Salas-Marina et al. (2015)
6404, 6301	Glycoside hydrolase family 71	G9MR60	biological control/ mycoparasitism	Ait-Lahsen et al. (2001), Atanasova et al. (2013), Marx et al. (2013)
5601	Glycoside hydrolase family 55	G9MVG5	metabolism/ mycoparasitism	Kubicek et al. (2011), Marx et al. (2013)
4101	Glycoside hydrolase family 76	G9MSS0	metabolism/ mycoparasitism	Atanasova et al. (2013), Marx et al. (2013)

<b>2602, 2603</b>	Glucoamylase	Q599K8	metabolism	Marx et al. (2013)
<b>2501</b>	Uncharacterized protein	G9MUE2	metabolism	Kubicek et al. (2011)
<b>2101</b>	Uncharacterized protein	G9N7V2	-	Kubicek et al. (2011)

The secretion of proteins involved in mycoparasitism processes (such as penetration into the cell wall of the host) in the absence of induction by a pathogen suggests that there is a constitutively expression of these proteins. The presence of the pathogen leads to the increase of the total number of proteins intended for biological control, for plant defense and for mycoparasitism secreted by *Trichoderma* (Fig. 5). Protein-protein interaction analysis performed with ClueGo + CluePedia (Fig. 6) of the unique proteins and of the most abundant proteins in each group, confirmed the prevalence of the biological process “hydrolase activity acting in glycosyl bonds”, “glucosidase activity”, “nitrogen metabolism”, “hydrolase activity” in case of *Trichoderma* growth in control medium (Fig. 6A), whereas in case of *T. harzianum* grown in the presence of *G. citricarpa* only in “polyamine oxidase activity” supported by Putative L-amino acid oxidase (Q8TFF5) (Fig. 6B). In case of up-regulated proteins biological processes such as metalloendopeptidase and aminosugars were highlighted and in case of down-regulated protein it was only noticed the protein dephosphorylation supported by GH family 76 protein (G9MSS0).



**Figure 6:** ClueGo+CluePedia analysis of protein-protein interaction. A- Unique proteins present in significant distinct levels. Green nodes refer to the biological processes exclusive of the secretome of *T. harzianum* grown in the presence of *G. citricarpa* and red nodes refer to the ones exclusive of control medium. B- Up regulated proteins (green nodes) and down-regulated in the medium with deactivated *G. citricarpa* (red nodes). Gray nodes refer to shared biological processes between up- and down- regulated proteins.

*Trichoderma harzianum* is capable of producing extracellular enzymes responsible for the degradation of fungal cell walls (endochitinases,  $\beta$ -glucosidases, mannosidases, phosphatases and proteases) and thus assimilate the intracellular contents of the host (Chet et al. 1998). These enzymes act synergistically causing the effective control of pathogens such as *Botrytis cinerea*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium* sp. (Monteiro et al. 2010). It is known that initially there is a chemical stimulus by the host, which ensures the recognition of hyphae and so *Trichoderma* is capable of directing its growth over the hyphae of the pathogenic fungus (Kredics et al. 2003, Gruber and Seidl-Seiboth 2012, Gruber et al. 2014).

The enzymes produced by *Trichoderma* are required for cell wall degradation of the phytopathogen (Harman et al. 2004, Druzhinina et al. 2012). Among the proteins

exclusive of the medium containing *G. citricarpa*, we identified an L-amino acid oxidase (LAAO, Q8TFF5). Although it is not predicted as an extracellular protein, it was already identified by Cheng et al. (2012) as an enzyme linked to *T. harzinaum* antagonism against *B. cinerea*. The L-amino acid oxidase has been isolated from various organisms such as bacteria (Arima et al. 2009), fungi (Yang et al. 2009), fish skin mucus (Kitani et al. 2007, Nagashima et al. 2009), green algae (Kasai et al. 2010) and serpent venoms (Naumann et al. 2011). These enzymes have many pathological activities such as cytotoxicity (Rodrigues et al. 2009), bactericidal and antiviral activity, promoting growth suppression of Gram-positive and Gram-negative prokaryotes as well as of HIV (Ciscotto et al. 2009). However, their roles *in vivo* remain uncertain (Izidoro et al. 2014). The LAAO of snakes is the most studied and has been an attractive target for research in molecular biochemistry, physiology and medicine due to its multiple effects on various cells. Tseng et al. (2008) and Yang et al. (2009) reported the secretion of LAAO by *T. harzianum* in the presence of the cell walls of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *B. cinerea* respectively. According to the authors, this enzyme cleaves amino acids generating ammonia, hydrogen peroxide, and R-keto-aminocaproic acid. Hydrogen peroxide may have an active role in disrupting the integrity of the cell membrane.

Another important protein identified in the present study is mutanase, which was found in control medium and up-regulated in the presence of 1% of the mycelium of *G. citricarpa*. Alpha-1,3-glucanases (F2YBR1), also named mutanases or spindle α-1,3-glucanases, are extracellular enzymes able to degrade polymers of glucose bound by α-1,3-glycosidic bonds. These enzymes, grouped in family 71 of the CAZy glycosyl-hydrolases, are classified as endo-hydrolytic when two or more residues of glucose are released as reaction products, and exo-hydrolytic when glucose monomers are the final reaction products.

According to Ait-Lahsen et al. (2001), mutanases are secreted by *T. harzianum*, when cultured in the presence of polysaccharides, fungal cell walls, or autoclaved mycelium as a carbon source. Years later, Sanz et al. (2005) were able to purify, characterize and clone a α-1,3-glucanase (mutanase) from *T. asperellum* T32. Its expression, in the presence of *B. cinerea*, was strongly increased in the process of

antagonist action. The authors concluded that the secretion of mutanase was specifically induced by the presence of the cell walls of *B. cinerea*, supporting the involvement of this enzyme in mycoparasitism processes. According to Calo et al. (2006), the mutanase secreted by *T. harzianum* is also very important in resistance induction on plant trichomes. According to the authors, the resistance to the pathogen *B. cinerea* did not depend on the signaling pathways of salicylic or jasmonic acid, but on the presence of  $\alpha$ -1,3-glucanase at the trichomes. According to Steindorff et al. (2014) the resistance occurs after the action of the mycoparasite, which according to Free (2013) is expected: the cell wall composition of *B. cinerea* ( $\beta$ -1,3/ $\beta$ -1,6-glycans and  $\alpha$ -1,3glucans) favors the expression of such enzyme.

Another protein induced by the pathogen mycelium (absent from the control medium) was endo-1,4- $\beta$ -xylanase. According to the Cazy database (<http://www.cazy.org>), xylanases (XYN2) are present in the glycoside hydrolase (GH) families 5, 7, 8, 9, 10, 11 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 and 62. The xylanases secreted by *T. harzianum* T1A in the presence of *G. citricarpa* were mostly identified as GH 10 and 11, which have a truly distinct catalytic domain with endo-1,4- $\beta$ -xylanase activity (Verma and Satyanarayana 2012, Collins et al. 2005). Tseng et al. (2008) reported the participation of xylanase in the process of mycoparasitism by *Trichoderma*. The authors demonstrated that xylanase activity is induced by the presence of mycelium of *R. solani* and this behavior correlates with a reduction of pathogen growth when confronted with *Trichoderma* *in vitro*.

The  $\beta$ -1,3-exoglucanase (O14402, A9YZW0) is also well described in the literature as important plant pathogen's cell wall degrading enzyme (Viterbo et al. 2002). *Trichoderma harzianum* T1A secretes this enzyme both in control and after being challenged by *G. citricarpa* mycelium, suggesting a constitutively production of this protein, regardless of the carbon source. Along with  $\beta$ -1,3-exoglucanase, endochitinase was also found in both media, but with higher expression in the medium containing the mycelium of *G. citricarpa*. According to Bolar et al. (2000) and to Harman (2000) these enzymes are able of degrading fungal cell wall, being important for the biocontrol mechanism exerted by *T. harzianum*. Yang et al. (2009) identified several enzymes able to degrade *B. cinerea* cell wall proteins such as chitinase,  $\beta$ -1,3(6)-glucanases and

proteases secreted by *T. harzianum* when grown in the presence of the cell wall of the pathogen. These proteins were also identified in our study (endochitinases D3JTC6 and A4L4X3,  $\beta$ -1,3 exoglucanases Q86ZP7 and A9YZW0,  $\beta$ -1,6 glucanase B9VQ17), suggesting that a similar mechanism may occur in the antagonism of *T. harzianum* against *G. citricarpa*.

Glycoside hydrolase (GH) families (2, 17, 31, 55, 71, and 76) are associated both with metabolism and mycoparasitism processes. *Trichoderma harzianum* T1A expressed these enzymes in both media tested, but with higher expression in the control medium (25.8 % of total proteins) than in medium containing mycelium of *G. citricarpa* (7.6 % of the identified proteins). This suggests that the expression of these enzymes is more related to the metabolism of the fungus than to the mycoparasitism mechanism. Nonetheless, these GH are also known for having a central role in mycoparasitism (Atanasova et al. 2013) acting as fungal cell wall degradative enzymes, which confers an additional defensive advantage to the plant colonized by *T. harzianum*. A similar action should be carried out by  $\beta$ -1,6-glucanase (B9VQ17) that was detected in control medium, differing from what was found by Montero et al. (2005), which reported  $\beta$ -1,6-glucanase being specifically induced by the presence of cell walls of fungi.

The serine endopeptidase (A4V8W7) was detected exclusively in the control medium. Surprisingly this enzyme has been related to the elicitation of plant defense responses (Hanson and Howell 2004) by *T. virens*. On the other hand, for many authors (Flores et al., 1997, Grinyer et al., 2005, Hanson and Howell 2004, De Marco and Felix 2002, Pozo et al., 2004) the most relevant extracellular protease related to the biocontrol process in *Trichoderma* spp. is a serine endopeptidase. Also, Suárez et al. (2007) reported the induction of a serine protease, not only during, but before the contact with the prey in different *Trichoderma* species). It was proposed that the expression of proteolytic enzymes during the onset of mycoparasitism leads to the formation of nitrogenous metabolites (e.g. peptides), derived from the prey fungus, which interact with the nitrogen sensors of *Trichoderma*. Additionally, proteases make possible an easier penetration of the host tissue by degradation of the links of the proteins of the outer layer of the host and/or use of host proteins for their nutrition (Pozo et al. 2004).

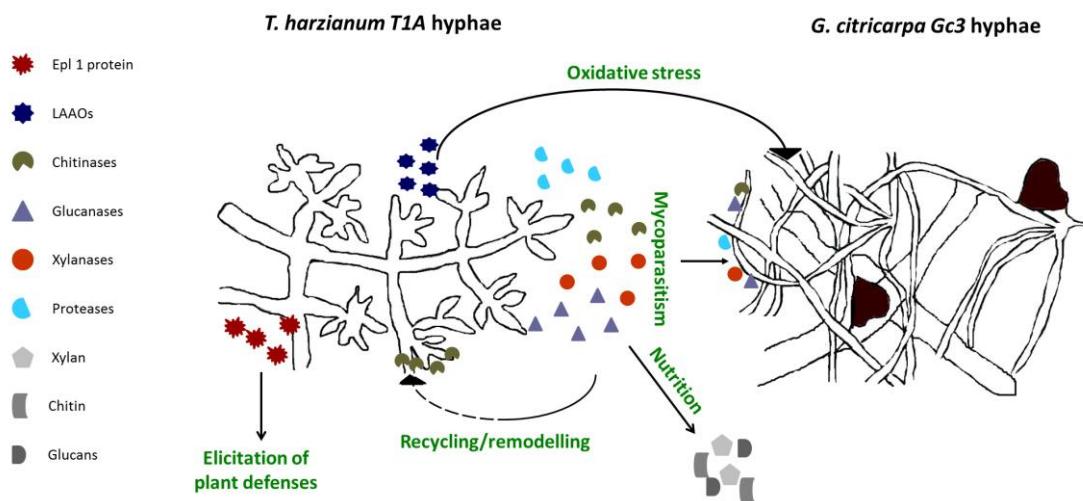
The Epl 1 protein was observed in both media (Tables 1 and 2). According to Salas-Marina et al. (2015), fungi belonging to the genus *Trichoderma*, induce beneficial effects on plants, including promoting growth and inducing resistance disease. Epl 1 (a cerato-platanin protein) has been described as able to act as an elicitor for triggering defense reactions in plants (Frischmann et al. 2012, Freitas et al. 2014, Gomes et al. 2015, Salas-Marina et al. 2015, Ramada et al. 2015). It is important to note that although some authors report the defense response-inducing function in plants by *Trichoderma* through the protein Serine endopeptidase and Epl 1 protein, may possibly be performing other functions, not described, even when *Trichoderma* secret these proteins without the presence of the plant.

In work of the Gomes et al. (2015), they analyzed the effect of Epl1 protein, described by the other authors with plant resistance elicitor, in expression modulation of *T. harzianum* genes involved in mycoparasitism process against phytopathogenic fungi; self cell wall protection and recognition; host hyphae coiling and triggering expression of defense-related genes in beans plants. These authors suggest that your results indicated that the absence of Epl1 protein affects the expression of all mycoparasitism genes analyzed in direct confrontation assays against phytopathogen Sclerotinia sclerotiorum.

Also note that Gomes et al. (2015) indicated that Epl1 might act as a recognition molecule to identify its own and/or host hyphae while avoiding self-degradation. Alternatively, this protein could have a protection function, such as fish scales, from host and its own degrading enzymes and other metabolites, thereby preserving its own cell wall integrity during confrontation against prey.

Together with the serine endopeptidase, the presence of Epl 1 protein, in the absence of both the pathogen and the host plant, corroborates the hypothesis that *T. harzianum* T1A constitutively expresses proteins that are involved in biological control mechanisms. In fact, *T. harzianum* T1A showed a different behavior towards *G. citricarpa*, when compared to other plant pathogens according relates of Tseng et al. (2008), Yang et al. (2009) and Ramada et al. (2015). This strain is able to express and secrete proteins related to biological control as well as proteins that provide protection to the plant even in the absence of *G. citricarpa* (Fig. 7). Most reports describe the

secretion of proteins related to biological control in medium only after induction by the pathogen. When exposed to mycelium of *G. citricarpa* we detected a decrease of the presence of proteins related to the metabolism and an increase of the secretion of proteins related to the biocontrol explaining the efficiency of this strain in the control of *G. citricarpa*.



**Figure 7.** Schematic representation of biocontrol mechanisms exerted by *Trichoderma harzianum* T1A over *Guignardia citricarpa*. Model of the roles of hydrolytic enzymes (chitinases, glucanases, proteases and xylanases) in mycoparasitism, oxidative stress (LAAOs) against *C. citricarpa*, as well as in plant defenses elicitation (EPI1). Also represented are the enzymes involved in *Trichoderma* nutrition and in recycling and remodeling processes (chitinases).

The results suggest that *T. harzianum* T1A is able to secrete under control conditions (without presence of a pathogen) proteins that provide protection to the plant. When exposed to the mycelium of *G. citricarpa* there is a decrease of the secretion of proteins related to metabolism and increase of secretion of proteins related to the biocontrol. This behavior is different from what has already been reported for other strains of *T. harzianum* (Tseng et al. 2008, Yang et al. 2009, Ramada et al. 2015) and its interaction with other fungal pathogens. These studies reported higher expression of enzymes with biological control properties only when *T. harzianum* was challenged by the pathogenic fungi. These results should be fully understood with complementary studies to better understand the specific behavior of the strain used in this study (T1A).

## **Conclusion**

This antagonistic effect of *T. harzianum* is mainly due to the production and secretion of proteins involved in mycoparasitism processes and plant defense induction. One of the more significant findings that emerge from this study is that *T. harzianum* T1A secretes many of these proteins without induction by a pathogen. Despite the great interest in the identification of important enzymes related to mycoparasitism (chitinases, lipases, proteases and glucanases) (Harman et al. 2004, Suárez et al. 2004) no study has identified the production of these enzymes by *T. harzianum* in the presence of *G. citricarpa*.

Although many species of *Trichoderma* are already used in the production of biofungicides such as Tricode® (control of the fungi causing post-harvest rot apple), Trichodermil®, based on *T. harzianum* (controls various pathogens of different cultures) and GlioGard® based on *T. virens* (prevention of seedling damping-off caused by *Pythium* species and *Rhizoctonia*), until now there are no biofungicides (based on biological control agents) used to control Citrus Black Spot. The enzymes express by *T. harzianum* T1A may be useful in the formulation of new compounds with fungicidal activity that are more efficient and less aggressive to the environment and to the producer.

## **Acknowledgments**

This study was partially supported by FEDER funding through COMPETE program and by national funding through FCT within the research project ALIEN (PTDC/AGR-PRO/2183/2014) and to CESAM (UID/AMB/50017/2013), UID/BIM/04501/2013, UID/IC/00051/2013 and RNEM (Portuguese Mass Spectrometry Network). A Alves (IF/00835/2013), AC Esteves (BPD/102572/2014) and C Felix (BD/97613/2013) acknowledge FCT. F Lima acknowledges CAPES for the PhD scholarship to develop part of the research project: Proteomic analysis of *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum* against *Guignardia citricarpa*, pathogenic agent of Citrus Black Spot at the University of Aveiro and FAPERGS for the PhD scholarship in Biotechnology at the University of Caxias do Sul (Brazil).

## References

- Aguilar-Veldoso CI, Ribeiro JGB, Feichtenberger E, Goes A, Spósito MB, 2002. *Technical manual procedures of citrus black spot*. Brasília: MAPA/DAS/DDIV, 72p. Brazil.
- Ait-Lahsen H, Soler A, Rey M, De La Cruz J, Monte E, Llobell A, 2001. An Antifungal exo-alpha-1,3-Glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(12): 5833–5839. 2001.
- Arima J, Sasaki C, Sakaguchi C, Mizuno H, Tamura T, Kashima A, Kusakabe H, Sugio S, Inagaki K, 2009. Structural characterization of L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X- 119-6. *The FEBS Journal* **276**(14):3894-3903.
- Atanasova L, Crom SL, Gruber S, Coupier F, Seidl-Seiboth V, Kubicek CP, Druzhinina IS, 2013. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC Genomics* **14**:121.
- Belete E, Ayalew A, Ahmed S, 2015. Evaluation of local isolates of *Trichoderma* spp. against black root rot (*Fusarium solani*) on faba bean. *Journal of Plant Pathology Microbiology* **6**(6): 279. doi:10.4172/2157-7471.1000279.
- Bernardo ERA, Bettoli W, 2010. Biocontrol and alternative products for managing citrus black spot in organic cropping systems. *Tropical Plant Pathology* **35** (1): 37-42.
- Binda G, Galon J, Mlecnik B. 2013. CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics* **29**(5):661-3. doi:10.1093/bioinformatics/btt019
- Bolar JP, Norelli JL, Wong KW, Hayes CK, Harman GE, Aldwinckle HS, 2000. Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. *Phytopathology* **90**(1): 72-76.
- Calo L, García I, Gotor C, Romero LC, 2006. Leaf hairs influence phytopathogenic fungus infection and confer an increased resistance when expressing a *Trichoderma* α-1,3-glucanase. *Journal of Experimental Botany* **57**(14): 3911–3920.
- Cheng CH, Yang CA, Peng KC, 2012. Antagonism of *Trichoderma harzianum* ETS 323. *Phytopathology* **102**(11): 1054-63. doi: 10.1094/PHYTO-11-11-0315.

Chet I, Benhamou N, Haran S, 1998. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: *Trichoderma and Gliocladium – enzymes, biological control and commercial applications* (Harman, G.E.; Kubicek, C.P., eds). London, Taylor and Francis Ltda, 2: 153-172.

Ciscotto P, Machado de Avila RA, Coelho EA, Oliveira J, Diniz CG, Farías LM, de Carvalho MA, Maria WS, Sanchez EF, Borges A, Chávez-Olórtegui C, 2009. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon: official journal on the International Society on Toxicology* **55**(3): 330-341, 2009.

Collins T, Gerday C, Feller G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* **29**(1): 3–23.

De Marco JL, Félix CR, 2002. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant withes broom disease. *Bio Med Central Biochemistry* **3**: 2-7.

Do Vale LHF, Gómez-Mendoza DP, Kim MS, Pandey A, Ricart CAO, Filho EXF, Sousa MV, 2012. Secretome analysis of the fungus *Trichoderma harzianum* grown on cellulose. *Proteomics* **12** (17): 2716–2728.

Druzhinina IS, Shelest S, Kubicek CP, 2012. Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. *FEMS Microbiology Letters* **337**(1): 1–9.

El-Komy MH, Saleh AA, Eranthodi A, Molan YY, 2015. Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. *The Plant Pathology Journal* **31**(1): 50-60.

Esteves AC, Saraiva M, Correia A, Alves A, 2014. Botryosphaerales fungi produce extracellular enzymes with biotechnological potential. *Canadian Journal of Microbiology* **60**(5): 332-42. doi: 10.1139/cjm-2014-0134

Fernandes I, Alves A, Correia A, Devreese B, Esteves AC, 2014. Secretome analysis identifies potential virulence factors of *Diplodia corticola*, a fungal pathogen involved in cork oak (*Quercus suber*) decline. *Fungal Biology* **118**(5-6): 516-523.

Freitas RS, Steindorff AS, Ramada MHS, de Siqueira SJL, Noronha EF, Ulhoa CJ, 2014. Cloning and characterization of a protein elicitor Sm1 gene from *Trichoderma harzianum*. *Biotechnol Lett* **36**:783–788

Flores A, Chet I, Herrera-Estrella A, 1997. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene prb1. *Current Genetics* **31**: 30–37.

Free SJ, 2013. Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Advances in Genetics* **81**: 33–82.

Frischmann A, Neudl S, Gaderer R, Bonazza K, Zach S, Gruber S, Spadiut O, Friedbacher G, Grothe H, Seidl-Seiboth V, 2012. Self-assembly at air/water interfaces and carbohydrate binding properties of the small secreted protein EPL1 from the fungus *Trichoderma atroviride*. *The Journal of Biological Chemistry* **288**: 4278-4287.

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins M, Appel R, Bairoch A, 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker, J. (ed.). *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press. pp. 571–607.

Gomes EV, Costa MN, de Paula RG, Azevedo RC, da Silva FL, Noronha EF, Ulhoa CJ, Monteiro VN, Cardoza RE, Gutiérrez S, Silva RN, 2015. The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self cell wall protection. *Scientific Reports*, **5**:17998, DOI: 10.1038/srep17998

Gómez-Mendoza DP, Junqueira M, Do Vale LHF, Domont GB, Filho EXF, Sousa MV, Ricart CAO, 2014. Secretomic survey of *Trichoderma harzianum* grown on plant biomass substrates. *Journal of Proteome Research* **13** (4): 1810–1822.

Grinyer J, Hunt S, McKay M, Herbert BR, Nevalainen H, 2005. Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics* **47**(6): 381-388.

Gruber S, Seidl-Seiboth V, 2012. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology* **158**: 26–34. doi10.1099/mic.0.052613-0.

Gruber S, Zeilinger S, 2014. The transcription factor Ste12 mediates the regulatory Role of the Tmk1 MAP kinase in mycoparasitism and vegetative hyphal fusion in the filamentous fungus *Trichoderma atroviride*. *PLoS ONE* **9**(10): e111636. doi:10.1371/journal.pone.0111636

Guimarães A, 2008. *Bioprospecção de microrganismos epifíticos de tangerina cv. Montenegrina para o Manejo da mancha preta dos citros causada por Guignardia citricarpa*, Kiely. 91f. Dissertação (Mestrado- Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Hanson LE, Howell CR, 2004. Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathology* **94**: 171–176.

Harman GE, 2000. Myths and dogmas of biocontrol—changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* **84** (4): 377-393.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M, 2004. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* **02**(1): 43–56.

Hortifruti Brasil, 2012. *Citros: sustentabilidade citrícola é desafiada pelos altos custos de produção*. CEPEA- Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Edição Especial. Ano 11, nº 112. 46p.

Inch S, Walker DJ, Gilbert J, Daayf F, Fernando WGD, Piercy-Normore M, 2011. The development of a model to predict the potential efficacy of *Trichoderma harzianum* isolates on perithecial production of *Gibberella zaeae* based on secondary metabolite production. *Canadian Journal of Plant Pathology* **33**(3): 337-346.

Isaias CO, Martins I, Silva JBT, Silva JP, Mello SCM, 2014. Antagonistic action and bioactive metabolites of *Trichoderma* spp. against the pathogens *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae*. *Summa phytopathologica* **40**(1): 34-41.

Izidoro LFM, Sobrinho JC, Mendes MM, Costa TR, Grabner AN, Rodrigues VM, da Silva SL, Zanchi FB, Zuliani JP, Fernandes CFC, Calderon LA, Stábeli RG, Soares AM, 2014. Snake Venom L-Amino Acid Oxidases: Trends in Pharmacology and Biochemistry. BioMed Research International 19 pages doi.org/10.1155/2014/196754.

Kasai K, Ishikawa T, Komata T, Fukuchi K, Chiba M, Nozaka H, Nakamura T, Sato T, Miura T, 2010. Novel L-amino acid oxidase with antibacterial activity against methicillinresistant *Staphylococcus aureus* isolated from epidermal mucus of the flounder *Platichthys stellatus*. *The FEBS Journal* **277**(2): 453-465.

Kredics L, Antal Z, Manczinger L, Szekeres A, Kevei FC, Nagy E, 2003. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technology and Biotechnol* **41**(1): 37-42.

Kitani Y, Tsukamoto C, Zhang G, Nagai H, Ishida M, Ishizaki S, Shimakura K, Shiomi K, Nagashima Y, 2007. Identification of an antibacterial protein as L-amino acid oxidase in the skin mucus of rockfish *Sebastodes schlegeli*. *The FEBS Journal* **274**(19): 125-136.

Klotz LJ, 1978. *Fungal, bacterial, and nonparasitic diseases and injuries originating in the seedbed, nursery, and orchard*. In: REUTHER, W.; CALAVAN, E.C.; CARMAN, G.E. (Ed.). The citrus industry. Riverside: University of California, v.4, p.1-66.

Kotasthane A, Agrawal T, Kushwah R, Rahatkar OV, 2015. *In-vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* and their response towards growth of cucumber, bottle gourd and bitter gourd. *European Journal of Plant Pathology* **141**(3): 523-543.

Kubicek CP, Mach RL, Peterbauer CK, Lorito M, 2001. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *Journal of Plant Pathology* **83**(2):11–23.

Kubicek, CP, Herrera-Estrella, A, Seidl-Seiboth, V, Martinez, DA, Druzhinina, IS et al. 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol.* 12:R40. doi: 10.1186/gb-2011-12-4-r40.

Lamdan NL, Shalaby S, Ziv T, Kenerly CM, Horwitz BA, 2015. Secretome of *Trichoderma* interacting with maize roots: role in induced systemic resistance. *Molecular & Cellular Proteomics* **14**:1054-1063.

Latgé JP, 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology* **66**(2):279-290.

Latgé JP, 2010. Tasting the fungal cell wall. *Cellular Microbiology* **12**(7): 863-872.

Macheroux P, Schwarz M, Kurfürst M, Au LC, Ghisla S, 2001. L-Amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. Comparative sequence analysis and characterization of active and inactive forms of the enzyme. *European Journal of Biochemistry* **268**(6): 1679-1686.

Mahajan S, Master ER, 2010. Proteomic characterization of lignocellulose-degrading enzymes secreted by *Phanerochaete carnosa* grown on spruce and microcrystalline cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**(6): 1903-14.

Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE, Chapman J, Chertkov O, Coutinho PM, Cullen D, Danchin EG, Grigoriev IV, Harris P, Jackson M, Kubicek CP, Han CS, Ho I, Larrondo LF, Brettin TS, 2008. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocreja jecorina*). *Nat. Biotechnol* **26**:553-560.

Marx IJ, Wyk N, Smit S, Jacobson D, Viljoen-Bloom M, Volschenk H, 2013. Comparative secretome analysis of *Trichoderma asperellum* S4F8 and *Trichoderma reesei* Rut C30 during solid-state fermentation on sugarcane bagasse. *Biotechnology for Biofuels* **6**:172.

Martínez-Medina A, Alguacil MDM, Pascual JA, Wees SCMV, 2014. Phytohormone Profiles Induced by *Trichoderma* Isolates Correspond with Their Biocontrol and Plant Growth-Promoting Activity on Melon Plants. *Journal of Chemical Ecology* **40**(7): 804-815.

Mohamed HA, Haggag WM, Attallah AG, 2010. Genetic enhancement of *Trichoderma viride* to over produce different hydrolytic enzymes and their biocontrol potentiality against root rot and white mold diseases in bean plants. *Agriculture and Biology Journal of North America* **1**(3): 273-284.

Monteiro VN, Silva RN, Steindorf AS, Costa FT, Noronha EF, Ricart CAO, Sousa MV, Vainstein MH, Ulhoa CJ, 2010. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. *Current Microbiology* **61**(4): 298-305.

Montero M, Sanz L, Rey M, Monte E, Llobell L, 2005 BGN16.3, a novel acidic  $\beta$ -1,6-glucanase from mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *FEBS Journal* **272**: 3441–3448

Nagashima Y, Tsukamoto C, Kitani Y, Ishizaki S, Nagai H, Yanagimoto T, 2009. Isolation and cDNA cloning of an antibacterial L-amino acid oxidase from the skin mucus of the great sculpin *Myoxocephalus polyacanthocephalus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B – Biochemistry & Molecular Biology* **154**(1): 55-61.

Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W, 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie brilliant blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**: 255-262.

Noronha EF, Ulhoa CJ, 1996. Purification and characterization of an endo  $\beta$ -1,3-glycanase from *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal Microbiology* **42**(10): 1039-1044.

Pandolfo JD, 2011. *Otimização do Manejo da pinta preta causada por Guignardia citricarpa Kiely na produção ecológica de tangerinas cv. Montenegrina sob a ótica da*

*pesquisa participativa.* Tese (Doutorado em Fitotecnia: Fitopatologia). 177p. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Brazil.

Pierloni A, Martelli P, Fariselli P, Casadio R, 2006. BaCelLo: a balanced subcellular localization predictor. *Bioinformatics* **22**: e408-e416.

Pozo MJ, Baek JM, García JM, Kenerley CM, 2004. Functional analysis of *tvsp1*, a serine protease-encoding gene in the biocontrol agent *Trichoderma virens*. *Fungal Genetics and Biology* **41**: 336–348.

Qualhato TF, Lopes FA, Steindorff AS, Brandão RS, Jesuino RS, Ulhoa CJ, 2013. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters* **35**(9): 1461-8. 2013.

Ramada MH, Steindorff AS, Bloch C Jr, Ulhoa CJ, 2015. Secretome analysis of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivated in different media supplemented with *Fusarium solani* cell wall or glucose. *Proteomics*. doi: 10.1002/pmic.201400546.

Rana IA, Loerz H, Schaefer W, Becker D, 2012. Over expression of chitinase and chitosane genes from *Trichoderma harzianum* under constitutive and inducible promoters in order to increase disease resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Plant Breeding* **3**(4): 37-44.

Rao GS, Reddy NNR, Surekha CH, 2015. Induction of Plant Systemic Resistance in Legumes *Cajanus cajan*, *Vignaradiata*, *Vigna mungo* against plant pathogens *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata* – a *Trichoderma viride* mediated reprogramming of plant defense mechanism. *International Journal of Recent Scientific Research* **6** (5): 4270-4280.

Rodrigues MBC, Spósito MB, Aguilar-Vildoso CI, Andreote FD, Araújo WL, Pizzirani-Kleiner AA, 2007. Resistência a Benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta dos citros. *Pesquisa agropecuária Brasileira* **3**(42): 323-327.

Rodrigues RS, da Silva JF, Boldrini França J, Fonseca FP, Otaviano AR, Henrique Silva F, Hamaguchi A, Magro AJ, Braz AS, dos Santos JI, Homsi-Brandeburgo MI, Fontes MR, Fuly AL, Soares AM, Rodrigues VM, 2009. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Biochimie* **91**(4):490-501.

Salas-Marina MA, Isordia-Jasso M, Islas-Osuna MA, Delgado-Sánchez P, Jiménez-Bremont JF, Rodríguez-Kessler M, Rosales-Saavedra MT, Herrera-Estrella A, Casas-Flores S, 2015. The Epl1 and Sm1 proteins from *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma virens* differentially modulate systemic disease resistance against different life style pathogens in *Solanum lycopersicum*. *Frontiers in Plant Science* **6**: (77). doi: 10.3389/fpls.2015.00077

Sanz L, Montero M, Redondo J, Llobell A, Monte M, 2005. Expression of an  $\alpha$ -1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*. *The FEBS Journal* **272**(2): 493–499. 2005.

Sarmento AC, Lopes H, Oliveira CS, Vitorino R, Samyn B, Sergeant K, Barros MT, 2009. Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* L. *Planta* **230**(2): 429–439. doi: 10.1007/s00425-009-0948-9

Schuster A, Schmoll M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**(3): 787-99.

Sempere F, Santamarina MP, 2010. Efficacy of *Trichoderma harzianum* in suppression of *Fusarium culmorum*. *Annals of Microbiology* **60**: 335-340.

Singh BN, Singh A, Singh BR, Singh HB, 2014. *Trichoderma harzianum* elicits induced resistance in sunflower challenged by *Rhizoctonia solani*. *Journal of Applied Microbiology* **116**(3): 654–666.

Spósito MB, Bassanezi RB, Amorim L, 2004. Resistance to citrus black spot assessed by the disease progress curves. *Fitopatologia Brasileira* **29**: 532–537.

Steindorff AS, Ramada MHS, Coelho ASG, Miller RNG, Júnior GJP, Ulhoa CS, Noronha EF, 2014. Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. *BMC Genomics* **15**: 204.

Suárez MB, Rey M, Castilho P, Monte E, Llobell A, 2004. Isolation and characterization of PRA, a trypsin like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematicidae activity. *Applied Microbiology Biotechnology* **65**: 46-55.

Suárez MB, Vizcaíno JA, Llobell A, Monte E, 2007. Characterization of genes encoding novel peptidases in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413 using the TrichoEST functional genomics approach. *Current Genetics* **51**(5): 331-342.

Sunil SA, Chao LT, Sze S.K. 2012. Quantitative Secretomic Analysis of *Trichoderma reesei* Strains Reveals Enzymatic Composition for Lignocellulosic Biomass Degradation. *Molecular & Cellular Proteomics* 11.7. 10.1074/mcp.M111.012419 –2.

Talla SG, Raju ASR, Karri S, Kumar YS, 2015. Production and antagonistic effect of *Trichoderma* spp. against pathogenic microorganisms (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phasealina* and *Rhizoctonia solani*). *African Journal of Biotechnology* **14**(8): 668-675.

Tarus PK, Lang'at-Thoruwa CC, Wanyonyi AW, Chhabra SC, 2003. Bioactive metabolites from *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma longibrachiatum*. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia* **17**(2), 185-190.

Troian RF, Steindorff AS, Ramada MHS, Arruda W, Ulhoa CJ, 2014. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. *Biotechnology Letters* **36**(10): 2095-2101.

Tseng SC, Liu SY, Yang HH, Lo CT, Peng KC, 2008. Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* EST323 in response to *Rhizoctonia solani*. *Journal of agriculture Food Chemistry* **56**: 6914-6922.

Wang SL, Hsiao WJ, Chang WT. 2002 Purification and characterization of a antimicrobial chitinase extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCRC31499 in a shrimp and crab shell powder medium. *Journal Agricultural and Food chemistry*. **50**: 2249-2255.

Wilm M, Shevchenko A, Houthaeve T, Breit S, Schweigerer L, Fotsis T, Mann M. 1996. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* **379**(6564): 466–9.

Whipps JM, Lumsden RD. 2001. *Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects*. In: T., B.; C., J.; N., M. (Eds.). *Fungal Biocontrol*

Agents: Progress, Problems and Potential. Wallingford: CABI Publishing, p. 9.

Wijesinghe CJ, Wijeratnam RSW, Samarasekara JKRR, Wijesundera RLC, 2011. Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple caused by *Thielaviopsis paradoxa*. *Crop Protection* **30**(3): 300–306.

Yang HH, Yang SL, Peng KC, Lo CT, Liu SY, 2009. Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* **113**: 924-932.

Verma D, Satyanarayana T, 2012. Molecular approaches for ameliorating microbial xylanases. *Bioresource Technology* **17**: 360–367.

Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Woo SL, Nigro M, Marra R, Lombardi N, Pascale A, Ruocco M, Lanzuise S, Manganiello G, Lorito M, 2014. *Trichoderma* Secondary Metabolites Active on Plants and Fungal Pathogens. *The Open Mycology Journal* **8**(Suppl-1, M5): 127-139.

Viterbo A, Ramot O, Chernin L, Chet I, 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**(1): 549–556.

Vos CMF, De Cremer K, Cammue BPA, De Coninck B, 2015. The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. *Molecular Plant Pathology* **16**(4): 400–412.

## CAPÍTULO 9 - Comparação da secretônica de *T. atroviride* T17 e *T. harzianum* T1A

A análise dos secretomas das estirpes *T. atroviride* T17 e *T. harzianum* T1A permitiu a comparação da expressão das proteínas extracelulares secretadas por estes organismos. As únicas proteínas encontradas em ambas as espécies de *Trichoderma* estudadas com as mesmas funções são: glucoamylase, glicosil hidrolase (GH) família 76, quitinase e mutanase.

Foram identificadas 59 proteínas dos 116 “spots” diferencialmente expressos pelo antagonista *T. atroviride* T17 (exclusivos no meio contendo micélio de *G. citricarpa*, exclusivos do meio controle e ainda proteínas presentes em ambos os meios, mas com maior expressão no meio contendo micélio do patógeno). Destaca-se a presença de GH (famílias 3, 43, 54, 76 e 93), quitinase, mutanase, α-1,3-glucanase, α-1,2-manosidase, glucan 1,3-β-glucosidase, α-galactosidase e Protease Neutra 2.

Para *T. harzianum* T1A, foram identificadas 66 proteínas dos 178 spots diferencialmente expressos. Destas, destacam-se glicosil hidrolases das famílias 2, 17, 31, 55, 71, 76, quitinase, mutanase, β-1,3-exoglucanase, β-1,6-glucanase, L-aminoácido oxidase, Serina protease e proteína Epl1.

Verificamos que *T. atroviride* T17, apresentou uma maior expressão de proteínas no meio contendo micélio de *G. citricarpa*, do que no meio controle (contendo dextrose), o que já era esperado, de acordo com outros trabalhos (Geremia et al. 1993, Goldman & Goldman 1998, Pozo et al. 2004, Almeida et al. 2007, Suárez et al. 2007, Tseng et al. 2008, Yang et al. 2009, Monteiro et al. 2010, Pereira et al. 2014, Ramada et al., 2015). De acordo com a literatura a maioria das proteínas secretadas no meio contendo fitopatógeno estão relacionadas com processos de micoparasitismo (apresentam atividade hidrolítica), enquanto que no meio controle a maioria das proteínas está relacionada com o metabolismo primário do antagonista.

Pelo contrário, *T. harzianum* secretou um número maior de proteínas no meio controle do que no meio contendo micélio do patógeno. Ao contrário do que acontece com *T. atroviride*, algumas das proteínas encontradas no meio controle estão relacionadas com processos de micoparasitismo (apresentam atividade hidrolítica) de acordo com a literatura. Embora durante a interação com o fitopatógeno, tenham sido

secretadas uma menor quantidade de proteínas, estas em sua maioria encontram-se relacionadas ao micoparasitismo. Sugerindo que esta estirpe de *T. harzianum*, é capaz de secretar normalmente proteínas que possam auxiliar no controle biológico de fitopatógenos, e quando em contato com os mesmo, a sua secreção é destinada ao controle biológico com redução de proteínas para seu metabolismo primário.

## 10. CONCLUSÕES

- O crescimento de *Guignardia citricarpa* Gc3 foi inibido quando utilizado o caldo de cultura de *Trichoderma atroviride* T17, sugerindo a secreção de compostos orgânicos que atuam sobre o fitopatogénio.
- A inibição do crescimento do fitopatógeno foi dependente dos compostos com atividade antifúngica secretados por *Trichoderma atroviride* T17, desenvolvido em diferentes fontes de carbono (glicose, glicose+micélio do patógeno, micélio do patógeno e micélio de antagonista). Destacando-se o meio extracelular de *T. atroviride* na presença do fitopatógeno, mesmo após suplementação com glicose e sais.
- Ambas as espécies de *Trichoderma* demonstraram atividades extracelulares de quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase em meio de cultura enriquecido com micélio de *G. citricarpa* como única fonte de carbono.
- Pela técnica de Proteômica foi possível indicar que os mecanismos moleculares de antagonismo de *T. atroviride* T17 e *T. harzianum* T1A sobre *G. citricarpa* Gc3 estão relacionados com a degradação da parede celular (micoparasitismo), controle biológico e indução de resistência sistêmica da planta.
- O processo de indução de secreção de proteínas extracelulares mostrou-se diferente entre os dois organismos (*T. atroviride* T17 e *T. harzianum* T1A).
- O antagonista *T. atroviride* T17 expressou um maior número de proteínas relacionadas ao controle biológico no meio contendo micélio do patógeno do que no meio controle. Pelo contrário, *T. harzianum* T1A, no meio controle expressou um grande número de proteínas (sobretudo relacionadas ao metabolismo básico mas também como ao controle biológico).
- Após exposição ao micélio do patógeno *G. citricarpa*, embora o número de proteínas tenha sido menor por *T. harzianum* T1A, estas, são na sua maioria relacionadas ao controle biológico, micoparasitismo e indução de resistência sistêmica da planta.

- Os resultados obtidos lançam luz sobre a elevada capacidade de antagonismo das espécies de *Trichoderma*, corroborando a utilização destas estirpes como agentes de controle biológico de *G. citricarpa*.

## **11.PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Desenvolvimento de novas formulações à base de *Trichoderma atroviride* T17 e *T. harzianum* T1A ou suas enzimas com atividade fungicida, mais eficientes no controle de doenças em plantas e menos agressivas para o ambiente e para os produtores.
- Caracterização do metaboloma de *T. atroviride* T17 e de *T. harzianum* T1A com a respectiva identificação dos metabólitos secundários secretados por estes organismos.
- Caracterizar funcionalmente estes metabólitos, identificando os que apresentam atividade sobre o desenvolvimento do fitopatógeno.
- Ampliar os conhecimentos sobre os mecanismos de defesa das plantas estimulados pelo antagonista em relação à presença do fitopatógeno, através de técnicas de proteômica.
- Aplicação de enzimas sintéticas, baseado na identificação das proteínas responsáveis pelo biocontrole da doença, fornecendo novas alternativas de controle do fitopatógeno.

## **12. REFERÊNCIAS**

AGUILAR-VELDOSO, C.I.; RIBEIRO, J.G.B.; FEICHTENBERGER, E.; GOES, A.; SPÓSITO, M.B. **Manual técnico de procedimentos da Mancha Preta dos citros.** Brasília: MAPA/DAS/DDIV, 72p., 2002.

AHMED, A.S.; EZZIYYANI, C.; SÁNCHEZ, C.P.; CANDELA, M.E. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. **European Journal of Plant Pathology**, 109: 633-637. 2003.

ALCOBA, N.J.; VIGIANI, A.R.; BEJARANO, N.V.; ALVAREZ, S.E.; SERRANO, M.A.; BONILLO, M.C. **Mancha negra de los citricos. Epidemiología y control.** San Salvador de Jujuy: Ediciones Universidad Nacional de Jujuy, 56p., 2000.

ALMEIDA, F.N.; CERQUEIRA, F.M.; SILVA, R.M.; ULHOA, C.J.; LIMA, A.L. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*, evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotec. Letters**. 29: 1189-1193.2007.

ALMEIDA, T.F. **Mancha preta dos citros: Expressão dos sintomas em frutos pela inoculação com conídios e controle do agente causal (*Guignardia citricarpa*).** 2009. Tese (Doutorado em Agronomia, produção vegetal). – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 66p. 2009.

ANDRADE, A.G.; PIMENTA, A.A.; GOES, A. Influência do alinhamento de plantio na severidade da Mancha-Preta-dos-Citros, produção e qualidade do suco. **Rev. Brasil. Fruticul.** 31 (4): 1033-1041. 2009.

BALDASSARI, R.B.; BRANDIMARTE, I.; ANDRADE, A.G.; SOUZA, D.C.G.; MORETTO, C; GÓES, A. de. Indução da expressão precoce de sintomas de *Guignardia citricarpa* em frutos de laranjeira “Pêra-rio”. **Rev. Fruticultura** 29: 269-275. 2007.

BECH, L.; BUSK, P.K.; LANGE, L. Cell wall degrading enzymes in *Trichoderma asperellum* grown on wheat bran. **Fungal Genom. Biol.** 4:116. doi: 10.4172/2165-8056.1000116. 2014.

BELETE, E.; AYALEW, A.; AHMED, S. Evaluation of local isolates of *Trichoderma* Spp. against black root rot (*Fusarium solani*) on faba bean. **J. Plant Pathol. Microbiol.** 6(6): 279. 2015.

BELLOTTE, J.A.M.; ANDRADE, A.G. de; CARVALHO, C.R.B.; BALDASSARI, R.B.; GOES, A. de. Desenvolvimento precoce de sintomas da mancha preta causada por *Guignardia citricarpa* em frutos de laranjeira 'Pêra-Rio' através do tratamento com ethephon. **Fitopatologia Brasileira** 26:397S, 2001.

BELLOTTE, J.A.M.; KUPPER, K.C.; RINALDO, D.; SOUZA, A. & GOES, A. The effects of inter-crop cultivation between rows of citrus crop od spreading of *Guignardia citricarpa* ascospores and in the citrus black spot occurrence. **Rev. Brasil. Fruticul.** 35 (1): 102-111. 2013.

BENÍTEZ, T. RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CÓDON, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **Int. Microbiol.** 07: 249–260. 2004.

BERNARDO, E.R.A; BETTIOL, W. Controle da pinta preta dos frutos cítricos em cultivo orgânico com agentes de biocontrole e produtos alternativos. **Trop. Plant Pathol.** 35(1): 037-042. 2010.

BHADAURIA, V., ZHAO, W.S., WANG, L.X., ZHANG. Y., LIU, J.H., YANG, J., KONG, L.A., PENG, Y.L. et al. Advances in fungal proteomics. **Microbiol. Res.** 162:193–200. 2007.

BLACKBURN, KR.; CHENG, FY.; WILLIAMSON, JD.; GOSHE, MB. Data-independent liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS(E)) detection and

quantification of the 53 secreted *Apium graveolens* pathogen defense protein mannitol dehydrogenase. **Rapid Commun Mass Spectrom.** **24**(7): 1009-100616, 2010.

BOUWS, H.; WATTENBERG, A.; ZORN H. Fungal secretomes--nature's toolbox for white biotechnology. **Appl.Microbiol. Biotechnol.** **80**(3):381-8. 2008.

BRUNNER, K.; ZEILINGER, S.; CILIENTO, R.; WOO, S.L.; LORITO, M.; KUBICEK, C.P.; MACH, R.L. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. **Appl. Environ. Microbiol.** **7**: 3959-3965. 2005.

CAIXETA, M.P.; CORAZZAL,M.J.; OLIVEIRA, R.R.; ZANUTTO, C.A.; NUNES, W.M.C. e VIDA, J.B. Caracterização morfológica e identificação molecular de isolados de *Guignardia citricarpa*, agente patogênico da mancha preta dos citros . **Acta Sci. Agron.** **30**: 625-630, 2008.

CANALE, M.C.; BENATO, E. A.; CIA, P.; HADDAD, M.L.; PASCHOLATI, S.F. *In vitro* effect of UV-C irradiation on *Guignardia citricarpa* and on postharvest control of citrus black spot .**Trop. Plant Pathol.** **36** (6): 356-361. 2011

DAL SOGLIO, F.K.; ABIB, E.N.; BONINE, D.P. O grupo de Citicultura Ecológica: Aprendendo com a Participação. **Agricultura**, **3** (4): 11-14, 2006.

DE LA CRUZ, J.; PINTO-TORO, J.A.; BENITEZ, T.; LLOBELL, A.; ROMERO, L.C. A novel endo beta-1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. **J. Bacteriol.** **177**: 6937-6945. 1995.

DELGADO-JARANA, J.; RINCÓN, A.M.; BENÍTEZ, T. Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization. **Microbiology**, **148** (Pt 5):1305-15. 2002

DE MARCO, J.L.; VALADARES-INGLIS, M.C.; FÉLIX, C.R. Production of  
118

hydrolytic enzymes by *Trichoderma* sp. isolate with antagonistic activity against *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom of cocoa. **Brazil. J. Microbiol.** 34: 33-38. 2003.

DE MARCO, J.L.; FÉLIX, C.R. Purification and characterization of a beta-glucanase produced by *Trichoderma harzianum* showing biocontrol potential. **Brazil. Archiv. Biol. Technol.** 50(1): 21-29. 2007.

DJONOVIC, S.; POZO, M.J.; DANGOTT, L.J.; HOWELL, C.R.; KENERLEY, C.M. Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. **Mol. Plant Microbe Interact.** 19(8): 838–853. 2006.

DO VALE, L.H.F.; GÓMEZ-MENDOZA, D.P.; KIM, M.S.; PANDEY, A.; RICART, C.A.O., FILHO, E.X.F.; SOUSA, M.V. Secretome analysis of the fungus *Trichoderma harzianum* grown on cellulose. **Proteomics** 12 (17): 2716–2728. 2012.

EL-KATANY, M.H.; SOMITSCH, W.; ROBRA, K.H.; EL-KATATNY, M.S.; GÜBITZ, G.M. Production of chitinase and beta-1,3,glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotiorum rolfsii*. **J. Food Technol. Biotechnol.** 38: 173-180. 2000.

EL-KOMY, M.H.; SALEH, A.A.; ERANTHODI, A.; MOLAN, Y.Y. Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. **Plant Pathol. J.** 31(1): 50-60. 2015.

FAGAN, C.; GÓES, A. Efeito da mancha de frutos cítricos causada por *Guignardia citricarpa* nas características tecnológicas do suco de frutos de laranjeira 'Natal' e 'Valência'. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.26, n.1m p.122, 2000.

FEICHTENBERGER, E. **Mancha-preta dos citros no Estado de São Paulo**. Laranja, Cordeiropolis, v. 17, n. 1, p. 93-108, 1996.

FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M.B.; VIANNA, J.H.T. Tratamentos com fungicidas no controle de mancha preta (*Guignardia citricarpa*) em laranjeiras 'Valência'. **Fitopatologia Brasileira** 28: 310S, 2003.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE, J. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2: 475-476. 2005.

FEICHTENBERGER, E. Pinta preta dos citros. **Frutas e Derivados**. São Paulo. p. 41-43. 2007.

FENG, X.; LIU, X.; LUO, Q.; LIU, BF. Mass spectrometry in systems biology: an overview. **Mass Spectrom. Rev.** 27(6): 635-660, 2008.

FERNANDES, B.C. **Desenvolvimento histórico da citricultura**. 2010. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Econômicas) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Letras de Araraquara, 49p. 2010.

FERNANDES, I.O. **Mecanismo de Infecção de *Diplodia corticola***. Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biologia. 179p. 2015.

FIALHO, M.B. **Efeito in vitro de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. 2004, 60f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Microbiologia agrícola) – escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FIALHO, M.B.; TOFFANO, L.; PEDROSO, M.P.; AUGUSTO, F. & PASCHOLATI, S.F. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 6: 925–932. 2010.

FISCHER, I.H.; PALHARINI, M.C.A.; SPÓSITO, M.B. & AMORIM, L. Doenças pós-colheita em laranja ‘Pêra’ produzida em sistema orgânico e convencional e resistência de *Penicillium digitatum* a fungicidas. **Summa Phytopathol.** **39**(1): 28-34. 2013.

FUNDECITRUS – Fundo de defesa da Citricultura. Novo manejo para a pinta preta. **Revista do Fundecitrus**, Araraquara, 125: 13p. 2004.

FUNDECITRUS – Fundo de defesa da Citricultura. **Manual Técnico sobre pinta preta**. Araraquara. 11p. GHINI, R.& KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 78p. 2005.

GEREMIA, R.A.; GOLDMAN, G.H.; JACOBS, D.; ARDILES, W.; VILA, S.B.; VAN MONTAGU, M.; HERRERA-ESTRELLA, A. Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, prb1, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. **Mol. Microbiol.** **8**(3): 603–613. 1993.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 78p. 2000.

GIESE, E.C.; BARBOSA, A.M.; SILVA, M.L. Glucanases fúngicas: Produção e aplicações das  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 glucanases. **Rev. Bioteclol. Ciênc. Desenvol.** (30): 97-104. 2003.

GODOY, M.F.P. **Atividade antimicrobiana de extratos e frações do cultivo *in vitro* de *Lentinula edodes* contra *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*, *Guignardia citricarpa*, *Colletotrichum sublineolum* e *Tabacco mosaic virus***. Tese (Doutorado em Agronomia: Microbiologia). Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicada. 126p. 2008.

GOLDMAN, M.H.S., GOLDMAN, G.H., *Trichoderma harzianum* transformant has high extracellular alkaline proteinase expression during specific mycoparasitic interactions. **Genet. Mol. Biol.** **21**(3): 1415-4757. 1998.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R.; JORRÍN-NOVO, J. Contribution of proteomics to the study of plant pathogenic fungi. **J. Proteome Res.** **11**(1): 3–16. 2012.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics.** **4**(12): 3665–3685. 2004.

GRINYER, J. MCKAY, M., NEVALAINEN, H., HERBERT, B.R. Fungal proteomics: initial mapping of biological control strain *Trichoderma harzianum*. **Current Genetics** **45**: 163–169. 2004.

GRINYER, J.; HUNT, S.; MCKAY, M.; HERBERT, BR.; NEVALAINEN, H. Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. **Curr. Genet.** **47**(6): 381–388, 2005.

GRINYER, J.; KAUTTO, L.; TRAINI, M.; WILLOWS, R.D.; JUNIOR TE’O, BERGQUIST, P.; NEVALAINEN, H. Proteome mapping of the *Trichoderma reesei* 20S proteasome. **Curr. Genet.** **51**:79–88, 2007.

GROSS, JH. **Mass spectrometry: a textbook.** Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 2004.

GRUBER, S.; ZEILINGER, S. The transcription factor Ste12 mediates the regulatory role of the Tmk1 MAP kinase in mycoparasitism and vegetative hyphal fusion in the filamentous fungus *Trichoderma atroviride*. **PLoS ONE** **9**(10):e111636. doi:10.1371/journal.pone.0111636 2014.

GUIMARÃES, A. **Bioprospecção de microrganismos epífíticos de tangerina cv. Montenegrina para o Manejo da mancha preta dos citros causada por *Guignardia citricarpa*, Kiely.** 2008, 91f. Dissertação (Mestrado - Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

HARAN, S.; SCHICKLER, H; OPPENHEIM, A.; CHET, I. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. **Phytopathology** 86:980–985. 1996.

HARMAN, G.E. HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiol.** 02: 43–56. 2004.

HARMAN, G.E. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology** 96(2): 190-194. 2006.

HOFFMANN, E.; STROOTBART, V. **Mass spectrometry: principles and applications.** 3. Ed. West Sussex, England: Wiley-Interscience, 502p, 2007.

HONG, T.Y.; MENGE, M. Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1,3-beta-glucanase of *Paenibacillus* sp isolated from garden soil. **App. Microbiol. Biotechnol.** 61(5-6): 472-478. 2003.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant disease: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, 87: 4-10, 2003.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Em:  
<http://www.brasilagro.com.br/conteudo/ibge-divulga-terceira-estimativa-para-a-safra20162107-milhoes-de-ton.html#.VupyteIrLIU>. Acessado em 10/02/2016.

INBAR, J.; CHET, I. The role of recognition in the induction of specificchitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*, **Microbiology** 141(11), 2823–2829. 1995.

INCH, S.; WALKER, D.J.; GILBERT, J.; DAAYF, F.; FERNANDO, W.G.D.; PIERCEY-NORMORE, M. The development of a model to predict the potential

efficacy of *Trichoderma harzianum* isolates on perithecial production of *Gibberella zeae* based on secondary metabolite production. **Canad. J. Plant Pathology** **33**(3): 337-346. 2011.

JENSEN, O. Interpreting the protein language using proteomics. **Nat. ver.Rev. Mol. Cell Biol.** **7**(6): 391–403. 2006.

KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* sp.: The ascigerous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of citrus. **Proceding Linneage Society**, Sidney, v.**73**, p. 249-292, 1948.

KIM, Y., NANDAKUMAR, M., MARTEN, M. Proteomics of filamentous fungi. **TRENDS Biotechnol.** **25**(9): 395–400. 2007.

KLOTZ, L.J. Fungal, bacterial, and nonparasitic diseases and injuries originating in the seedbed, nursery, and orchard. In: REUTHER, W.; CALAVAN, E.C.; CARMAN, G.E. (Ed.). **The citrus industry**. Riverside: University of California, **4**: 1-66. 1978.

KNIEMEYER, O. Proteomics of eukaryotic microorganisms: the medically and biotechnologically important fungal genus *Aspergillus*. **Proteomics.** **11**(15): 3232–3243. 2011.

KOLLER, G.E. **Citricultura: laranja, limão e tangerina**. Porto Alegre: Rigel, 446p. 1994.

KOTASTHANE, A.; AGRAWAL, T.; KUSHWAH, R.; RAHATKAR, O.V. *In-vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. Against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* and their response towards growth of cucumber, bottle gourd and bitter gourd. **Europ. J. Plant Pathol** **141**(3): 523-543. 2015.

KOTZÉ, J.M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease.** **65**: 945-950. 1981.

KOTZÉ, J.M. "Black spot," *in:* J. O. Whiteside, S. M. Garnsey, and L. W. Timmer, Eds. **Compendium of Citrus Disease**, pp. 10– 12, APS Press, 1988.

KOTZÉ, J.M. History and epidemiology of citrus black spot in South Africa. **Proceed. Internat. Society Citricult.** **2**:1296-1299. 1996.

KOTZÉ, J.M. **Black spot.** *In:* L.W. Timmer, S.M. Garnsey, J.H. Graham (Eds.), Compendium of Citrus Diseases, APS Press, St. Paul, USA, pp. 23–25. 2000.

KUBICEK, C.P. MACH, R.L.; PETERBAUER, C.K.; LORITO, M. *Trichoderma:* from genes to biocontrol. **J. Plant Pathology** **83**(2): 11–23. 2001.

KUPPER, K.C.; BETTIOL, W.; GOES, A.; SOUZA, P.S.; BELLOTTE, J.A.M. Biofertilizer for control of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **Crop Protection** **25**: 569–573. 2006.

KUPPER, K.C.; CORRÊA, E.B.; MORETTO, C.; BETTIOL, W.; GOES, A. Control of *Guignardia citricarpa* by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma* spp. **Rev. Brasil. Fruticul.** **33**(4): 1111-1118. 2011.

KUPPER, K.C. Palestra: **Utilização de biofertilizantes no controle de doenças de plantas.** Anais VI Congresso Brasileiro de Defensivos Agrícolas Naturais João Pessoa-PB: "Defensivos naturais na agricultura: da prospecção à utilização". 28p. 2013.

LAMDAN, N.L.; SHALABY, S.; ZIV, T.; KENERLY, C.M.; HORWITZ, B.A. Secretome of *Trichoderma* interacting with maize roots: role in induced systemic resistance. **Molec. Cell. Proteomics** **14**: 1054-1063. 2015.

LARANJEIRA, F.F.; FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B. Manejo integrado de doenças dos citros. *In:* Mattos Jr, D. de; De Negri, J.D.; Pio, R.M.; Pompeu Jr, J. (Eds). **Citros** **21**: 631-652. 2005.

LISBOA, B.B.; BOCHESE, C.C.; VARGAS, L.K.; SILVEIRA, J.R.P.; RADIN, B.; OLIVEIRA, A.M.R. Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na eredução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. **Ciência Rural** **37**(5): 1255-1260. 2007.

LIU, P. G; YANG, Q. Identification of genes with a biocontrol function in *Trichoderma harzianum* mycelium using the expressed sequence tag approach. **Res Microbiol**, **156** (3): 416-23, 2005.

LOGUERCIO-LEITE, C.; ESPÓSITO, E. **Fungos: estrutura e ultra estrutura**. In: Educbs (ed.). Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educbs. Fungos: estrutura e ultra estrutura. 2004.

LORITO, M.; HARAMAN, G.E.; HAYES, C.K.; BROADWAY, R.M.; TRONSMO, A.; WOO, S.L.; DI PIETRO, A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. **Phytopathology** **83**: 302-307. 1994.

LORITO, M., WOO, S.L., GARCIA FERNANDEZ, I., COLUCI, G., HARMAN, G.E., PINTOR-TORO, J.A., FILIPPONE, E., MUCCIFORA, S., LAWRENCE, C.B., ZOINA, A., TUZUN, S., SCALA, F. Genes from mycoparasitic fungi as a novel source for improving plant resistance to fungal pathogens. **Proceed. Natio. Academy Scien.** **95**: 7860-7865. 1998.

LUCON, C. M. M.; GUZZO, S. D.; DE JESUS, C. O.; PASCHOLATI, S. F.; DE GOES, A. Postharvest harpin or *Bacillus thuringiensis* treatments suppress citrus black spot in 'Valencia' oranges. **Crop Protection** **29**(7): 766-772. 2010.

MANDELS, M.; WEBER, J. **The Production of cellulases**. Advances in Chemistry Series, Washington, **95**: 391-414. 1969.

MARCELLO, C.M., STEINDORFF, A.S., SILVA, S.P., SILVA, R.N., BATAUS, L.A.M., ULHOA, C.J. Expression analysis of the exo- $\beta$ -1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. **Microbiol. Res.** **165** (1): 75-81. 2010.

MARQUARDT, R.R.; BRENES, A.; ZHANG, Z. et al. Use of enzymes to improve nutrient availability in poultry feedstuffs. **Animal Feed Scie. Technol.** **60**: 321-330, 1996.

MARTIN, F.; KOHLER, A.; DUPLESSIS, S. *Living in harmony in the wood underground: ectomycorrhizal genomics*. **Curr Opin Plant Biol.** **10**: 204–210. 2007.

MARTÍNEZ-MEDINA, A.; ALGUACIL, M.D.M.; PASCUAL, J.A.; WEES, S.C.M.V. Phytohormone Profiles Induced by *Trichoderma* Isolates Correspond with Their Biocontrol and Plant Growth-Promoting Activity on Melon Plants. **J. Chem. Ecol.** **40**(7): 804-815. 2014.

MASSART, S.; JIJAKLI, H.M. Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal biocontrol agents: a review. **J. Microbiol. Methods** **69**: 229-41, 2007.

McINTYRE, M.; NIELSEN, J.; ARNAU, J.; VAN DER BRINK, H.; HANSEN, K., MADRID, S. (eds). **Proceedings of the 7th European Conference on Fungal Genetics**. Copenhagen, Denmark, 2004.

McONIE, K.C. Orchard development and discharge of ascospores of *Guignardia citricarpa* and the onset of infection in relation to the control of citrus black spot. **Phytopathology** **54**(12): 1448-1453, 1964.

McONIE, K.C. Germination and infection of citrus by ascospores of *Guignardia citricarpa* in relation to the control of black spot. **Phytopathology** **57**: 743-746, 1967.

MENDOZA, J.L.H.; PÉREZ, M.I.S.; PRIETO, J.M.G.; VELÁSQUEZ, J.D.Q.; OLIVARES, J.G.G.; LANGARICA, H.R.G. Antibiosis of *Trichoderma* spp strains native to northeastern Mexico against the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Brazilian Journal of Microbiology** **46**(4): 1093-1101, 2015.

MONTEIRO, V.N. **Avaliação do perfil de proteínas secretadas pelo isolado de *Trichoderma harzianum* (ALL42) obtido do solo do Cerrado induzido por fitopatógenos**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Goiás, 86p. 2008.

MONTEIRO, V.N., SILVA, R.N., STEINDORFF, A.S., COSTA, F.T., NORONHA, E.F., RICART, C.A.O., SOUSA, M.V., VAINSTEIN, M.H., ULHOA, C.J. New Insights in *Trichoderma harzianum* Antagonism of Fungal Plant Pathogens by Secreted Protein Analysis. **Curr. Microbiol.** **61**(4): 298-305. 2010.

MURDOCK, D. I.; FOLINAZZO, J. F.; TROY, V. S. Evaluation of plating media for citrus concentrates. **Food Technol.** **6**: 181-185. 1952.

NEVES, M.F.; TROMBIM, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAK, R. O Retrato da Citricultura Brasileira. In: Neves, M. F. (Coord.). 1<sup>a</sup> ed. Ribeirão Preto: Markestrat, 138 p. 2010.

NORONHA, E.F.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P.; ULHOA, C.J. Regulation of a 36Kda  $\beta$ -1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*. **FEMS microbiology Letters**. **188**: 19-22. 2000.

NOZAKI, M.H.; CAMARGO, M.; BARRETO, K M. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, Condições de Temperatura e Luminosidade. **Fitopatol. Bras.** **29**(4): 429-432, 2004.

ODA, K.; KAKIZONO, D.; YAMADA, O.; IEFUJI, H.; AKITA, O.; IWASHITA, K. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under

submerged and solid-state culture conditions. **Appl. Environ. Microbiol.** **72**(5): 3448–3457. 2006.

OLIVEIRA, J.; GRAAFF, L. Proteomics of industrial fungi: trends and insights for biotechnology. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **89**(2): 225–237. (2011).

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and proteomes. **Nature** **405**: 837–846, 2000.

PANDOLFO, J.D. **Otimização do Manejo da pinta preta causada por *Guignardia citricarpa* Kiely na produção ecológica de tangerinas cv. Montenegrina sob a ótica da pesquisa participativa.** Tese (Doutorado em Fitotecnia: Fitopatologia). 177p. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011.

PASCHOLATI, S.F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos.** 1998. Tese (Livre Docência) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 123p. 1998.

PASSEL, M.; SCHAAP, P.; GRAAFF, L. Proteomics of filamentous fungi. In: Toldrá, F., Nollet, L. (ed.). **Proteomics in Foods.** Springer. pp. 563–578. 2013.

PAUL, I.; VAN JOARSVELD, A.S.; KORSTEN, L.; HATTINGH, V. The potential global geographical distribution of Citrus Black Spot caused by *Guignardia citricarpa* (Kiely): likelihood of disease establishment in the European Union. **Crop Protection** **24** (4): 297–308. 2005.

PEREIRA, J.L.; QUEIROZ, R.M.L.; CHARNEAU, S.O.; FELIX, C.R.; RICART, C.A.O.; DA SILVA, F.L.; STEINDORFF, A.S.; ULHOA, C.J.; NORONHA, E.F. Analysis of *Phaseolus vulgaris* response to its association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the presence or absence of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. **PLoS ONE** **9**(5): e98234. 2014.

PITSON, S.M., SEVIOUR, R.J., MCDOUGALL, B.M. Noncellulolytic fungal  $\beta$ -glucanases: their physiology and regulation. **Enz. Microb. Technol** **15**: 178-192. 1993.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; Mac DONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, San Diego, v. 5, p. 141-238, 1953.

POSSIODE, Y.M.; GABARDO, J.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L.V.; AZEVEDO, J.L.; GLIENKE, C. Fungicide resistance and genetic variability in plant pathogenic strains of *Guignardia citricarpa*. **Brazil. J. Microbiol.** **40**: 308-313. 2009.

POZO, M.J.; BAEK, J.M.; GARCIA, J.M.; HENERLEY, C.M. Functional analysis of *tvsp1*, a serine protease-encoding gene in the biocontrol agent *Trichoderma virens*. **Fungal Genet. Biol.** **41**: 336-348. 2004.

PUNJA, Z.K.; UTKHDE, R.S. Using fungi and yeast to manage vegetable crop diseases. **Trends Biotech.** **21**(9): 400-407. 2003.

RAMADA, M.H.S. Análise do secretoma do fungo *Trichoderma harzianum* em presença de glicose e parede celular de *Fusarium solani*. 83p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2010.

RAMADA, M.H.; STEINDORFF, A.S.; BLOCH, C.J.R.; ULHOA, C.J. Secretome analysis of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivated in different media supplemented with *Fusarium solani* cell wall or glucose. **Proteomics**. doi: 10.1002/pmic.201400546. 2015.

RAO, G.S.; REDDY, N.N.R.; SUREKHA, C.H. Induction of plant systemic resistance in legumes *Cajanus cajan*, *Vignaradiata*, *Vigna mungo* against plant pathogens *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata* – a *Trichoderma viride* mediated

reprogramming of plant defense mechanism. **Intern. J. Recent Scient. Resear.** 6(5): 4270-4280. 2015.

RAPUSSI, M.C.C.; PASCHOLATI, S.F.; BENATO, E.A. & CIA, P. Chitosan Reduces Infection by *Guignardia citricarpa*. In: Postharvest ‘Valencia’ Oranges. **Brazil. Archi.Biology Technol.** 52(3): 513-521. 2009.

RIGOLIN, A.T.; TERSII, F.E.A. **Mecanização em Citros.** In: Mattos Jr, D. de; De Negri, J.D.; Pio, R.M.; Pompeu Jr, J. (Eds). Citros. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag 15: 429-447. 2005.

ROCHA, T.L.; COSTA, P.H.A.; MAGALHÃES, J.C.C.; EVARISTO, R.G.S.; VASCONCELOS, E.A.R.; COUTINHO, M.V.; PAES, N.S.; SILVA, M,C,M.; GROSSI-de-SÁ, M.F. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. Comunicado Técnico da Embrapa. Brasília. Outubro, 12p. 2005.

ROBBS, C.F.; PIMENTEL, J.P.; RIBEIRO, R.L. A mancha preta dos citros: identificação da forma perfeita *Guignardia citricarpa* no Estado do Rio de Janeiro. In: **Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 1985, Fortaleza. Resumos, Fortaleza, p. 248. 1985.

RODRIGUES, M.B.C. **Controle de Guignardia citricarpa, agente causal de mancha preta dos citros.** 2006, 68p. Dissertação (Mestrado- Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

RODRIGUES, M.B.C.; SPÓSITO, M.B.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; ANDREOTE, F.D.; ARAÚJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Resistência a Benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta dos citros. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Brasília, n.3, v.42, p. 323-327, 2007.

RODRIGUES, M.B.C. **Transfomação genética e patogenicidade de *Guignardia citricarpa*.** 124p. Tese (Doutorado) - universidade de São Paulo, Escola Superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, 2010.

ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; BIHAN, M.C.,; THAYSEN-ANDERSEN, M.; ROEPSTORFF, P. 2D gels still have a niche in proteomics. **J. Proteomics.** **88**(1): 4–13. 2013.

ROSSÉTTO, M.P.A. **Resistência Veridental e Manejo de Mancha Preta dos citros.** Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração em Tecnologia de Produção Agrícola. Instituto Agronômico, Campinas, SP. 90p. 2009.

RUIZ-HERRERA, J. **Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly** Ed. CRC Press, Boca Raton, p 248. 1992.

SALAS-MARINA, M.A.; ISORDIA-JASSO, M.; ISLAS-OSUNA, M.A.; DELGADO-SÁNCHEZ P, JIMÉNEZ-BREMONT JF, RODRÍGUEZ-KESSLER M, ROSALES-SAAVEDRA, M.T.; HERRERA-ESTRELLA, A.; CASAS-FLORES, S. The Epl1 and Sm1 proteins from *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma virens* differentially modulate systemic disease resistance against different life style pathogens in *Solanum lycopersicum*. **Front. Plant Science** **6**: 77. doi: 10.3389/fpls.2015.00077. 2015.

SCALOPPI, E.M.T.; AGUIAR, R.L.; GOES, A.; SPÓSITO, M.B. Efeito do manejo cultural e químico na incidência e severidade da mancha-preta dos citros. **Rev. Bras. Frutic.** **34** (1): 102-108. 2012.

SCHERM, B., SCHMOLL, M., BALMAS, V., KUBICEK, C.P., MIGHELI, C. Identification of potential marker genes for *Trichoderma harzianum* strains with high antagonistic potential against *Rhizoctonia solani* by a rapid subtraction hybridization approach. **Current Genetics** **55**: 81-91, 2008.

SCHIRMBÖCK, M.; LORITO, M.; WANG, Y.L.; HAYES, C.K.; ARISAN-ATAC, I.; SCALA, F.; HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. **Appl. Environ. Microbiol.** **60**(2):4364–4370. 1994.

Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento do Paraná. Informativo Citros SEAB- Cartilha para identificação da Pinta Preta – 2009. Disponível em: [http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/defis/HLB/cartilha\\_pinta\\_preta\\_1\\_pdf](http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/defis/HLB/cartilha_pinta_preta_1_pdf). Acesso em dezembro 2012.

SINGH, B.N.; SINGH, A.; SINGH, B.R.; SINGH, H.B. *Trichoderma harzianum* elicits induced resistance in sunflower challenged by *Rhizoctonia solani*. **J. Appl. Microbiol.** (3): 654–666. 2014.

SMITH, J.H. A study of the effect of various disease control programs on spore releases of the citrus black spot pathogen *Guignardia citricarpa* kiely. In: **International Citrus Congress**, Sun City, 1996. Proceedings. Sun City: Internation Society of Citruiculture, 351-352 1996.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI FILHO, S.; BEKÉM PINHEIRO, M.L.; SARQUIS, M.I.DE M.; PEREIRA, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica.** **34**(2): 185 – 195. 2004.

SPARKMAN, O.D. **Mass spectrometry desk reference**, Global View Publishing: Pittsburgh, p. 98. 2006.

SPÓSITO, M.B. **Dinâmica espacial e temporal da manchapreta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados na cultura dos citros.** Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Escola de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L.; BASSANEZI, R.B.; YAMAMOTO, P.T.; FELIPPE, M.R.; CZERMAINSKI, A.B.C. Relative importance of inoculum sources of *Guignardia citricarpa* on the citrus black spot epidemic in Brazil. **Crop Protection** **30**(12): 1546–1552. 2011.

STEINDORFF, A.S. Construção e análise de uma biblioteca de cDNA de *Trichoderma harzianum* crescido na presença de parede celular de *Fusarium solani*. Universidade Federal de Goiás, 59p. 2010.

STEINDORFF, A.S.; RAMADA, M.H.S.; COELHO, A.S.G.; MILLER, R.N.G.; JÚNIOR, G.J.P.; ULHOA, C.S.; NORONHA, E.F. Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. **BMC Genomics** **15**: 204. 2014.

SUÁREZ, M.B.; SANZ, L.; CHAMORRO, I.; REY, M.; GONZÁLES, F.J.; LLOBELL, A.; MONTE, E. Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum* identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. **Fungal Genetics Biology** **42**: 924-934. 2005.

SUÁREZ, M.B.; VIZCAÍNO, J.A.; LLOBELL, A.; MONTE, E. Characterization of genes encoding novel peptidases in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413 using the TrichoEST functional genomics approach. **Curr. Genetics** **51**(5): 331-342. 2007.

TALLA, S.G.; RAJU, A.S.R.; KARRI, S.; KUMAR, Y.S. Production and antagonistic effect of *Trichoderma* spp. against pathogenic microorganisms (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phasealina* and *Rhizoctonia solani*). **Afric. J. Biotech.** **14**(8): 668-675. 2015.

TJALSMA, H.; BOLHUIS, A.; JONGBLOED, J.D.; BRON, S.; VAN DIJL, J.M. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. **Microbiol Mol Biol Rev.** **64**(3): 515-547, 2000.

TOFFANO, L. **Efeito dos extratos do albedo de *Citrus simensis*, *lentinula edodes*, *Agaricus blazei* dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* no controle da mancha preta dos citros.** Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências (Fitopatologia). Piracicaba, 76p. 2010.

TROIAN, R.F. **Análise do secretoma da interacção entre *Trichoderma harzianum* e os estágios de desenvolvimento do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.** Tese apresentada à Pós-graduação em Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília (UnB) para a obtenção do Título de Doutor em Ciências (Biologia Molecular). Brasília-DF. 82p. 2014.

TROIAN, R.F.; STEINDORFF, A.S.; RAMADA, M.H.S.; ARRUDA, W.; ULHOA, C.J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. **Biotech. Letters** **36**(10): 2095-2101. 2014.

VEY, A.R.; HOAGLAND, R.E.; BUTT, T.M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (ed.), **Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problem and Potential**. CABI, Wallingford, p. 311-346. 2001.

VINHAS, T. **Controle químico da *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta dos citros em frutos de laranja ‘Valênci’.** Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da Citricultura como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitossanidade. Araraquara. 41 p. 2011.

VITERBO, A.; RAMOT, O.; CHERNIN, L.; CHET, I. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* ssp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. **Antonie von Leewenhoek** **81**: 549–556. 2002.

VIZCAÍNO, J.A.; GONZÁLEZ, F.J.; SUÁREZ, M.B.; REDONDO, J.; HEERICH, J.; DELGADO-JARANA, J.; HERMOSA, R.; GUTIÉRREZ, R.; MONTE, E.; LLOBELL, A.; REY, M. Generation, annotation and analysis of EST's from *Trichoderma harzianum* CECT 2413. **BMC Genomics** **7**: 193, 2006.

VIZCAÍNO, J.A.; REDONDO, J.; SUÁREZ, M.B.; CARDOZA, R.G.; HERMOSA, R.; GONZÁLEZ, F.J.; REY, M.; MONTE, E. Generation, annotation, and analysis of ESTs from four different *Trichoderma* strains grown under conditions related to biocontrol. **App. Microbiol. Biotechnol.** **75**: 853-862. 2007.

VOS, C.M.F.; DE CREMER, K.; CAMMUE, B.P.A.; DE CONINCK, B. The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. **Molec. Plant Pathol.** **16**(4): 400–412. 2015.

WIJESINGHE, C.J.; WIJERATNAM, R.S.W.; SAMARASEKARA, J.K.R.R.; WIJESUNDERA, R.L.C. Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple caused by (*Thielaviopsis paradoxa*). **Crop Protection** **30**(3): 300–306. 2011.

YANG, H.H.; YANG, S.L.; PENG, K.C.; LO, C.T.; LIU, S.Y. Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. **Mycol. Res.** **113**: 924-932, 2009.

ZULIAN, A.; DÖRR, A.C.; ALMEIDA, S.C. Citricultura e agronegócios no Brasil. **Rev. Elet. Gestão Educ. Tecnol. Ambien.** **11**(11): 2290-2306, 2013.