



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2017

Hélio Lopes Teixeira

Virulência e controlo biológico de *Macrophomina phaseolina*

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2017

Hélio Lopes Teixeira

Virulência e controlo biológico de *Macrophomina phaseolina*

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves, investigador principal do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e co-orientação científica da Doutora Ana Cristina de Fraga Esteves, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

“A mente avança até o ponto onde pode chegar; mas depois passa para uma dimensão superior, sem saber como lá chegou. Todas as grandes descobertas realizaram esse salto.”

Albert Einstein

Aos meus pais e ao meu tio que fizeram de mim aquilo que sou hoje, pois o melhor resultado obtido nesta dissertação de mestrado foi eu perceber todo o esforço e confiança que depositaram em mim. Um muito obrigado é, e será sempre pouco.

o júri

Presidente

Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves

professora associada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Glória Catarina Cintra da Costa Pinto

professora auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Cristina de Fraga Esteves

professora auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Dr. Artur Alves e Dra. Ana Cristina Esteves por me proporcionarem a oportunidade de fazer parte da enorme equipa do Microlab. Um agradecimento muito especial à Dra. Ana Cristina Esteves pela motivação que me deu em momentos mais difíceis e nunca ter desistido de mim. Obrigado por todo o conhecimento transmitido ao longo do meu percurso no Microlab e por toda a paciência que teve comigo.

À Carina, uma das pessoas que mais contribuiu para a realização deste trabalho. Obrigado por toda a ajuda que me deste, serás sempre a minha mentora no Microlab. Obrigado pela insistência e paciência que tiveste comigo. Se um dia for metade da profissional que tu és, serei um grande profissional. Este trabalho é tanto meu como teu.

To Forough, for the daily sympathy and the smile that I will never forget. Always available to help me whenever I need to. You're the best person I've ever met. Forever a friend.

À minha grande amiga Sara Dias, a minha companheira nas noitadas de estudo, foste o meu grande apoio nestes dois últimos anos. Obrigado pela pessoa que és e sempre serás.

Ao Simão, à Diana e ao Tondela, pelo apoio e pela amizade que sempre demonstraram para comigo. Aveiro tornou-se num melhor sitio depois de conhecer-vos.

À minha melhor amiga Anaísa, por todo o apoio, ajuda e amizade ao longo dos 21 anos que nos conhecemos. Que um dia partilhemos o mesmo laboratório!

À Costinha, por toda a motivação e apoio que me deste ao longo da nossa amizade. És o reflexo daquilo que eu me imagino no futuro.

À fantástica equipa que representa o Microlab.

Ao Nuno, ao Jorge, ao Hugo e ao Miguel. Quatro irmãos que a vida me deu!

À Dra. Sílvia Beato, por acreditar sempre em mim e encorajar-me a ir para mestrado. Um grande obrigado do seu eterno aluno!

Aos meus avôs e tio. Embora não presentes, nunca esquecidos. O menino sempre conseguiu!

palavras-chave

Fungos fitopatogénicos, ácido gama-aminobutírico, expressão de proteínas, controlo biológico.

resumo

Macrophomina phaseolina é um fungo fitopatogénico com a capacidade de infetar mais 500 espécies de plantas. A infeção, denominada de podridão carbonosa, é responsável por elevados danos em campos de cultivo. Recentemente, foi descrito como um fungo oportunista em pacientes imunodeprimidos. O ácido gama-aminobutírico (GABA) é um aminoácido não proteínico, ubíquo, que se encontra amplamente distribuído na natureza, em microrganismos, plantas e animais. Desempenha diversos papéis na manutenção do estado fisiológico da planta. A primeira parte deste estudo, consistiu em verificar se o GABA promove a virulência de *M. phaseolina*. Foram selecionadas duas temperaturas (25° e 37°C) e diferentes concentrações de GABA (0, 5 e 10mM). Na análise do crescimento de *M. phaseolina* os resultados obtidos sugerem que o GABA promove um ligeiro aumento no crescimento radial (cm) e um aumento na biomassa (g) de *M. phaseolina* em ambas as temperaturas testadas. Os resultados obtidos na determinação da atividade enzimática extracelular permitem constatar que a 25°C, na presença de GABA, *M. phaseolina* apresenta uma maior atividade amilolítica (%). Verificou-se também que, quando *M. phaseolina* cresce na presença de 5mM de GABA, a 25 e 37°C, a atividade lipolítica (%) é maior. Os resultados obtidos na quantificação da atividade lipolítica permitem constatar que, em ambas as temperaturas de crescimento, quanto maior a concentração de GABA maior é a atividade lipolítica produzida por *M. phaseolina*. Quando se procedeu à quantificação de proteínas extracelulares, apenas a 37°C ocorreu um aumento significativo de proteínas extracelulares secretadas por *M. phaseolina*, na presença de 10mM de GABA. No entanto, os resultados obtidos por SDS-PAGE, sugerem que, em ambas as temperaturas de crescimento, quanto maior a concentração de GABA maior é o número de proteínas secretadas por *M. phaseolina*. A 37°C, na presença de 10mM de GABA, o secretoma de *M. phaseolina* apresentou níveis de fitotoxicidade mais elevados. Os ensaios de citotoxicidade, permitiram constatar que a 37°C, na presença de 5mM de GABA, *M. phaseolina* provocou uma diminuição mais acentuada na viabilidade celular. Os resultados obtidos permitem equacionar um possível papel do GABA na virulência de *M. phaseolina*. A segunda parte deste estudo consistiu em verificar o potencial antagonista de *Trichoderma harzianum* T1A e *Trichoderma atroviride* T17 contra *M. phaseolina*. Os resultados obtidos indicam que *T. harzianum* T1A apresenta propriedades específicas, como a produção de compostos voláteis orgânicos e metabolitos, mais eficazes contra *M. phaseolina*, comparativamente com os produzidos por *T. atroviride* T17. No entanto, ambos podem ser considerados potenciais agentes de controlo biológico contra *M. phaseolina*.

Keywords

Phytopathogenic fungi, gamma-aminobutyric acid, protein expression, biological control.

Abstract

Macrophomina phaseolina is a phytopathogenic fungus with the ability to infect over 500 plant species. The infection, called charcoal rot, is responsible for high damage in crop fields. Recently, it has been described as an opportunistic fungus in immunosuppressed patients. Gamma-aminobutyric acid (GABA) is a non-proteinogenic, ubiquitous amino acid, that is widely distributed in nature on microorganisms, plants and animals. It plays several roles in maintaining the physiological state of the plant. The first part of this study consists in verifying if GABA promotes the virulence of *M. phaseolina*. Two temperatures (25 and 37°C) and different concentrations of GABA (0, 5 and 10mM) were selected. In the growth analysis of *M. phaseolina* the results obtained suggest that GABA promotes a slight increase in growth (cm) and an increase in biomass (g) of *M. phaseolina* at both temperatures tested. The results obtained in the determination of the extracellular enzymatic activity allow to verify that at 25°C, in the presence of GABA, *M. phaseolina* has a higher amyolytic activity (%). It was also found that, when *M. phaseolina* grows in the presence of 5mM GABA at 25 and 37°C, lipolytic activity (%) is higher. The results obtained in the quantification of lipolytic activity allow to verify that, at both growth temperatures, the higher the concentration of GABA, the higher the lipolytic activity produced by *M. phaseolina*. When extracellular proteins were quantified, a significant increase of extracellular proteins secreted by *M. phaseolina* occurred only at 37°C in the presence of 10mM GABA. However, the results obtained by SDS-PAGE, suggest that, at both growth temperatures, the higher the GABA concentration the higher the number of proteins secreted by *M. phaseolina*. At 37°C, in the presence of 10mM GABA, the secretome of *M. phaseolina* had higher phytotoxicity levels. The cytotoxicity assays showed that at 37°C, in the presence of 5mM GABA, *M. phaseolina* caused a more pronounced decrease in cell viability. The results obtained allow equating a possible role of GABA in the virulence of *M. phaseolina*. The second part of this study was to verify the potential antagonist of *Trichoderma harzianum* T1A and *Trichoderma atroviride* T17 against *M. phaseolina*. The results indicate that *T. harzianum* T1A presents specific properties, such as the production of organic volatile compounds and metabolites, more effective against *M. phaseolina*, compared to those produced by *T. atroviride* T17. However, both can be considered as potential biological control agents against *M. phaseolina*.

Índice

Lista de abreviaturas	vii
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	xiii
Capítulo 1: <i>Macrophomina phaseolina</i> , um fungo fitopatogénico	1
1. Introdução.....	3
1.1. <i>Macrophomina phaseolina</i>	3
1.1.1. Taxonomia.....	4
1.1.2. Distribuição global e importância económica	4
1.1.3. Identificação morfológica de <i>M. phaseolina</i>	5
1.1.4. Ciclo de vida.....	6
1.1.5. Fatores predisponentes à infeção.....	7
1.1.5.1 Temperatura.....	7
1.1.6. Mecanismo de infeção	8
1.1.6.1. Atividade enzimática de <i>M. phaseolina</i>	8
1.1.6.2. Toxinas produzidas por <i>M. phaseolina</i>	9
1.1.6.3. Faseolinona.....	9
1.1.7. Sintomas da infeção.....	9
1.1.8. Variabilidade genética de <i>M. phaseolina</i>	10
1.1.9. Identificação molecular	11
1.1.10. Infeção em seres humanos.....	11
Capítulo 2: Interação entre fungos e plantas – o papel das moléculas produzidas pelas plantas.....	13
1. Introdução.....	15
1.1. Papel das hormonas vegetais na interação entre fungos e plantas	15
1.1.1. Ácido giberélico (GA).....	16
1.1.2. Auxinas e citocininas (CKs).....	16
1.1.3. Etileno (ET).....	17
1.1.4. Ácido jasmónico (JA) e ácido salicílico (SA)	18
1.1.5. Ácido abscísico (ABA).....	19
1.2. Ácido gama-aminobutírico.....	20
1.2.1. Metabolismo do GABA em plantas	20

1.2.2. O papel do GABA nas plantas.....	21
1.2.2.1. Defesa contra insetos	21
1.2.2.2. Regulação do pH citosólico.....	22
1.2.2.3. Osmoregulador	22
1.2.2.4. Armazenamento de nitrogénio.....	22
1.2.2.5. Proteção contra o stress oxidativo	22
1.2.2.6. Desenvolvimento da planta	23
1.2.2.7. Sinalização.....	24
1.2.3. Interação entre GABA e fitohormonas.....	24
1.2.4. Papel do GABA na virulência de fungos fitopatogénicos.....	25
2. Objetivos	29
3. Metodologia	31
3.1. Isolado	31
3.2. Meios de cultura.....	31
3.3. Determinação do crescimento	31
3.4. Determinação da biomassa.....	32
3.5. Preparação e adição de GABA aos meios de cultura PDA e PDB	32
3.5.1. Processo de adição de GABA aos meios de cultura PDA e PDB	32
3.6. Determinação da atividade enzimática extracelular.....	33
3.6.1. Meios de cultura	33
3.7. Quantificação da atividade lipolítica.....	38
3.8. Extração total de proteínas extracelulares.....	38
3.8.1. Quantificação de proteínas	39
3.8.2. SDS-PAGE	39
3.8.2.1. Análise dos géis	40
3.9. Liofilização.....	40
3.10. Zimografia.....	40
3.10.1. Atividade proteolítica	41
3.10.2. Atividade lipolítica	41
3.11. Estudos de fitotoxicidade	42
3.12. Avaliação da citotoxicidade	43
4. Resultados e discussão	45

4.1. Caracterização do crescimento de <i>M. phaseolina</i>	45
4.2. Efeito do GABA no crescimento de <i>M. phaseolina</i>	47
4.3. Efeito do GABA na atividade enzimática extracelular de <i>M. phaseolina</i>	51
4.4. Quantificação de atividade lipolítica	58
4.5. Quantificação total de proteínas extracelulares	61
4.5.1. Quantificação de proteínas extracelulares pelo método BCA	61
4.5.2. SDS-PAGE	63
4.6. Zimografia	65
4.6.1. Atividade proteolítica	65
4.6.2. Atividade lipolítica	66
4.7. Ensaio de fitotoxicidade em tomateiros	67
4.8. Ensaio de citotoxicidade	71
5. Conclusão	75
6. Perspetivas futuras	77
7. Anexos	79
7.1. Preparação e plaqueamento do meio de cultura PDA	79
7.2. Preparação do meio de cultura PDB	79
7.3. Inoculação em meio sólido	80
7.4. Determinação do crescimento radial	80
7.5. Crescimento em meio líquido	81
7.6. Determinação da biomassa	81
7.7. Preparação da solução stock de GABA (5M)	82
7.8. Adição de GABA em meio de cultura PDA	83
7.9. Adição de GABA em meio de cultura PDB	83
7.10. Quantificação da atividade lipolítica	84
7.11. Extração total de proteínas extracelulares	85
7.12. SDS-PAGE	86
7.13. Zimografia	89
7.14. Avaliação da citotoxicidade pelo método da Resazurina	93
Capítulo 3: Avaliação do potencial antagonista de <i>Trichoderma harzianum</i> T1A e <i>Trichoderma atroviride</i> T17 contra <i>Macrophomina phaseolina</i>	95
1. Introdução	97

1.1. Controlo biológico.....	97
1.2. <i>Trichoderma</i>	98
1.2.1. Taxonomia.....	99
1.2.2. Caraterísticas gerais de <i>Trichoderma</i> spp.....	99
1.3. <i>Trichoderma</i> como agente de controlo biológico	101
1.3.1. Metabolitos secundários produzidos por <i>Trichoderma</i> spp.....	102
1.3.2. Compostos voláteis orgânicos (CVOs)	102
1.3.3. Produção de enzimas por <i>Trichoderma</i> spp.	103
1.3.4. <i>Trichoderma harzianum</i>	104
1.3.5. <i>Trichoderma atroviride</i>	105
1.4. Controlo biológico de <i>Macrophomina phaseolina</i>	106
2. Objetivos	107
3. Metodologia	109
3.1. Isolados.....	109
3.1.1. Condições de crescimento	109
3.2. Método de oposição direta	109
3.3. Teste de inibição por compostos orgânicos voláteis	110
3.4. Inibição do crescimento de <i>M. phaseolina</i> pelo secretoma de estirpes de <i>Trichoderma</i> , em meio mínimo sólido.....	112
3.5. Inibição do crescimento de <i>M. phaseolina</i> pelo secretoma de estirpes de <i>Trichoderma</i> , em meio mínimo líquido	112
4. Resultados e discussão	115
4.1. Método de oposição direta (MOD)	115
4.2. Testes de inibição por compostos voláteis orgânicos (CVOs).....	119
4.3. Inibição do crescimento de <i>M. phaseolina</i> em MM sólido.....	122
4.4. Inibição do crescimento de <i>M. phaseolina</i> em MM líquido	125
5. Conclusão	129
6. Perspetivas futuras.....	131
7. Anexos.....	133
7.1. Crescimento de <i>T. harzianum</i> T1A e <i>T. atroviride</i> T17 em PDA.....	133
7.2. Método de oposição direta	133
7.3. Teste de inibição por compostos voláteis orgânicos	134

7.4. Inibição do crescimento de <i>M. phaseolina</i> em Meio Mínimo Sólido	135
7.5. Inibição do crescimento de <i>M. phaseolina</i> em Meio Mínimo líquido	136
7.6. Registo fotográfico diário da inibição do crescimento de <i>M. phaseolina</i> por <i>T. harzianum</i> T1A, durante a realização do MOD	138
7.7. Registo fotográfico diário da inibição do crescimento de <i>M. phaseolina</i> por <i>T. atroviride</i> T17, durante a realização do MOD	140
7.8. Registo fotográfico diário inibição do crescimento de <i>M. phaseolina</i> por <i>T. harzianum</i> T1A, em MM sólido.....	142
7.9. Registo fotográfico diário inibição do crescimento de <i>M. phaseolina</i> por <i>T. atroviride</i> T17, em MM sólido.....	144
Capítulo 4: Bibliografia	147

Lista de abreviaturas

- ABA** - Ácido abscísico
- ALMT**- Transporte de malato ativado por alumínio
- ACC**- Ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano
- BCA** - Ácido bicinconínico
- CKs** - Citocininas
- CVOs** - Compostos voláteis orgânicos
- CWDEs** - Enzimas que degradam a parede celular
- DMEM** - Meio de Eagle modificado por Dulbecco
- DMSO** - Sulfóxido de dimetilo
- DTT**- Ditioneitol
- ET** - Etileno
- FA** - Ácido fusárico
- FBS** - Sangue bovino fetal
- GA** - Ácido giberélico
- GABA** - Ácido gama-aminobutírico
- GABA-T** - GABA transaminase
- GAD** - Glutamato descarboxilase
- ITS** - Espaçador transcrito interno
- JA** - Ácido jasmónico
- MM** - Meio mínimo
- MOD** - Método de oposição direta
- PDA** - Agar de batata e dextrose
- PDB** - Caldo de batata e dextrose
- pNP** - p-nitrofenila
- pNPP** - palmitato de p-nitrofenila
- ROS** - Espécies reativas de oxigénio
- rpm** - Rotações por minuto
- SA** - Ácido salicílico

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SSADH - Semaldeído desidrogenase sucínica

TCA - Ácido tricarbóxico

TEMED - N,N,N',N'- tetrametiletenodiamine

Tris - 2-Amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol

Lista de figuras

Capítulo 2

Resultados e discussão

Figura 1: Crescimento de <i>M. phaseolina</i> em meio de cultura PDA.....	45
Figura 2: Desenvolvimento micelial de <i>M. phaseolina</i> em meio de cultura PDB.....	46
Figura 3: Efeito de diferentes concentrações de GABA no crescimento de <i>M. phaseolina</i> , em meio de cultura PDA.....	48
Figura 4: Efeito de diferentes concentrações de GABA no desenvolvimento micelial de <i>M. phaseolina</i> , em meio de cultura PDB.....	49
Figura 5: Aliquotas contendo meio extracelular resultante do crescimento de <i>M. phaseolina</i> em meio PDB, durante 7 dias, a 25°C sobre o efeito de diferentes concentrações de GABA.....	50
Figura 6: Aliquotas contendo meio extracelular resultante do crescimento de <i>M. phaseolina</i> em meio PDB, durante 7 dias, a 37°C sobre o efeito de diferentes concentrações de GABA.....	50
Figura 7: Determinação da atividade amilolítica (%) extracelular de <i>M. phaseolina</i>	52
Figura 8: Determinação da atividade das lacases (%) extracelular de <i>M. phaseolina</i>	54
Figura 9: Determinação da atividade lipolítica (%) extracelular de <i>M. phaseolina</i>	55
Figura 10: Crescimento de <i>M. phaseolina</i> em meio de lípase a 25°C.....	56
Figura 11: Crescimento de <i>M. phaseolina</i> em meio de lípase a 37°C.....	57
Figura 12: Determinação da atividade lipolítica (mUmg ⁻¹) extracelular de <i>M. phaseolina</i> , mediante o efeito de diferentes temperaturas.....	58
Figura 13: Determinação da atividade lipolítica (mUmg ⁻¹) extracelular de <i>M. phaseolina</i> na presença de concentrações crescentes de GABA.....	59
Figura 14: Determinação da concentração de proteínas extracelulares (ug/ul) secretadas por <i>M. phaseolina</i>	62

Figura 15: SDS-PAGE das amostras extracelulares, correspondentes ao secretoma de <i>M. phaseolina</i> , depois de sete dias de incubação, a 25 e 37°C, na presença de concentrações crescentes de GABA.....	63
Figura 16: Atividade proteolítica extracelular de <i>M. phaseolina</i> detetada por zimografia, utilizando gelatina como substrato.....	65
Figura 17: Níveis de fitotoxicidade, baseados numa pontuação (0-4) atribuída às alterações morfológicas das plantas, causados pelo secretoma de <i>M. phaseolina</i>	67
Figura 18: Registo fotográfico das alterações morfológicas do tomateiro induzidas pelo secretoma de <i>M. phaseolina</i> crescido a 25°C, na presença de concentrações crescentes de GABA.....	68
Figura 19: Registo fotográfico das alterações morfológicas do tomateiro induzidas pelo secretoma de <i>M. phaseolina</i> crescido a 37°C, na presença de concentrações crescentes de GABA.....	69
Figura 20: Registo fotográfico dos controlos dos ensaios de fitotoxicidade.....	70
Figura 21: Avaliação do efeito de diferentes concentrações de GABA na verotoxicidade da fração extracelular de <i>M. phaseolina</i> na presença de concentrações crescentes de GABA a 25°C.....	72
Figura 22: Avaliação do efeito de diferentes concentrações de GABA na verotoxicidade da fração extracelular de <i>M. phaseolina</i> na presença de concentrações crescentes de GABA a 37°C.....	73

Capítulo 3

Metodologia

Figura 1: Desenho esquemático do MOD.....	110
Figura 2: Desenho esquemático do teste de inibição por CVOs.....	111

Resultados e discussão

Figura 3: Inibição do crescimento micelial (cm) de <i>M. phaseolina</i> por <i>T. harzianum</i> T1A, segundo o MOD.....	115
Figura 4: Registo fotográfico do sétimo dia da inibição do crescimento micelial de <i>M. phaseolina</i> por <i>T. harzianum</i> T1A, segundo o MOD.....	116
Figura 5: Inibição do crescimento micelial (cm) de <i>M. phaseolina</i> por <i>T. atroviride</i> T17, segundo o MOD.....	116
Figura 6: Registo fotográfico do sétimo dia da inibição do crescimento micelial de <i>M. phaseolina</i> por <i>T. atroviride</i> T17, segundo o MOD.....	117
Figura 7: Inibição do crescimento micelial (cm) de <i>M. phaseolina</i> induzida pela produção de CVOs de <i>T. harzianum</i> T1A.....	119
Figura 8: Registo fotográfico da inibição do crescimento micelial de <i>M. phaseolina</i> induzida pela produção de CVOs de <i>T. harzianum</i> T1A.....	119
Figura 9: Inibição do crescimento micelial (cm) de <i>M. phaseolina</i> induzida pela produção de CVOs de <i>T. atroviride</i> T17.....	120
Figura 10: Registo fotográfico da inibição do crescimento micelial de <i>M. phaseolina</i> induzida pela produção de CVOs de <i>T. atroviride</i> T17.....	120
Figura 11: Análise do crescimento micelial (cm) de <i>M. phaseolina</i> na presença de secretoma de <i>T. harzianum</i> T1A.....	122
Figura 12: Registo fotográfico da inibição do crescimento micelial de <i>M. phaseolina</i> induzida pela presença de secretoma de <i>T. harzianum</i> T1A.....	122
Figura 13: Análise do crescimento micelial (cm) de <i>M. phaseolina</i> na presença de secretoma de <i>T. atroviride</i> T17.....	123
Figura 14: Registo fotográfico da inibição do crescimento micelial de <i>M. phaseolina</i> induzida pela presença de secretoma de <i>T. atroviride</i> T17.....	123
Figura 15: Análise da biomassa micelial (g) de <i>M. phaseolina</i> na presença de secretoma de <i>T. harzianum</i> T1A.....	125
Figura 16: Análise da biomassa micelial (g) de <i>M. phaseolina</i> na presença de secretoma de <i>T. atroviride</i> T17.....	125

Anexos

- Figura 17:** Registo fotográfico diário da inibição de *M. phaseolina* por *T. harzianum* T1A, do dia um ao sétimo dia de crescimento, e também no 10º e 15º dia de crescimento.....139
- Figura 18:** Registo fotográfico diário da inibição de *M. phaseolina* por *T. atroviride* T17, do dia um ao sétimo dia de crescimento, e também no 10º e 15º dia de crescimento.....141
- Figura 19:** Registo fotográfico diário do crescimento de *M. phaseolina* em MM sólido contendo secretoma de *T. harzianum* T1A.....143
- Figura 20:** Registo fotográfico diário do crescimento de *M. phaseolina* em MM sólido contendo secretoma de *T. atroviride* T17.....145

Lista de tabelas

Capítulo 2

Resultados e discussão

Tabela 1: Peso molecular aparente das proteínas extracelulares produzidas por <i>M. phaseolina</i> , crescido a 25 e 37°C, mediante o efeito de concentrações crescentes de GABA, detetadas por SDS-PAGE.....	64
--	----

Capítulo 1: *Macrophomina phaseolina*, um fungo fitopatogénico

1. Introdução

1.1. *Macrophomina phaseolina*

Macrophomina phaseolina é um fungo fitopatogénico com a capacidade de infetar mais de 500 espécies de plantas¹. É descrito na literatura como um fungo polífago, apresentando a particularidade de poder sobreviver no solo e em restos de plantas infetadas por mais de 15 anos. Possui uma elevada distribuição heterogénea, que se traduz posteriormente no grande número de hospedeiros que infeta². Tal distribuição deve-se ao facto de este fungo conseguir infetar diferentes tipos de angiospérmicas. Deste modo, a infeção causada por *M. phaseolina*, denominada podridão carbonosa, pode afetar qualquer parte da planta³.

O grau de complexidade anatómica e fisiológica manifestada pelos diversos tipos de hospedeiros que infeta, os diversos fatores de virulência produzidos mediante a presença de diferentes fatores de stress biótico e abiótico, são as bases que sustentam toda esta rede de complexidade que *M. phaseolina* apresenta⁴. É com base neste enquadramento teórico que se torna perceptível a extensa variabilidade fenotípica e genotípica verificada⁵.

A grande diversidade de sintomas manifestados após infeção por *M. phaseolina* eleva a fásquia para resolver toda esta equação composta por diversas variantes, dificultando a correlação entre estas, não se conseguindo obter uma resposta que explique de forma simples e concisa os mecanismos que tornam *M. phaseolina* um fungo com um elevado grau de patogenicidade⁶.

É importante salientar que *M. phaseolina*, segundo alguns relatos clínicos, foi descrito como um fungo patogénico intermitente em seres humanos. Embora não seja conhecido com exatidão o efeito da infeção deste fungo em seres humanos, equaciona-se que este neutralize a imunidade em pacientes imunossuprimidos que estejam submetidos a tratamentos antifúngicos profiláticos⁷.

1.1.1. Taxonomia

A classificação taxonómica de *M. phaseolina* foi alvo de constantes revisões no decorrer dos últimos 100 anos. Atualmente é descrito como um género monotípico, composto apenas por uma única espécie, denominada “*phaseolina*”⁸. A classificação taxonómica deste fungo encontra-se descrita de seguida^{1,8}.

Reino: *Fungi*

Divisão: *Ascomycota*

Classe: *Dothideomycetes*

Ordem: *Botryosphaeriales*

Família: *Botryosphaeriaceae*

Género: *Macrophomina*

1.1.2. Distribuição global e importância económica

Macrophomina phaseolina apresenta uma vasta distribuição geográfica, sendo problemático em zonas com climas áridos e semiáridos. Deste modo, determinadas zonas de África, Europa, Ásia, América do Norte e Sul que reúnam as condições anteriormente referidas, são favoráveis ao desenvolvimento de *M. phaseolina*⁹.

Como referido previamente, *M. phaseolina* apresenta a particularidade de afetar mais de 500 espécies de plantas cultiváveis e selvagens, cujas consequências se traduzem em elevadas perdas económicas anuais na área do setor agrícola. De facto, diversas espécies de legumes e vegetais são afetadas anualmente, uma vez que este fungo pode provocar um largo espectro de doenças, sendo a podridão carbonosa da raiz e do caule as mais comuns¹⁰. As infeções causadas por *M. phaseolina* que anualmente causam maior impacto na economia são nomeadamente na soja, no girassol, no arroz, no morangueiro, no tomateiro, no sorgo, entre outros^{10,11}. No entanto, é de salientar que a importância que determinado produto apresenta para uma determinada economia difere de região para região¹¹. A título de exemplo, foi descrito uma incidência de 70% de *M. phaseolina* em campos de cultivo de sorgo, na região da Baía da Somália¹².

De igual modo, são descritos casos na literatura que correlacionam perdas de rendimento na ordem dos 57% relativamente à produção da planta do sésamo, quando infetadas por *M. phaseolina*. Elevadas perdas económicas na produção de soja, no Brasil, são descritas na literatura¹³. Na Tunísia, Egito e Espanha, *M. phaseolina* é também responsável por elevadas perdas na época de colheita da azeitona¹⁴. A deterioração progressiva dos ecossistemas, causada quando este fungo está presente, é também alvo de uma crescente preocupação pelo impacto que causa na biodiversidade^{14,15}.

1.1.3. Identificação morfológica de *M. phaseolina*

Em meio de cultura agar de batata e dextrose (PDA), o micélio representativo de *M. phaseolina* apresenta uma coloração que varia entre o preto e o castanho, que posteriormente com a idade tende a tornar-se escura. As principais estruturas morfológicas que auxiliam na identificação de *M. phaseolina*, estando de igual modo envolvidas na infeção provocada por este fungo¹⁶, encontram-se descritas detalhadamente de seguida.

Micélio

- ✓ Cresce em meios ricos como o PDA, e quando vegetativo, caracteriza-se pela formação de células monilióides, sendo que o desenvolvimento do septo ocorre na proximidade da ramificação do micélio^{16,17}.

Hifas

- ✓ Encontram-se separadas, sendo que a sua tonalidade hialina inicial tende a tornar-se preta¹⁷.

Esclerócios

- ✓ São numerosos com tonalidade que oscila entre o castanho escuro e o preto, podendo ser visualizados no lado reverso da placa de Petri contendo PDA. Encontram-se inseridos em hifas, podendo estar absorvidos ou na superfície do agar^{16,18}.

Microesclerócios

- ✓ A sua formação resulta da agregação das hifas, com cerca de 50 a 200 células individuais ligadas por um pigmento de melanina. Visualmente apresentam uma coloração preta, sendo que o seu tamanho oscila entre os 50-150µm, dependendo dos tipos de hospedeiros que infeta e do tipo de meio de cultura utilizado. São responsáveis pela longevidade que *M. phaseolina* apresenta¹⁹.

Picnídios

- ✓ Compreendem membranas com um ostíolo truncado ou definido. Possuem forma de bastão com um comprimento que varia entre 0 a 15µm²¹. São constituídos por duas camadas, uma interna (hialina) e outra externa, constituída por células que conferem uma cor preta^{18,20}.

Conídios

- ✓ Morfologicamente são unicelulares, hialinos e obovoides, podendo apresentarem uma base truncada que se pode tornar arredondada. Apresentam dimensões compreendidas entre 5-10 × 14-30µm¹⁹.

1.1.4. Ciclo de vida

Macrophomina phaseolina apresenta a particularidade de possuir duas subfases assexuadas, a fase saprófita (*Rhizoctonia bataticola*), durante a qual se forma o micélio e os microesclerócios, e a fase patogénica (*M. phaseolina*) comumente presente nos tecidos hospedeiros de plantas infetadas, onde se originam o micélio, os microesclerócios e os picnídios. A transmissão deste fungo ocorre maioritariamente por sementes infetadas, embora visualmente não apresentem qualquer sinal de infeção²¹.

1.1.5. Fatores predisponentes à infecção

Dois fatores que estão diretamente relacionados não só com a incidência, mas também com a severidade da infecção de *M. phaseolina*, são nomeadamente a temperatura do solo²² e o défice hídrico²³. É descrito na literatura que a infecção por *M. phaseolina* é mais comum quando uma determinada planta se encontra sobre situações de stress, nomeadamente durante períodos de seca extrema e ambientes em que a evaporação do solo e a transpiração das plantas é maior. De facto, a existência de um baixo potencial hídrico, não só potencia a suscetibilidade da planta, como reduz de forma acentuada a atividade antagónica de determinados microrganismos^{22,23}. A produção em grande quantidade de microesclerócios perante condições de baixo potencial osmótico demonstra como a seca favorece o processo infeccioso, mesmo com baixíssimo teor de humidade e oxigénio coadjuvado com uma baixa densidade do solo¹³.

1.1.5.1 Temperatura

O efeito da temperatura no crescimento e patogenicidade de *M. phaseolina* tem sido largamente investigado. No entanto, não existe uma resposta exata, uma vez que diferentes isolados de *M. phaseolina*, de origens geográficas diferentes, apresentam um crescimento diferente perante as mesmas temperaturas de crescimento. Apesar desta discrepância entre os diferentes isolados de *M. phaseolina*, é descrita uma temperatura ótima de crescimento micelial que oscila entre os 25 e 33°C²².

O mesmo se verifica na patogenicidade que *M. phaseolina* apresenta, a qual está diretamente relacionada com a temperatura de crescimento, mas também com o tipo de hospedeiro que infeta. É descrito que a patogenicidade de *M. phaseolina* é maior na presença de temperaturas elevadas, uma vez que condições de seca extrema diminuem a resistência das plantas, sendo, portanto, um fator chave no processo de infecção de *M. phaseolina* a determinado hospedeiro^{13,22,23}.

1.1.6. Mecanismo de infecção

A principal fonte de infecção primária reside nos microesclerócios presentes no solo, em restos de plantas e sementes infetadas. A germinação dos microesclerócios, favorável a uma temperatura entre os 28-35°C, permite a formação do tubo germinativo o que por sua vez permite o desenvolvimento da apresoria²⁴. Uma vez ocorridas estas etapas, segue-se a penetração nas células da parede epidérmica do hospedeiro, a qual pode ser conseguida através de diversos mecanismos, podendo estes serem mecânicos, processos de digestão enzimática ou por via de aberturas naturais²⁵. Segue-se o crescimento das hifas, que ocorre intracelularmente no córtex e posteriormente no xilema colonizado no tecido vascular. A obstrução mecânica dos vasos do xilema pelos microesclerócios, ação enzimática e toxinas fazem com que a planta fique murcha e seque, sendo que a quebra na região do caule é comum, o que origina a morte da planta, começando deste modo um novo ciclo de doença^{15,26}.

1.1.6.1. Atividade enzimática de *M. phaseolina*

Macrophomina phaseolina possui diversos mecanismos de patogenicidade que fazem parte do mecanismo de infecção anteriormente referido. Deste modo, enzimas que degradam a parede celular (CWDEs), revestem-se da maior importância durante a fase de invasão e penetração de um determinado hospedeiro²⁷.

As endoglucanases, são descritas na literatura como umas das enzimas mais importantes na patogénese de *M. phaseolina*²⁸. Outras enzimas, produzidas por *M. phaseolina*, que tem um papel ativo no desenvolvimento da doença são nomeadamente as proteases, pectinases, xilanases²⁹, amílases³⁰, lípases, fosfatidases³¹, celulases e hemicelulases³².

Para além da produção destas enzimas, são ainda descritas na literatura, a produção enzimas de despolimerização de lignina, tais como lacases, galactose oxidases, cloroperoxidases, haloperoxidases e hemoperoxidases³³.

1.1.6.2. Toxinas produzidas por *M. phaseolina*

As toxinas produzidas por *M. phaseolina* favorecem a penetração, invasão e colonização do tecido hospedeiro ao diminuir a resistência sistêmica das plantas, sendo a sua produção mais comum nos estágios iniciais da infecção. As principais toxinas produzidas por *M. phaseolina* são nomeadamente a asperlina, isoasperlina, fomalactona, ácido faseolínico, botriodiplodina e faseolinona^{15,34}.

1.1.6.3. Faseolinona

Apesar do elevado número de toxinas produzidas por *M. phaseolina*, a toxina faseolinona, uma exotoxina resistente ao calor, é produzida em maior quantidade no início da doença³⁵. É descrito que esta toxina é responsável por inibir a germinação das sementes, causando murchamento nestas, assim como lesões necróticas. No entanto, o papel que as toxinas anteriormente referidas desempenham na infecção, os mecanismos pelos quais são produzidas, a sua síntese e a interação com as células hospedeiras, não são conhecidos com total exatidão³⁶.

1.1.7. Sintomas da infecção

A sintomatologia manifestada após infecção por *M. phaseolina* tende a variar mediante diversos fatores, nomeadamente o tipo de planta e a idade que esta possui no momento da infecção³⁷. Na soja, os primeiros sintomas observados após infecção, traduzem-se numa alternância de cor, ficando a planta com uma cor amarelada, sendo mais comum na época de formação das vagens, produzidas por uma grande variedade de plantas. À medida que esta alternância de cor se torna mais acentuada, a planta torna-se murcha²⁴.

As alterações visualizadas ao nível da raiz são sintomas importantes que auxiliam na identificação da infecção. Deste modo, o facto de a epiderme da raiz estar solta, permite constatar a existência de pontos negros (microesclerócios). Quando se visualiza a medula

com micélio cotonoso e escuro, significa que os microesclerócios estão incrustados na camada externa do córtex²⁷.

Uma das principais características da infecção provocada por *M. phaseolina* reside no facto de as folhas permanecerem caídas, embora aderentes, tornando-se posteriormente secas com uma coloração castanho escuro³⁵.

1.1.8. Variabilidade genética de *M. phaseolina*

A enorme variabilidade genética que *M. phaseolina* apresenta deve-se a diversos mecanismos e fatores ambientais. Deste modo, mecanismos como a recombinação mitótica, a fusão das hifas e a possível ocorrência de mutações, são responsáveis por gerar uma enorme variação genética, que por sua vez origina uma enorme diversidade ao nível do fenótipo^{37,38}. É descrito na literatura a existência de um elevado grau de polimorfismos entre isolados de *M. phaseolina* com a mesma localização geográfica, o que enaltece de forma exponencial a variabilidade genética referida anteriormente³⁹.

Esta variação pode ser correlacionada com diferentes hospedeiros, localização geográfica, práticas agrícolas, entre outros fatores. De facto, diferentes isolados de *M. phaseolina* podem apresentar níveis de fitopatogenicidade diferentes em hospedeiros com origem geográfica diferente⁴⁰. É importante salientar que o mesmo se verifica com o genoma de *M. phaseolina*, sendo que tal relação sugere a origem de um ancestral comum que infetou durante gerações diferentes hospedeiros em inúmeros campos de cultivo⁴⁰. A propagação e posterior variabilidade genética de *M. phaseolina* pode ser explicada mediante outros acontecimentos, nomeadamente a troca de germoplasma, solo infetado com esclerócios e importação de semente infetadas⁴¹.

Um facto que merece especial atenção diz respeito à rotação de culturas, as quais diminuem o nível de especiação quanto ao hospedeiro a infetar. De facto, os sistemas agrícolas modernos são um fator muito importante a ter em conta, uma vez que estes são responsáveis pela criação de grandes áreas de campos de cultivo uniformes e homogêneos. O resultado final traduz-se numa enorme pressão seletiva sobre o fungo, o qual é obrigado a adaptar-se às condições existentes⁴². O mesmo se aplica à utilização exagerada de fungicidas a que *M. phaseolina* é exposto. A resistência genética a estes compostos

permitiu não só aumentar a variabilidade genética, mas também dificultar o controlo do fungo⁴³.

1.1.9. Identificação molecular

Para se conseguir, a nível molecular, uma identificação e deteção precisa de *M. phaseolina*, tem-se recorrido nos últimos anos a primers específicos e sondas, tendo como principal alvo o gene cluster rDNA (DNA ribossomal). Os primers MpKF1 e MpKR1 desenhados a partir das sequências conservadas das regiões ITS apresentam uma elevada especificidade, sendo responsável por produzir um produto específico de 350bp, o qual não está presente em outros fungos fitopatogénicos do solo⁴⁴.

As sondas de oligonucleotídeos MpKH1, desenhadas a partir da região ITS, têm sido utilizadas devido ao facto de estas conseguirem efetuar uma identificação, baseada em sequências específicas, perante concentrações mínimas de amostra. No entanto, é comum a ocorrência de falsos positivos. A técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real, coadjuvada com a técnica TaqMan, tem sido utilizada para a identificação e quantificação de *M. phaseolina*, tanto no solo como em plantas⁴⁴.

1.1.10. Infecção em seres humanos

A infecção em seres humanos por *M. phaseolina* é pouco descrita na literatura sendo raros os casos mencionados, equacionando-se que o principal fator que propicia a infecção é o contacto com o solo infetado⁷.

O primeiro caso descrito na literatura diz respeito a um paciente que foi submetido a um transplante renal, o qual se encontrava imunodeprimido. De um ponto de vista clínico, um dos principais sintomas manifestados é a neutropenia⁷.

Outros casos descritos na literatura da infecção de *M. phaseolina* em seres humanos, são nomeadamente, infecção cutânea numa criança com leucemia mieloide aguda⁴⁵ e queratite fúngica num paciente com doença renal crónica⁴⁶. Em ambos os casos, o Voriconazol e o Posaconazole, medicamentos antifúngicos, apresentaram boa resposta quando

administrados. As técnicas moleculares, técnicas de PCR baseadas na sequenciação de DNA, tendo como alvo a região ITS, foram fulcrais na identificação de *M. phaseolina* em ambos os casos, contribuindo para um diagnóstico final precoce, o que posteriormente permitiu a administração de uma terapêutica adequada^{45,46}.

Capítulo 2: Interação entre fungos e plantas – o papel das moléculas produzidas pelas plantas

1. Introdução

1.1. Papel das hormonas vegetais na interação entre fungos e plantas

Fungos e plantas podem estabelecer diferentes relações, nomeadamente relações mutualistas ou parasíticas (patogénicas)^{47,48}. Diversas hormonas vegetais produzidas por plantas são também produzidas por fungos mutualistas e patogénicos. Em ambos os casos, as hormonas produzidas apresentam similaridades desde os mecanismos que permitem a sua síntese à sua estrutura. Destas hormonas é importante salientar as auxinas, ácido giberélico (GA), citocininas (CKs), etileno (ET), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA) e ácido jasmónico (JA)⁴⁹.

O papel que estas hormonas vegetais desempenham, quando produzidas por plantas, encontra-se amplamente descrito na literatura, destacando-se a sua importância no controlo do desenvolvimento na planta e a sua participação em eventos de sinalização celular, quando sujeita a stress biótico e abiótico, ou seja, atuam como mecanismos de resistência face a possível doença⁵⁰.

No caso dos fungos mutualistas, a produção de hormonas está intimamente relacionada com alterações da raiz da planta, necessárias para que se estabeleça uma interação⁵¹.

No entanto, o papel que estas hormonas desempenham, quando produzidas por fungos patogénicos, na invasão dos tecidos e no desenvolvimento do fungo no interior da planta, assim como no grau de fitopatogenicidade, é escassamente descrito na literatura⁴⁹.

Alguns dados sugerem a existência de dois possíveis modos de ação por parte de substâncias similares a hormonas, produzidas por fungos fitopatogénicos, sendo eles, a perturbação de diversos processos da planta, com o intuito de favorecer a captura de nutrientes e a invasão, e a possibilidade de tais moléculas poderem atuar como sinais para que o fungo consiga adaptar-se a determinado ambiente⁴⁹.

Com o intuito de estabelecer uma comparação relativamente ao papel que diferentes hormonas desempenham, mediante o facto de serem produzidas por fungos fitopatogénicos ou plantas, será descrito de seguida uma analogia de dados mediante a informação anteriormente referida.

1.1.1. Ácido giberélico (GA)

É responsável por promover e controlar diversos fatores no crescimento da planta, nomeadamente a divisão celular, germinação das sementes, alongação e tempo de florescimento. A sua produção encontra-se aumentada mediante situações de stress biótico e abiótico⁵².

A produção de GA por diversas espécies de fungos é conhecida. No entanto o efeito que causa nos fungos do ponto de vista biológico não é conhecido com exatidão⁴⁹. Estudos permitiram constatar que em meio líquido o GA aumentou a germinação conidial e promoveu o crescimento de *Neurospora crassa*⁵³. Equaciona-se que a produção de GA por parte do fungo é crucial para iniciar um sinal que origine uma crescente atividade de dissipação de carbono da célula infetada. Outros estudos permitiram estabelecer uma correlação entre a quantidade de GA produzido por diferentes estirpes de *Gibberella fujikuroi* e o seu efeito na virulência, a qual se encontrava aumentada consoante uma maior produção de GA⁵⁴.

1.1.2. Auxinas e citocininas (CKs)

Ambas as hormonas desempenham um papel importante no crescimento e desenvolvimento da planta. Foi demonstrada a importância das CKs nas plantas através da sua capacidade de atuar como sinal a curtas e longas distâncias, tendo um papel crucial na regulação das atividades e manutenção do meristema da raiz⁵⁵. De facto, é descrito na literatura que as CKs promovem e regulam a diferenciação celular que ocorre ao nível da raiz do meristema. É curioso, o facto de as CKs apresentarem uma enorme associação com as auxinas, as quais promovem a divisão celular e as CKs, que posteriormente promovem a diferenciação celular. Deste modo, as auxinas revelam-se de maior importância na fisiologia da planta porque também se encontram envolvidas na manutenção do meristema da raiz, tendo a função exógena de aumentarem o tamanho do meristema. São de igual modo responsáveis por controlarem as respostas a stress biótico e abiótico em plantas^{56,57}.

No entanto, tanto CKs como auxinas são produzidas por fungos fitopatogénicos. Diversos estudos sugerem que ambas as hormonas podem desempenhar um papel importante na

fitopatogenicidade de fungos, estando envolvidas no desenvolvimento das hifas e captura de nutrientes⁴⁹.

No entanto, é importante salientar que nem todos os fungos fitopatogénicos produzem CKs, sendo que a produção destas hormonas poderá estar dependente do estilo de vida do fungo. É descrito que as CKs estão envolvidas em muitas doenças causadas por fungos, ao induzirem a formação de tumores nos hospedeiros. No entanto, o conhecimento de que as CKs promovem virulência em determinados fungos ainda não é conhecido com exatidão⁵⁸. Relativamente às auxinas, suspeita-se que a sua produção por parte de fungos fitopatogénicos, esteja relacionada com um papel endógeno nestes. É descrito que o tratamento com auxinas promove a esporulação e alongação celular em *Saccharomyces cerevisiae*, sendo que também promovem o crescimento das hifas em *Candida albicans*⁵⁹. No entanto, quando testadas em *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, reduziram significativamente a germinação de esporos⁶⁰. Segundo uma revisão recentemente publicada, as auxinas parecem desempenhar um papel importante na fitopatogenicidade de fungos, estando envolvidas no processo de interação fungo/planta⁴⁹.

Estabelecendo uma correlação entre *M. phaseolina* e auxinas produzidas pela planta, é descrito que este fungo apresenta a capacidade de modular e inibir a expressão diversos genes relacionados com a produção, transporte, resposta a estímulos e sinalização de auxinas, as quais desempenham um papel importante na defesa contra *M. phaseolina* durante a fase inicial da infeção⁶¹.

1.1.3. Etileno (ET)

É um importante regulador durante o crescimento e desenvolvimento da planta. Está diretamente envolvido na germinação de sementes, desenvolvimento e crescimento das raízes, formação de raízes adventícias, floração, determinação do sexo e senescência de folhas e flores⁶².

Medeia diversas respostas adaptativas face a uma grande variedade de situações, nomeadamente alta salinidade, seca, inundações e ataques de agentes patogénicos. No entanto, é o papel que desempenha no amadurecimento de frutas climatéricas, como o tomate, que torna este composto volátil uma das hormonas mais importantes no ciclo de

vida da planta⁶³. No entanto, é descrito na literatura a produção de etileno (ET), através da biossíntese da metionina e seus derivados, mediada por uma série de reações enzimáticas, por um grande número de fungos, de entre os quais se destacam o *Botrytis cinerea* e *Sclerotinia sclerotiorum*⁷⁰. A título de exemplo, em *Colletotrichum* sp. o ET é necessário para a formação da appressoria, estando intimamente relacionado com a penetração do fungo no hospedeiro⁶⁵. Quando ocorre uma interação entre planta e fungos patogênicos a concentração de ET aumenta no início, embora a sua origem seja desconhecida⁴⁹. No caso de *M. phaseolina*, é descrito que o etileno confere resistência à planta na fase inicial da infecção⁶⁶.

1.1.4. Ácido jasmônico (JA) e ácido salicílico (SA)

O ácido jasmônico (JA) está diretamente envolvido em diversos aspetos do crescimento da planta, nomeadamente na inibição do crescimento, senescência e abscisão da folha. O seu papel na resposta da planta a ferimentos e na resistência sistémica, durante stress abiótico, é amplamente descrito⁶⁶. Desempenha de igual modo, um papel crucial na proteção da planta contra insetos e determinados microrganismos⁶⁷.

Relativamente ao ácido salicílico (SA), é conhecido por ser uma hormona de sinal com um papel importante na regulação da planta⁶⁸. A possível função de atuar como sinal endógeno, mediando respostas locais e sistémicas de defesa contra agentes patogênicos, tem sido alvo de diversos estudos no decorrer dos últimos anos. É descrito na literatura que o SA, atua nas respostas da planta face a uma grande variedade de fatores abióticos, tais como temperaturas extremas, condições de stress osmótico e oxidativo⁶⁹.

Alguns fungos patogênicos apresentam a particularidade de produzir JA e SA, como *Moniliophthora perniciosa*, no qual se equaciona que a produção destas hormonas é responsável por manipular as vias hormonais envolvidas nas respostas de defesa por parte da planta durante o processo de invasão, causando um desenvolvimento anormal e necrose da planta. A possibilidade do JA e o SA terem um efeito direto no fungo, está relacionada com o facto de ambos promovem em *in vitro* o crescimento de *M. perniciosa*⁷⁰. No entanto, em *Aspergillus flavus*, o SA quando testado *in vitro*, reduziu significativamente o

crescimento das hifas⁷¹. Deste modo, não existem evidências diretas que afirmem que tanto o SA como o JA, são necessários para a virulência de fungos fitopatogênicos⁴⁹.

1.1.5. Ácido abscísico (ABA)

É uma hormona produzida por plantas que desempenha um papel crucial na tolerância a diversos agentes causadores de stress abiótico, nomeadamente a seca, temperaturas elevadas, altas concentrações de sal, stress causado por metais pesados e raios ultravioleta. Atua como uma molécula sinalizadora em várias vias de sinalização quando estimulada pelos fatores anteriormente referidos, sendo também responsável pela regulação do crescimento e modulação da arquitetura da raiz, germinação das sementes, regulação do estroma e senescência foliar⁷².

A produção de ácido abscísico (ABA) por fungos fitopatogênicos é descrita na literatura, sendo que em *Ceratocystis fimbriata*, a aplicação exógena de ABA promove o crescimento micelial⁷³ e em *Magnaporthe oryzae* foi responsável por um aumento na germinação e formação da appressoria⁷⁴. Num outro estudo, tendo como alvo o fungo *B. cinerea*, foi identificado o primeiro gene fúngico, o *bcaba 1*, envolvido na biossíntese do ABA⁷⁵.

A possibilidade de fungos fitopatogênicos terem desenvolvido mecanismos que estimulem uma produção exagerada de ABA em plantas, suprimindo a sua resistência sistémica adquirida, para que ocorra uma redução no crescimento, transpiração e fotossíntese da planta, tem sido alvo de investigações⁷⁴.

1.2. Ácido gama-aminobutírico

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é um aminoácido não proteínogénico, ubíquo, com quatro carbonos, encontrando-se amplamente distribuído na natureza em microrganismos, plantas e animais⁷⁶. Em mamíferos, o GABA desempenha um papel crucial como neurotransmissor inibidor no sistema nervoso central, estando funcionalmente envolvido na indução de efeitos hipotensores, diuréticos e tranquilizantes⁷⁷. É também descrito na literatura a capacidade do GABA de melhorar a concentração do plasma, hormonas de crescimento e síntese de proteínas no cérebro⁷⁸. O GABA demonstra ter um papel efetivo na regulação de determinadas doenças de cariz neurológico, como a doença de alzheimer e doença de parkinson⁷⁹.

1.2.1. Metabolismo do GABA em plantas

O GABA é metabolizado através de uma via de caminho curto, composta por 3 enzimas principais, constituindo a via GABA shunt, denominação atribuída pelo facto de evitar duas etapas do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), sendo responsável por converter glutamato em succinato através do GABA⁸⁰.

Deste modo, esta via é composta pela enzima citosólica glutamato descarboxilase (GAD) e as enzimas mitocondriais GABA transaminase (GABA-T) e semaldeído desidrogenase succínica (SSADH). Esta via inicia-se quando estimulada por fatores de stress abiótico e biótico. As três etapas que constituem a via shunt GABA são nomeadamente:

1º Etapa: Descarboxilação direta e irreversível de glutamato pela GAD;

2º Etapa: A GABA-T catalisa a conversão reversível de GABA em semaldeído succínico usando piruvato ou α -cetoglutarato como aceitadores de aminoácidos;

3º Etapa: Oxidação irreversível do semaldeído succínico para succinato. Reação catalisada pela SSADH^{80,81}.

1.2.2. O papel do GABA nas plantas

A existência natural do GABA em plantas foi demonstrada pela primeira vez em 1949 em tubérculos da planta da batata⁷⁶. É largamente descrito na literatura que a concentração de GABA aumenta substancialmente e rapidamente como resposta da planta a situações de stress abiótico e biótico⁸². Entre as diversas situações que podem estimular a produção de GABA por parte da planta, é importante salientar a anoxia, temperaturas baixas ou elevadas, hormonas, lesões na planta, seca, alterações na salinidade do solo e agentes patogénicos, de entre os quais se destacam os insetos, vírus, bactérias e fungos. Deste modo, as principais funções que o GABA desempenha na planta, são nomeadamente:

- ✓ Defesa contra insetos;
- ✓ Regulação do pH citosólico;
- ✓ Osmorregulador;
- ✓ Armazenamento de nitrogénio;
- ✓ Proteção contra o stress oxidativo;
- ✓ Desenvolvimento da planta;
- ✓ Molécula sinalizadora⁸³.

1.2.2.1. Defesa contra insetos

Estudos efetuados permitiram constatar que GABA pode desempenhar um papel importante na defesa da planta contra determinados insetos herbívoros. Esta hipótese baseia-se na rápida ativação da GAD que posteriormente leva a uma rápida acumulação de GABA no momento da infeção, a qual ocorre devido à disrupção de estruturas celulares (ex: vacúolos), aumentando os níveis H^+ no citosol, estimulando a síntese de GABA. O resultado final traduz-se num menor crescimento, desenvolvimento e diminuição da taxa de sobrevivência do inseto⁸⁴.

1.2.2.2. Regulação do pH citosólico

A hipótese de que o GABA atua na regulação do pH citosólico das plantas, deve-se ao facto de a GAD aumentar, ocorrendo posteriormente uma rápida acumulação de GABA, em resposta à acidificação citosólica⁸⁰.

1.2.2.3. Osmoregulador

Quando uma planta é sujeita a condições inadequadas de hidratação, ocorrem várias alterações a nível fisiológico, bioquímico e molecular. Destas é importante salientar o aumento da respiração da planta e perda do conteúdo de água relativa. Foi demonstrado que a concentração de GABA não só aumenta quando a planta *Piper nigrum L.* é sujeita a stress induzido por polietilenoglicol, como confere tolerância osmótica, sendo que retarda o murchamento nas plantas, consoante a aplicação endógena de 2mM de GABA⁸⁵.

1.2.2.4. Armazenamento de nitrogénio

É descrito na literatura a capacidade do GABA enquanto armazenador de nitrogénio, embora que de forma temporária. O metabolismo do ácido glutâmico, através da via GABA shunt é considerado uma forma económica de as plantas rentabilizarem nitrogénio, uma vez que o GABA e o glutamato são produzidos durante a mobilização e armazenamento de proteínas como forma de reciclar o carbono e o nitrogénio derivado da arginina⁸⁶.

1.2.2.5. Protecção contra o stress oxidativo

Tendo em conta que o último passo da GABA shunt pode fornecer succinato e NADH na cadeia respiratória, equaciona-se que a degradação de GABA pode limitar a acumulação de

intermediários de oxigénio reativos mediante a presença de condições de stress oxidativo, as quais inibem certas enzimas do ciclo TCA⁸⁷.

1.2.2.6. Desenvolvimento da planta

O papel que o GABA desempenha no desenvolvimento da planta tem sido especialmente estudado e discutido nos últimos anos, principalmente devido à descoberta do efeito do GABA no crescimento e orientação dos tubos de pólen em *Arabidopsis*⁸⁸. Um estudo realizado, demonstrou que a acumulação de GABA mediante situações de stress, em *Arabidopsis thaliana*, é responsável por causar defeitos na elongação celular e diminuir a expressão de genes que codificam proteínas relacionadas com a parede celular. O mesmo estudo permitiu verificar que a aplicação de GABA exógeno apresenta um efeito inibidor no crescimento primário da raiz. Os autores deste estudo, equacionam que o GABA pode ter um papel de fator de controlo no crescimento da planta⁸⁹.

De facto, na planta do tabaco, elevadas concentrações de GABA provocam inibição do crescimento, nomeadamente na elongação do caule⁹⁰. No girassol, o efeito do GABA depende da dose aplicada, uma vez que baixas concentrações promovem o crescimento, enquanto que altas concentrações inibem o crescimento⁹¹. Estudos afirmam que a aplicação endógena de GABA, inferior a 1mM, promove o crescimento *in vitro* dos tubos de pólen, enquanto concentrações superiores inibem o crescimento das estruturas anteriormente referidas⁹². A germinação do pólen em *Picea wilsonii* é afetada pelo GABA, uma vez que a suplementação com GABA entre 50 a 100mM promove a elongação dos tubos de pólen, enquanto que concentrações superiores a 100mM diminuiu a germinação do pólen e o crescimento dos tubos de pólen⁹³.

Um outro estudo efetuado, demonstrou o efeito positivo do GABA na embriogénese somática que corre em *Acca sellowiana*. Foi demonstrado que a aplicação endógena de GABA (2, 4, 6, 8 e 10mM) permitiu diminuir a percentagem de embriões deformados, comparativamente com embriões sujeitos às mesmas condições de crescimento, mas sem adição de GABA⁹⁴.

1.2.2.7. Sinalização

A principal evidência que sugere que o GABA pode desempenhar um papel como molécula sinalizadora em plantas, reside na caracterização da GABA transaminase mutante (*pop2*) em *Arabidopsis*, a qual permitiu aferir que gradientes de concentrações de GABA são necessários para orientar os tubos de pólen para o ovário⁹⁵.

Um estudo realizado demonstrou que o GABA modula o crescimento da planta ao regular diretamente a atividade de transportadores de aniões específicos da planta. Os autores demonstraram que o fluxo de aniões através do transporte de malato ativado por alumínio (ALMT), é ativado por aniões e regulado negativamente pelo GABA⁹⁶.

Outro estudo demonstrou que o GABA apresenta a particularidade de controlar e modular os níveis de sinais *quorum sensing* em *Agrobacterium tumefaciens*, fornecendo evidências que o sinal célula-célula mediado pelo GABA desempenha um papel importante no controlo contra a virulência de bactérias patogénicas⁹⁷.

No entanto, é importante salientar que ainda não foi descoberto qualquer tipo de componente molecular do GABA na sinalização em plantas, sendo que não foram identificados homólogos em plantas dos recetores de GABA presentes em mamíferos. Perante esta situação permanece incerto se as alterações que ocorrem na concentração de GABA constituem uma resposta metabólica ou um sinal adaptativo⁸³.

1.2.3. Interação entre GABA e fitohormonas

Um dos fatores que influencia a acumulação de GABA nas plantas são as fitohormonas⁸⁰. A associação entre GABA e o etileno é descrita na literatura, referindo que determinadas situações de stress promovem não só a acumulação de GABA, mas igualmente a síntese de etileno⁹¹.

Estudos efetuados demonstraram que o GABA potencia a síntese de etileno no girassol, ao promover a acumulação de transcritos do ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) sintetase e ACC oxidase. No entanto, o mesmo estudo descreve que o GABA não pode ser considerado um precursor biossintético alternativo para o etileno, não interferindo deste modo na via de biossíntese do etileno⁹¹.

Nas raízes do trigo, foi comprovado que o ABA promove a síntese de GABA⁹⁸, facto que também se verificou na raiz do arroz, na qual as auxinas foram responsáveis pelo um aumento substancial de GABA⁹⁹. No entanto, um outro estudo afirma que as auxinas podem interferir no metabolismo primário de nitrogénio, diminuindo a concentração de glutamato inibindo posteriormente a síntese de GABA¹⁰⁰. É também descrito que as CKs podem ter um papel regulador nos genes responsáveis pela regulação do GABA. Equaciona-se que o GABA pode interagir com fitohormonas, como por exemplo o JA e o GA¹⁰¹. De salientar que durante a pesquisa bibliográfica efetuada não houve nenhuma associação entre GABA e ácido salicílico.

De uma forma geral, o GABA pode interagir com hormonas de plantas, mas apenas perante um determinado estímulo. Quando interligados, o metabolismo do GABA e a produção de hormonas, podem contribuir para modular uma grande variedade de processos fisiológicos em plantas⁹⁰.

1.2.4. Papel do GABA na virulência de fungos fitopatogénicos

A possibilidade do GABA desempenhar um papel na virulência de fungos fitopatogénicos é baseado no facto de as plantas, fungos e bactérias responderem fisiologicamente ao GABA, sendo mesmo sugerido que este pode facilitar a comunicação entre os diferentes reinos. De igual modo, bactérias e fungos apresentam a capacidade de sintetizar GABA, sendo descrito a capacidade destes microrganismos de utilizarem o GABA como fonte de carbono e nitrogénio⁷⁶.

Metabolismo do GABA em fungos

De uma forma bastante sintetizada, o metabolismo do GABA em fungos inicia-se com a descarboxilação do L-glutamato pela GAD, a qual origina GABA, e posterior catabolismo do GABA via succinato SSA. O processo metabólico do GABA em fungos é bastante similar ao que ocorre nas plantas, uma vez que as enzimas envolvidas são as mesmas em ambos processos metabólicos. Nas plantas, o GABA é um metabolito intermediário que permite evitar etapas cruciais no ciclo TCA, papel semelhante ao verificado em fungos¹⁰².

Pode o GABA promover/intensificar a virulência de fungos fitopatogénicos?

Apesar de ser descrito na literatura o metabolismo do GABA em fungos, o papel que este representa a nível da doença causada por este tipo de microrganismos é pouco descrito, sendo a afirmação de que o GABA potencia de alguma forma a virulência deste tipo de fungos meramente especulativa¹⁰³.

Com o intuito de realizar um enquadramento teórico perceptível relativamente ao tema em questão, serão enunciados diversos exemplos que permitem compreender o real efeito que o GABA apresenta em determinados fungos fitopatogénicos.

Estudos realizados com *Candida albicans*, um fungo oportunista em pacientes imunodeprimidos, demonstraram que o GABA promove a expressão dos fatores de virulência deste fungo. Os resultados obtidos foram esclarecedores e permitiram constatar que a aplicação exógena de GABA *in vitro* promoveu a formação do tubo germinativo e a expressão de mRNA da fosfolipase B1, dois fatores de virulência de *C. albicans*¹⁰⁴.

Um outro estudo envolvendo *Stagonospora nodorum*, um fungo fitopatogénico descrito por infetar o trigo, aumenta substancialmente a sua esporulação mediante a adição exógena de GABA. Durante a realização deste estudo foi descoberto que o gene *sdh1*, responsável por codificar a SSADH em *S. nodorum*, desempenha um papel fundamental na resposta ao stress¹⁰⁵.

Um dos resultados mais interessantes foi obtido com o fungo *Cladosporium fulvum*, segundo o qual, este fungo manipulou o hospedeiro (planta do tomateiro), para que esta forneça GABA como fonte de nitrogénio durante a infeção. No entanto, não existem outras experiências publicadas que sustentem esta afirmação. O mesmo estudo provou que a adição de GABA aumentou o crescimento micelial de *C. fulvum in vitro*¹⁰⁶.

Um outro estudo levado a cabo com *Magnaporthe grisea*, permitiu constatar que um elicitor da parede celular (fator de morte celular) deste fungo é responsável por causar alterações metabólicas na GABA shunt em suspensões de células de arroz. Este estudo permitiu ainda aferir que a indução de ROS (espécies reativas de oxigénio) por *M. grisea* está associada com a inativação da atividade da GABA-T em células de arroz¹⁰⁷.

No entanto, é descrito na literatura que a aplicação exógena de GABA potencia a resistência do tomateiro contra a invasão de *B. cinerea*^{108,109}.

Deste modo, o facto de determinados microrganismos induzirem a produção de GABA em plantas está positivamente relacionado com a resistência microbiana, no entanto, a capacidade de os mesmos microrganismos conseguirem metabolizar o GABA, está associado com a sua capacidade de infetar determinados hospedeiros⁹⁰.

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho consistiram em avaliar o efeito do GABA no crescimento de *M. phaseolina* a diferentes temperaturas, assim como determinar o efeito desta molécula em diversos parâmetros, nomeadamente:

- ✓ Atividade enzimática de *M. phaseolina*;
- ✓ Secretoma de *M. phaseolina*;
- ✓ Fitotoxicidade de *M. phaseolina* em planta.

Com o intuito de complementar os objetivos anteriormente referidos, pretendeu-se avaliar o efeito cruzado da temperatura na citotoxicidade do secretoma de *M. phaseolina* em células mamíferas, tendo em conta a capacidade deste organismo infetar seres humanos.

3. Metodologia

3.1. Isolado

Para a realização deste trabalho prático foi utilizada a estirpe *Macrophomina phaseolina* PE35, da coleção do Prof. Dr. Artur Alves (Universidade de Aveiro). Esta estirpe foi isolada de *Eucalyptus globulus* em Portugal.

3.2. Meios de cultura

O meio de cultura utilizado para a análise do crescimento de *M. phaseolina* foi o PDA (Merck). Para análise da biomassa do micélio de *M. phaseolina* o meio de cultura utilizado foi o caldo de batata e dextrose (PDB).

Os respetivos meios foram preparados com base num volume final de 1L. A preparação dos meios de cultura anteriormente referidos encontra-se detalhadamente descrita no ponto 7.1. e 7.2. na secção dos anexos.

3.3. Determinação do crescimento

Para avaliar o crescimento do micélio, *M. phaseolina* foi cultivado em meio de cultura PDA (protocolo descrito no ponto 7.3. na secção dos anexos) sobre o efeito de diferentes temperaturas (4, 10, 18, 25, 30, 37, 40 e 50 °C). Durante o período de incubação, foram realizadas medições diárias do diâmetro do micélio. Para cada temperatura de incubação, os ensaios foram realizados em triplicado. O procedimento experimental encontra-se descrito com mais detalhe no ponto 7.4. na secção dos anexos.

3.4. Determinação da biomassa

A determinação da biomassa de *M. phaseolina*, foi realizada através do cultivo em meio líquido (protocolo descrito no ponto 7.5). Depois de um período de incubação a diferentes temperaturas (4, 10, 18, 25, 30, 37, 40 e 50°C) realizou-se um processo de filtração. A secagem do micélio a 50°C, permitiu determinar o peso seco. O procedimento experimental encontra-se descrito com mais detalhe no ponto 7.6. na secção dos anexos.

3.5. Preparação e adição de GABA aos meios de cultura PDA e PDB

Foi preparada uma solução stock de GABA (Sigma, A2129) de 5M (protocolo encontra-se descrito no ponto 7.7. na secção dos anexos), que foi armazenada a -20°C até utilização.

3.5.1. Processo de adição de GABA aos meios de cultura PDA e PDB

Com o intuito de avaliar o efeito do GABA no crescimento de *M. phaseolina* foram adicionadas diferentes concentrações de GABA ao meio de cultura PDA (protocolo descrito no ponto 7.8 na secção dos anexos). As concentrações testadas foram: 0mM; 5mM e 10mM.

O cultivo de *M. phaseolina* foi idêntico ao protocolo descrito no ponto 7.3. na secção dos anexos, com a exceção da adição de GABA. É importante salientar que o GABA não foi autoclavado, sendo esterilizado por filtração (através de membrana com poro de 0,2 µm) e posteriormente adicionado ao meio. A determinação do crescimento do micélio foi idêntica ao descrito no ponto 7.4. na secção dos anexos.

Para determinar o efeito do GABA no desenvolvimento da biomassa do micélio de *M. phaseolina* foram adicionadas diferentes concentrações de GABA ao meio de cultura PDB (protocolo descrito no ponto 7.9. na secção dos anexos). As concentrações testadas foram: 0mM; 5mM e 10mM.

O cultivo de *M. phaseolina* foi idêntico ao protocolo descrito no ponto 7.5. na secção dos anexos, com a exceção da adição de diferentes concentrações de GABA. É importante

salientar que o GABA não foi autoclavado, sendo esterilizado por filtração (através de membrana com poro de 0,2 μm) e posteriormente adicionado ao meio. A determinação da biomassa do micélio foi idêntica ao descrito no ponto 7.6. na secção dos anexos.

As condições anteriormente referidas, em ambos os meios, foram testadas a temperaturas de 25°C e 37°C, sendo os ensaios realizados sempre em quadruplicado para todas as condições.

3.6. Determinação da atividade enzimática extracelular

A atividade enzimática extracelular de *M. phaseolina* foi determinada de acordo com Saraiva (2009)¹¹⁰, recorrendo a ensaios em placa, como o descrito abaixo. As principais enzimas em análise foram: ureases, lipases, lacases, celulases, xilanases, amilases, pectinases e quitinases.

Cada placa foi analisada antes de o micélio atingir a borda da placa, efetuando-se medições do diâmetro deste, e posteriormente medições do halo. O ensaio foi realizado a temperaturas de incubação de 25 e 37°C, em triplicado.

3.6.1. Meios de cultura

Os meios foram preparados de acordo com Saraiva (2009)¹¹⁰ sendo a lista de ingredientes calculada para um volume final de 1L de meio. Todos os meios foram autoclavados (121°C durante 20min) antes de serem plaqueados.

Meio de lipase

Reagentes	Quantidade (g)
Peptona	10
NaCl	5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1
Bacto-Agar	20
Twen 20 1% (v/v)	

O reagente Tween 20 foi autoclavado separadamente dos restantes reagentes, sendo depois adicionado ao meio a 1% (v/v);

A interpretação dos resultados é baseada através de observação direta de cristais de cálcio sobre o micélio, o que revela a produção de lipases extracelulares.

Meio de amido

Reagentes	Quantidade (g)
Peptona	10
NaCl	5
Amido	2
Extrato de Levedura	5
Bacto-Agar	15

É necessário ajustar o valor de pH a 6,8;

Após o crescimento do fungo, adicionou-se soluto de Lugol durante 10 minutos. Esta solução cora o meio não degradado, sendo que a presença de halo indica a produção de amilases extracelulares.

Meio de protease

Reagentes	Quantidade (g)
Leite desnatado em pó	10
Extrato de Malte	5
Bacto-Agar	15

O leite desnatado em pó foi autoclavado separadamente, em relação aos restantes reagentes.

A interpretação foi realizada por observação direta e verificação da formação de um halo. A presença de um halo transparente demonstra a produção de enzimas proteolíticas extracelulares.

Meio de pectina

Reagentes	Quantidade (g)
NaNO ₃	0,3
KH ₂ PO ₄	0,1
MgSO ₄	0,5
Extrato de Levedura	1
Pectina	5
Bacto-Agar	15

É necessário ajustar o valor de pH a 5,0;

Depois do crescimento do micélio, foi adicionado em cada placa, durante 1 hora, 1mL de CTAB 1% (m/v). Este reagente atua como um detergente e torna o meio não degradado opaco. A presença de um halo é interpretada como a produção de pectinases extracelulares.

Meio de xilanase

Reagentes	Quantidade (g)
NaNO ₃	0,3
KH ₂ PO ₄	0,1
MgSO ₄	0,5
Extrato de Levedura	1
Xilano	5
Bacto-Agar	15

Uma vez obtido o crescimento do micélio, adicionou-se 1mL de vermelho do Congo em cada placa durante 5min. Lavar com NaCl (1M). Se este reagente corar o meio não degradado, a presença de halo indica a produção de xilanases extracelulares.

Meio de urease

Reagentes	Quantidade (g)
Peptona	1
D(+)-glucose	1
KH ₂ PO ₄	2
NaCl	5
Vermelho de fenol	0,012
Bacto-Agar	15
Urea 40% (m/v)	50 mL

A solução de ureia (40%) é esterilizada por filtração (filtro com poro de 2µm).

A interpretação dos resultados é feita através de observação direta, verificando a existência de uma tonalidade cor-de-rosa no meio, devido à presença de um indicador de pH. Quando se visualiza esta tonalidade, significa que ocorre produção de ureases extracelulares.

Meio de celulase

Reagentes	Quantidade (g)
NaNO ₃	0,3
KH ₂ PO ₄	0,1
MgSO ₄	0,5
Extracto de Levedura	1
CM- celulose	5
Bacto-Agar	15

Uma vez obtido o crescimento do micélio, adiciona-se 1mL de vermelho do Congo em cada placa durante 5min. Lavar com NaCl (1M). Se este reagente corar o meio não degradado, a presença de halo indica a produção de celulases extracelulares.

Meio de lacase

Reagentes	Quantidade (g)
Extrato de Malte	15
Bacto-Agar	20

O ácido tanico (10g) foi autoclavado separadamente dos restantes reagentes num volume de dH₂O igual ao utilizado para os restantes reagentes.

A interpretação foi realizada através de observação direta, verificando a presença de um halo em redor do micélio (oxidação do ácido tanico), o que significa que ocorre produção de lacases extracelulares.

3.7. Quantificação da atividade lipolítica

Para determinar a atividade lipolítica recorreu-se ao método descrito por Kotogán et al. (2014)¹¹¹, com ligeiras modificações. O substrato utilizado para a determinação da atividade lipolítica foi o palmitato de p-nitrofenil (pNPP), da marca Sigma-Aldrich. Deste modo, uma solução stock de 3mM foi preparada em 25% de sulfóxido de dimetilo (DMSO), 0,5% de Triton X-100 e tampão fosfato de potássio com pH de 6,8.

Um volume de 50µL da solução de pNPP, juntamente com 150mL do extrato extracelular, foram incubados a 45°C por três períodos de tempo diferentes (0min, 45min e 90min). Para parar a reação foi preparada uma solução stock de 0,1mM de carbonato de sódio, da qual 50µL foram adicionados à reação.

Através da utilização de um leitor de microplacas, a libertação do pNP (p-nitrofenila), foi medida a 405nm em placas de 96 poços. A amostra correspondente ao branco, substituição do crude enzimático por água ultra-pura, foi tratada como todas as amostras.

O coeficiente de absorção molar do pNP ($\epsilon=1.2475 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), foi determinado a partir da medição da absorvância, a 405nm, das soluções padrões pNP. Deste modo, uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade da enzima que liberta 1mmol de pNP por minuto. Para a realização da curva padrão foi preparada uma solução stock de pNP de 1mM. A preparação dos padrões e o procedimento experimental encontram-se descritos no ponto 7.10. na secção dos anexos.

3.8. Extração total de proteínas extracelulares

Para extrair as proteínas extracelulares, contidas no meio extracelular, foi realizada uma ultracentrifugação a -4°C, com o intuito de remover os polissacarídeos (impurezas). A utilização de TCA e ditioneitol (DTT) permitiram efetuar sucessivas lavagens a fim de eliminar o máximo de impurezas presentes no meio extracelular. Estas lavagens são conseguidas através de centrifugações intervaladas, que permitem obter o *pellet*, um agregado de proteínas contidas no meio extracelular produzidas pelo fungo. O protocolo encontra-se descrito no ponto 7.11. na secção dos anexos.

3.8.1. Quantificação de proteínas

O método BCA (ácido bicinconínico), permite a determinação da concentração de proteínas na amostra, através de reações de colorimetria com o ácido bicinconínico. O princípio deste método baseia-se na redução do Cu^{2+} a Cu^+ , através da utilização de um reagente que contém o ácido bicinconínico. Quando a reação ocorre, a criação de um produto púrpura, com absorvância de aproximadamente 562nm, aumenta a intensidade da cor conforme a quantidade de proteína¹¹². A concentração de proteína foi determinada de acordo com as instruções do Kit. O protocolo foi realizado de acordo com o descrito nas instruções do fabricante.

3.8.2. SDS-PAGE

A separação eletroforética foi efetuada em condições desnaturantes (SDS-PAGE). O SDS (sulfato de dodecil de sódio) é um detergente aniônico com a capacidade de se ligar a aminoácidos hidrofóbicos, fazendo com que as proteínas acumulem carga negativa constante em todo o seu comprimento. Por outro lado, os géis de policrilamida apresentam a capacidade de, no momento da corrida eletroforética, fazerem com que as moléculas de maior peso molecular migrem a uma menor velocidade, comparativamente com as moléculas de menor peso molecular. Esta capacidade permite que a separação eletroforética seja baseada no peso molecular das moléculas alvo¹¹³. Para a preparação dos géis foi utilizado o sistema Mini-Protean® 3 Cell da Bio-Rad, ligado a um gerador de potencial diferencial elétrico (PowerPac 300 da Bio-Rad). A preparação destes foi realizada segundo Laemmli (1970)¹¹⁴. A preparação dos géis de policrilamida e o protocolo da eletroforese encontram-se descritos no ponto 7.12. na secção dos anexos.

3.8.2.1. Análise dos géis

Depois de realizada a coloração dos géis, estes foram digitalizados num densitómetro Calibrado GS-800 da Bio-Rad. O software utilizado para realizar uma estimativa da massa molecular das proteínas foi o Quantity One da Bio-Rad.

Uma mistura de proteínas com 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 e 10 kDa (Precision Plus Protein Standard, from Bio-Rad), foi utilizada como marcador para realizar uma estimativa do peso molecular das proteínas.

3.9. Liofilização

As amostras correspondentes ao meio extracelular de *M. phaseolina*, foram colocadas em eppendorfs de 1 mL, com o intuito de serem submetidas a um processo de liofilização.

A liofilização é uma técnica que apresenta como princípio base a sublimação. Permite extrair a água das amostras, para que estas permaneçam estáveis, facilitado simultaneamente o seu armazenamento à temperatura ambiente. A liofilização ocorre a uma temperatura de aproximadamente -50°C e $0,13\text{mbar}^{115}$.

Relativamente ao processo que envolve a liofilização, a primeira etapa consiste em congelar as amostras para que a água presente nestas passe para o estado sólido. Durante esta etapa as amostras são submetidas a condições de vácuo, sublimando o gelo diretamente no vapor de água. Na segunda etapa, depois de o gelo estar sublimado, as amostras liofilizadas podem ser removidas do liofilizador¹¹⁵. As amostras liofilizadas foram utilizadas para a realização de ensaios de zimografia, sendo armazenadas a -80°C .

3.10. Zimografia

A zimografia é uma técnica eletroforética que permite determinar qualitativamente a quantidade e o peso molecular de uma determinada enzima ativa, dependendo do tipo de substrato incorporado no gel¹¹⁶. Como o presente trabalho teve como objetivo avaliar atividade proteolítica e a atividade lipolítica foram utilizados dois substratos diferentes.

3.10.1. Atividade proteolítica

A introdução de gelatina (substrato) na solução padrão do gel de policrilamida, tem como principal objetivo fornecer um substrato uniformemente disperso. Este é posteriormente polimerizado, sendo que as amostras são desnaturadas parcialmente e reversivelmente com SDS e separadas por eletroforese. Posteriormente, as proteases são renaturadas no interior do gel através da substituição do SDS, por um detergente não iônico (Triton x-100). Finalizada esta etapa, procede-se à incubação em gel, em tampão de reação, para que estas digiram o substrato proteico. Para visualizar as zonas de digestão do substrato, o gel é corado com corante Coomassie Brilliant Blue, sendo posteriormente alvo de descoloração. O resultado final, quando ocorre digestão do substrato proteico, traduz-se no aparecimento de zonas digeridas brilhantes em contraste com um fundo azul¹¹⁷. A preparação dos géis de policrilamida segundo Laemmi (1970)¹¹⁴, encontram-se descritas no ponto 7.13. na secção dos anexos. Os géis foram digitalizados num Densitómetro Calibrado GS-800 da Bio-Rad.

3.10.2. Atividade lipolítica

A introdução de azeite em meio sólido tem como principal função fornecer um substrato homogéneo disperso. As amostras são parcial e reversivelmente desnaturadas com SDS e separadas por eletroforese. As lipases são renaturadas através da substituição de um detergente iônico (SDS), por um detergente não iônico (Triton x-100). Concluída esta etapa, o gel é colocado sobre um meio sólido contendo rodamina B/azeite preparado anteriormente, contendo tampão de reação, durante três horas a 37°C¹¹⁸. O protocolo referente à preparação dos géis e à técnica de zimografia, encontra-se descrito no ponto 7.13. na secção dos anexos. A atividade lipolítica foi detetada ao expor a placa com gel a 365nm (Gel DocTM xr + Bio Rad) no qual se visualiza bandas fluorescentes no caso de presença de enzimas lipolíticas com atividade.

3.11. Estudos de fitotoxicidade

Para avaliar o efeito do GABA na fitotoxicidade de *M. phaseolina*, quando crescido a 25°C e 37°C, realizou-se um estudo de fitotoxicidade utilizando a parte aérea de plantas.

Plantas de tomateiros (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) foram previamente adquiridas, em paletes, numa fase inicial do seu desenvolvimento e seguidamente colocadas numa estufa com 12 horas de luz e 12 horas de fotoperíodo escuro. As plantas foram fertirrigadas (7,5mL de fertilizante líquido, da marca Nutriquisa, Agroquisa, por 1L de água) ainda nas paletes. Foram regadas diariamente. No início da primeira semana foram transferidas para vasos contendo uma mistura de solo previamente preparada, contendo turfa e perlite numa porção de 1:2. Neste dia realizou-se a segunda fertirrigação. Nos dias seguintes as plantas foram regadas diariamente até atingirem as condições de crescimento ideais para a realização do ensaio. Uma vez obtidas as condições anteriormente referidas:

1- Para cada tipo de amostra de meio extracelular de *M. phaseolina*, prepararam-se três tubos de 13mL para o seguinte efeito:

Sem diluição: 2mL de amostra (100%);

Diluição de 1/1: 1mL de amostra + 1mL de dH₂O (50%);

Diluição 1/4: 500µL de amostra + 1,5mL de dH₂O (25%).

2- Preparar 3 tubos de 13mL com 2mL de PDB para o seguinte efeito:

- ✓ PDB sem adição de GABA;
- ✓ PDB com adição de 5mM de GABA;
- ✓ PDB com adição de 10mM de GABA.

3- Inserir em cada tubo cerca de 10 a 15cm da parte aérea do tomateiro;

4- Preparar a mesma quantidade de tubos até agora utilizados com 2mL de dH₂O;

5- Depois de 24h substituir as amostras por 2mL de dH₂O;

6- Depois de 48h, avaliar o estado morfológico das plantas numa escala de 0 a 4;

7- Analisar os resultados.

Foram atribuídas pontuações baseadas na análise morfológica visual do tomateiro, que pretendiam traduzir os diferentes graus de fitotoxicidade:

- 0- Sem sintomas;
- 1- Ligeiro murchamento;
- 2- Murchamento intermédio;
- 3- Descamação severa;
- 4- Murchamento intenso.

A média dos sintomas foi convertida em percentagem para avaliar a atividade fitotóxica.

3.12. Avaliação da citotoxicidade

Para a realização dos ensaios de citotoxicidade, utilizou-se uma linhagem de células Vero extraídas de rins do macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Para assegurar condições de manutenção adequadas, a sua preparação foi realizada em câmaras de cultura a 37°C, com 5% de dióxido de carbono, no meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), posteriormente suplementado com 10% de sangue bovino fetal (FBS) e 2mM de glutamina. Este, foi previamente filtrado (filtros de seringa 0.2µm, de CA-S, da marca Whatman, GE Healthcare) e aquecido até se estabelecer uma temperatura de 37°C.

Relativamente à linha celular aderente, o seu crescimento, *in vitro*, foi contínuo até cobrir toda a superfície disponível. A linha celular deve ser sub-cultivada, sendo as proteases (ex: tripsina) usadas para o efeito, uma vez que quebram as ligações entre as células, ficando em suspensão num frasco para o efeito¹¹⁹.

Depois de concluídas as etapas anteriormente referidas, 100µL de células Vero suspensas em DMEM, suplementado com 10% de FBS, são distribuídos numa placa de cultura de tecidos (2x10⁴ células por poço), sendo posteriormente incubadas durante um período de tempo de 24h (monocamada de confluente de ± 80 %) a uma temperatura constante de 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂.

Quando se pretende conhecer a taxa de viabilidade das células da cultura, utiliza-se uma alíquota para realizar uma contagem da suspensão celular, diluída numa solução de azul de tripano (corante de exclusão que apenas penetra nas células permeabilizadas, ou seja, as células mortas). Depois de o corante penetrar nas células, este permanece no núcleo destas, permanecendo azul.

Relativamente à resazurina, também conhecida como Azul de Alamar, apresenta a propriedade de atuar como um indicador redox, o qual manifesta alterações de um ponto de vista colorimétrico e fluorescente de acordo com a resposta da atividade metabólica¹²⁰.

De uma forma geral, a utilização da resazurina não é prejudicial para as células, uma vez que ao atuar, fornece resultados sem causar morte celular. Os resultados são obtidos através da leitura da absorvância a 570nm (comprimento de onda de ação da resazurina). Relativamente à interpretação dos resultados, as células viáveis apresentam a capacidade de reduzir a resazurina, ou seja, existe uma alteração da cor, nomeadamente do azul (resazurina) para rosa avermelhado (resofurina)¹²¹.

Todo o procedimento anteriormente descrito foi realizado em condições assépticas, sendo que cada amostra foi testada em triplicado. O protocolo referente à avaliação da citotoxicidade encontra-se descrito no ponto 7.14. na secção dos anexos.

4. Resultados e discussão

Para a realização deste estudo, *M. phaseolina* foi a espécie selecionada, uma vez que a sua patogenicidade é amplamente descrita na literatura, embora diferentes isolados apresentem variações quanto à sua virulência. Deste modo, foi possível estabelecer uma seletividade nos ensaios realizados. A hipótese de que o GABA pode desempenhar um papel importante na virulência de fungos fitopatogênicos baseou-se num estudo, no qual se equacionou que o fungo *Diplodia corticola* possui a capacidade de metabolizar GABA durante a infecção. Equacionou-se também que o fluxo de GABA que ocorre no sobreiro (*Quercus suber*) é maior durante a época do descortiçamento, a qual é considerada o período mais suscetível à infecção por *D. corticola*¹²². Deste modo, o objetivo do presente estudo consistiu em verificar se o GABA altera a virulência de *M. phaseolina*.

4.1. Caracterização do crescimento de *M. phaseolina*

Numa fase inicial analisou-se o crescimento micelial de *M. phaseolina* a diferentes temperaturas, em meio de cultura PDA. Os resultados encontram-se descritos na figura 1.

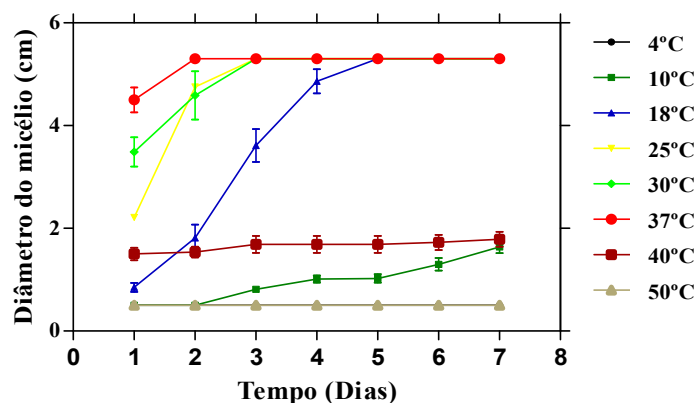


Figura 1: Crescimento de *M. phaseolina* em meio de cultura PDA. O crescimento ocorreu a oito temperaturas diferentes (4, 10, 18, 25, 30, 37, 40 e 50°C). Foram efetuadas medições diárias ao diâmetro do micélio durante 7 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

Os resultados, referentes ao crescimento radial do fungo (figura 1), mostram que *M. phaseolina* cresce mais rápido a 37°C, embora seja referido que a sua temperatura ótima de crescimento seja aproximadamente entre 25 e 33°C²². A 25°C obteve-se o terceiro maior crescimento radial, seguindo-se as temperaturas de 18, 10 e 40°C. A 4 e 50°C não se registou qualquer crescimento, o que seria de esperar, visto que são temperaturas consideradas extremas para o crescimento de *M. phaseolina*²².

Em meio de cultura PDB, os resultados obtidos que permitem avaliar o desenvolvimento da biomassa de *M. phaseolina* a diferentes temperaturas, encontram-se descritos na figura 2.

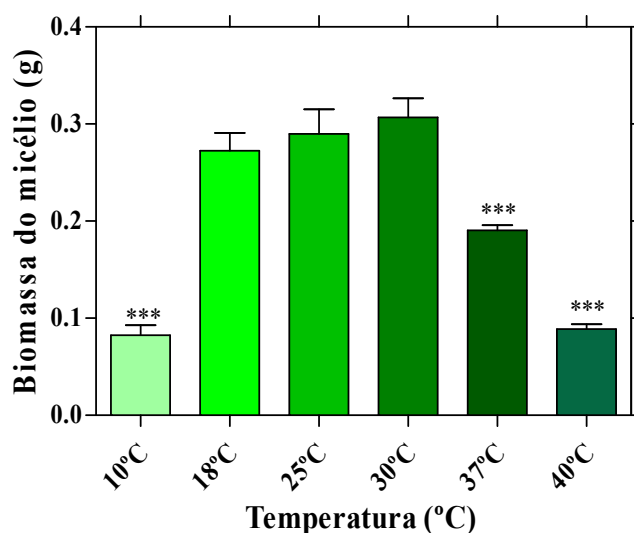


Figura 2: Desenvolvimento micelial de *M. phaseolina* em meio de cultura PDB. O crescimento ocorreu a oito temperaturas diferentes (4, 10, 18, 25, 30, 37, 40 e 50°C). A biomassa do micélio é representada em gramas (g). One way ANOVA, seguida de um teste de comparações múltiplas de Dunnett's (controlo 30°C), foram usadas para determinar a significância estatística da biomassa de *M. phaseolina* a diferentes temperaturas (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Na determinação da biomassa micelial (figura 2) verificou-se que a temperatura a que se registou um maior crescimento foi a 30°C, ao contrário do que se registou no crescimento radial, no qual a temperatura a que se registou um crescimento mais rápido foi de 37°C. De facto, existe uma diferença significativa ($p < 0,05$) se compararmos o desenvolvimento micelial obtido entre ambas as temperaturas (30 e 37°C). No entanto, não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) na biomassa a temperaturas de 18 e 25°C comparativamente com o crescimento registado a 30°C. De salientar que em relação à temperatura ótima de crescimento (30°C), observou-se diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparado com as temperaturas de crescimento a 10 e 40°C. Não se observou qualquer crescimento a temperaturas de 4 e 50°C.

4.2. Efeito do GABA no crescimento de *M. phaseolina*

Depois de analisado o crescimento de *M. phaseolina* a diferentes temperaturas, foram seleccionadas duas temperaturas de crescimento, 25 e 37°C. Optou-se por não se escolher a temperatura ótima de crescimento (30°C), optando por uma temperatura de crescimento de 25°C, que segundo os resultados descritos anteriormente, não apresenta diferenças significativas em comparação com a temperatura ótima de crescimento. A segunda temperatura seleccionada, 37°C, está intimamente relacionada com o facto de corresponder à temperatura corporal humana, e sendo *M. phaseolina* um fungo com capacidade de infetar seres humanos^{7,45,46}, faz sentido, num ponto de vista teórico, ser uma das temperaturas seleccionadas.

Uma vez seleccionadas as temperaturas de crescimento, procedeu-se à determinação do crescimento radial e biomassa de *M. phaseolina*, mediante a adição de diferentes concentrações de GABA (0, 5 e 10mM). A escolha destas concentrações tem como base um estudo realizado com *C. albicans*, no qual se provou que o GABA potenciava não só o desenvolvimento do fungo, mas também intensificava a sua virulência¹⁰⁴. A temperatura utilizada neste estudo (28°C), é relativamente próxima de uma das temperaturas seleccionadas (25°C).

O crescimento de *M. phaseolina* a 25 e 37 °C, em meio de cultura PDA, mediante a adição de concentrações crescentes de GABA (0, 5, 10mM), encontram-se descrito na figura 3.

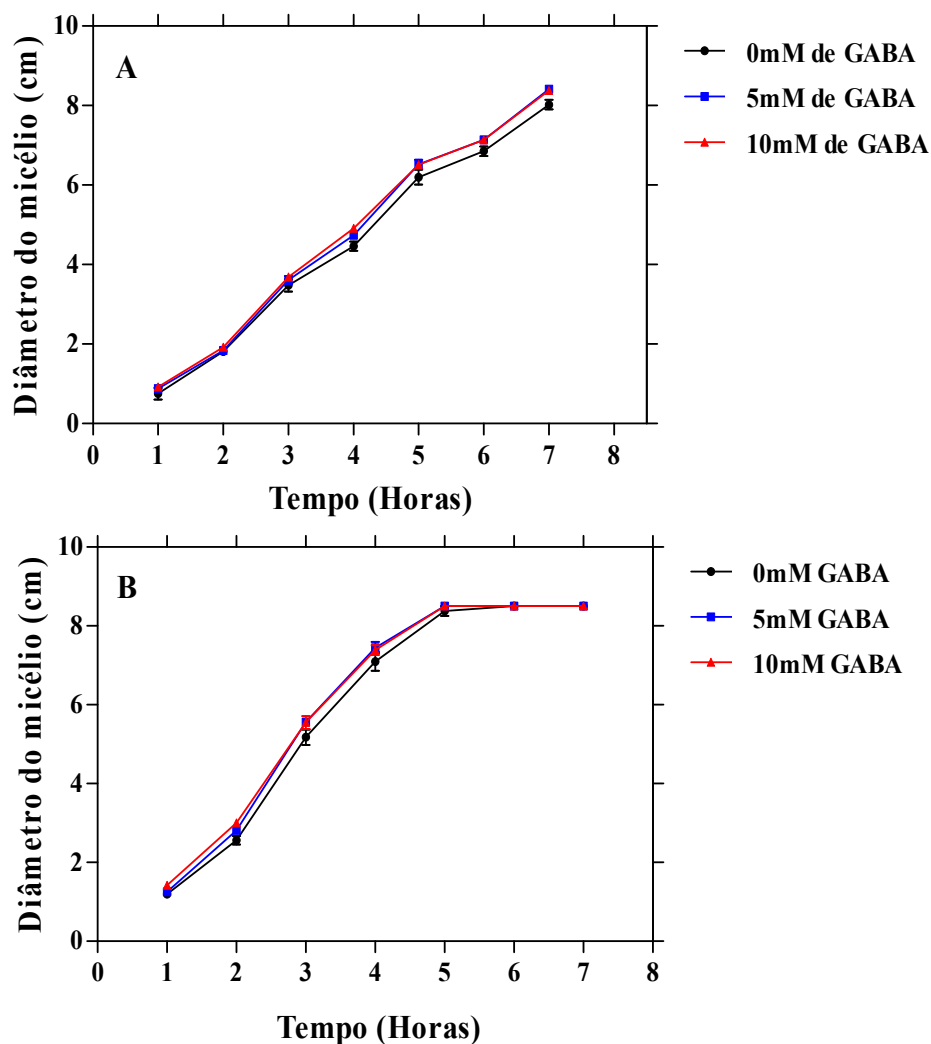


Figura 3: Efeito de diferentes concentrações de GABA no crescimento de *M. phaseolina*, em meio de cultura PDA. Crescimento micelial radial (cm) de *M. phaseolina* em meio de cultura PDA, a 25°C (A) e 37°C (B), mediante a adição de concentrações crescentes de GABA (0, 5 e 10mM). Foram efetuadas medições diárias ao diâmetro do micélio durante 7 dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão.

Os resultados obtidos indicam, segundo a figura 3^a, que a 25°C, o GABA apresenta um ligeiro efeito no crescimento radial de *M. phaseolina*. No entanto não é possível afirmar que quanto maior a concentração de GABA mais rápido é o crescimento, sendo que não se verifica qualquer diferença no crescimento de *M. phaseolina* mediante a adição de 5 e

10mM, embora ambas promovem um crescimento mais rápido. Segundo a figura 3B, podemos constatar que o GABA promove um incremento no crescimento radial, quando cresce a 37°C. No entanto, não é possível afirmar que quando adicionado 5mM de GABA, ocorre um efeito diferente no crescimento do que quando adicionado 10mM de GABA. Apenas podemos afirmar que o crescimento de *M. phaseolina* é mais rápido na presença de GABA.

De forma a estabelecer uma linearidade ao presente estudo, o efeito do GABA na biomassa de *M. phaseolina* foi testado mediante as mesmas temperaturas de crescimento e as mesmas concentrações de GABA. A variação da biomassa de *M. phaseolina* a 25 e 37°C, em meio de cultura PDB, mediante a adição de concentrações crescentes de GABA (0, 5, 10mM), encontram-se descrita na figura 4.

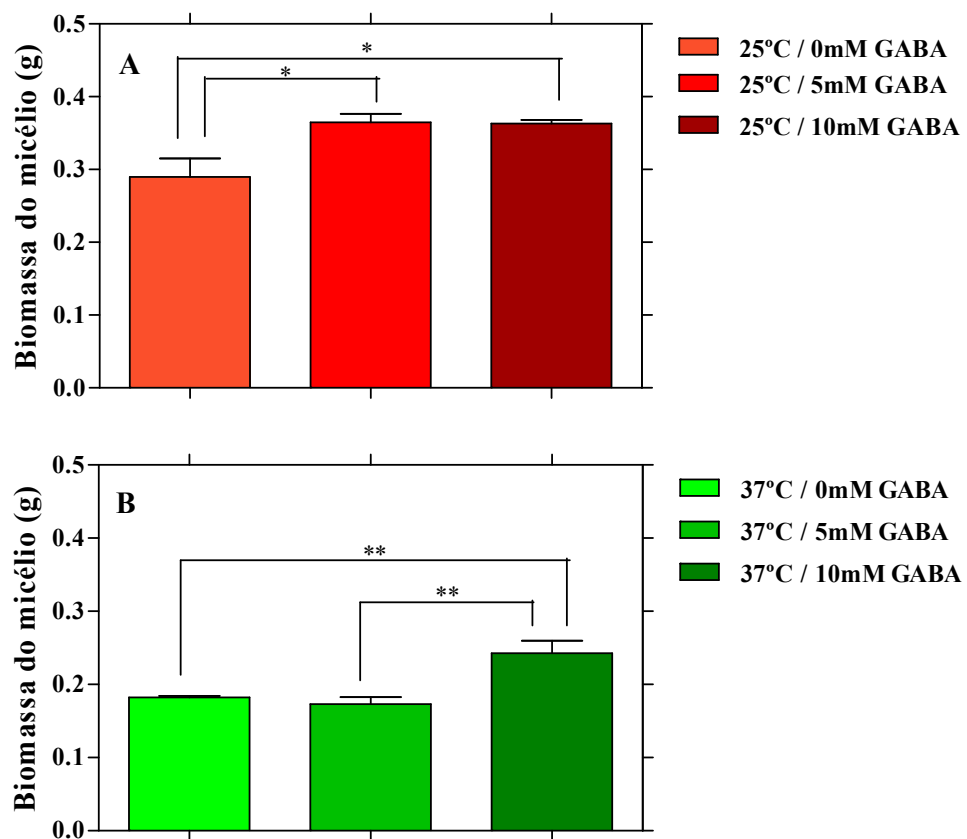


Figura 4: Efeito de diferentes concentrações de GABA no desenvolvimento micelial de *M. phaseolina*, em meio de cultura PDB. Biomassa (g) de *M. phaseolina* crescido em meio de cultura PDB, a 25°C (A) e 37°C (B), mediante a adição de diferentes concentrações de GABA (0, 5 e 10mM). One way ANOVA, seguido de um teste de comparações múltiplas de Tukey, foram usados para determinar a significância estatística da biomassa de *M. phaseolina* na presença de concentrações crescentes de GABA, a temperaturas distintas (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

De acordo com os resultados obtidos é possível afirmar que o GABA promove um aumento na biomassa de *M. phaseolina*. Como podemos observar na figura 4A, quando *M. phaseolina* cresce a 25°C, verifica-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na biomassa do micélio quando é adicionado 5 e 10mM de GABA. No entanto, não existe uma diferença significativa ($p > 0,05$) no desenvolvimento do micélio entre as concentrações anteriormente referidas. Quando *M. phaseolina* cresce a 37°C (figura 4B), na presença de concentrações crescentes de GABA, verifica-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na biomassa do micélio quando é adicionado 10mM de GABA ao meio. Não se verifica qualquer diferença significativa ($p > 0,05$) na biomassa mediante a não adição de GABA e a adição de 5mM de GABA. Perante os resultados obtidos podemos concluir que a concentração de GABA e a temperatura de crescimento estão intimamente relacionadas. A 25°C tanto a adição de 5mM como 10mM de GABA promovem um aumento da biomassa micelial significativo ($p < 0,05$). No entanto, a 37°C apenas a adição de 10mM de GABA promove um aumento significativo ($p < 0,05$) da biomassa micelial. É fundamental salientar que não se realizou uma análise morfológica para visualizar possíveis alterações mediante a adição de diferentes concentrações de GABA.

No entanto, como podemos observar nas figuras 5 e 6, quanto maior a concentração de GABA, maior a pigmentação produzida por *M. phaseolina*, independentemente da temperatura de crescimento. Equaciona-se que este fungo metaboliza o GABA como fonte de carbono e nitrogénio para favorecer o seu desenvolvimento.

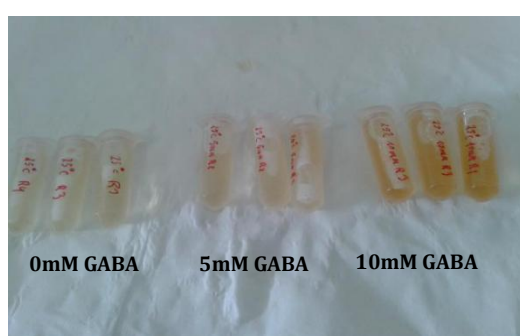


Figura 5: Aliquotas contendo meio extracelular resultante do crescimento de *M. phaseolina* em meio PDB, durante 7 dias, a 25°C sobre o efeito de diferentes concentrações de GABA.

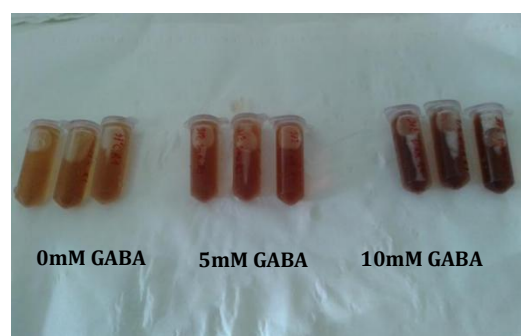


Figura 6: Aliquotas contendo meio extracelular resultante do crescimento de *M. phaseolina* em meio PDB, durante 7 dias, a 37°C sobre o efeito de diferentes concentrações de GABA.

No entanto este resultado não é linear, uma vez que a 37°C, quando adicionado 5mM de GABA, o crescimento de *M. phaseolina* não foi significativo ($p>0,05$) comparativamente com o controlo.

4.3. Efeito do GABA na atividade enzimática extracelular de *M. phaseolina*

Depois de comprovado que diferentes concentrações de GABA promovem o crescimento de *M. phaseolina*, a duas temperaturas distintas, procurou-se perceber qual o papel que o GABA pode desempenhar na virulência deste fungo. Deste modo procedeu-se à deteção e determinação da atividade enzimática extracelular mediante o efeito de diferentes concentrações de GABA. Detetou-se atividade extracelular de amilases, lacases e lipases. Não foi possível determinar atividade extracelular de pectinases, xilanases, celulasas, ureases e quitinases. A atividade enzimática extracelular detetada foi posteriormente determinada.

A deteção e a determinação da atividade enzimática de *M. phaseolina* a 25° e 37°C, em meio sólido, mediante a adição de concentrações crescentes de GABA (0, 5, 10mM), encontram-se descritos nas figuras 7, 8 e 9.

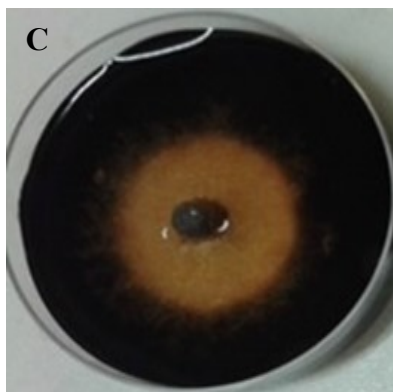
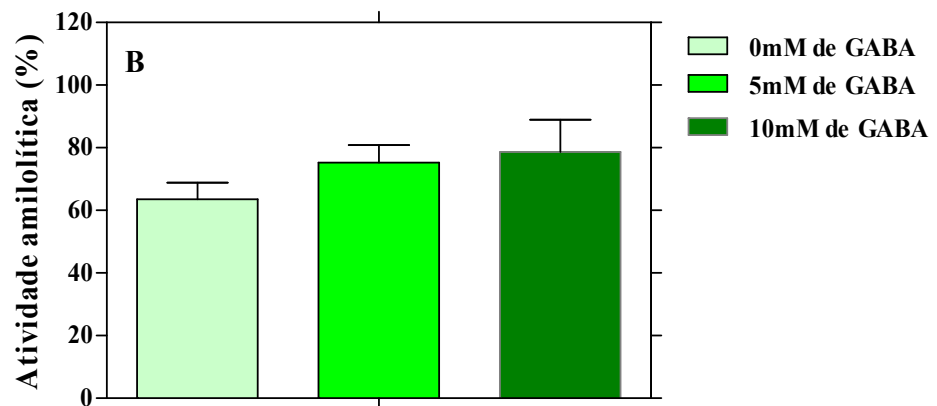
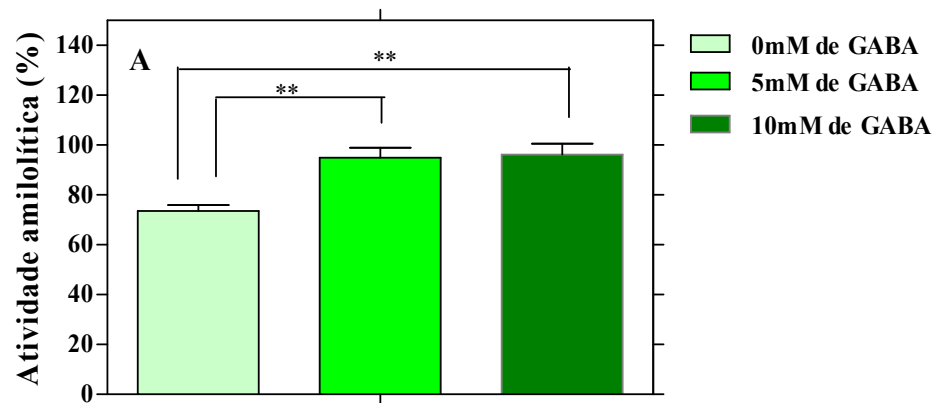
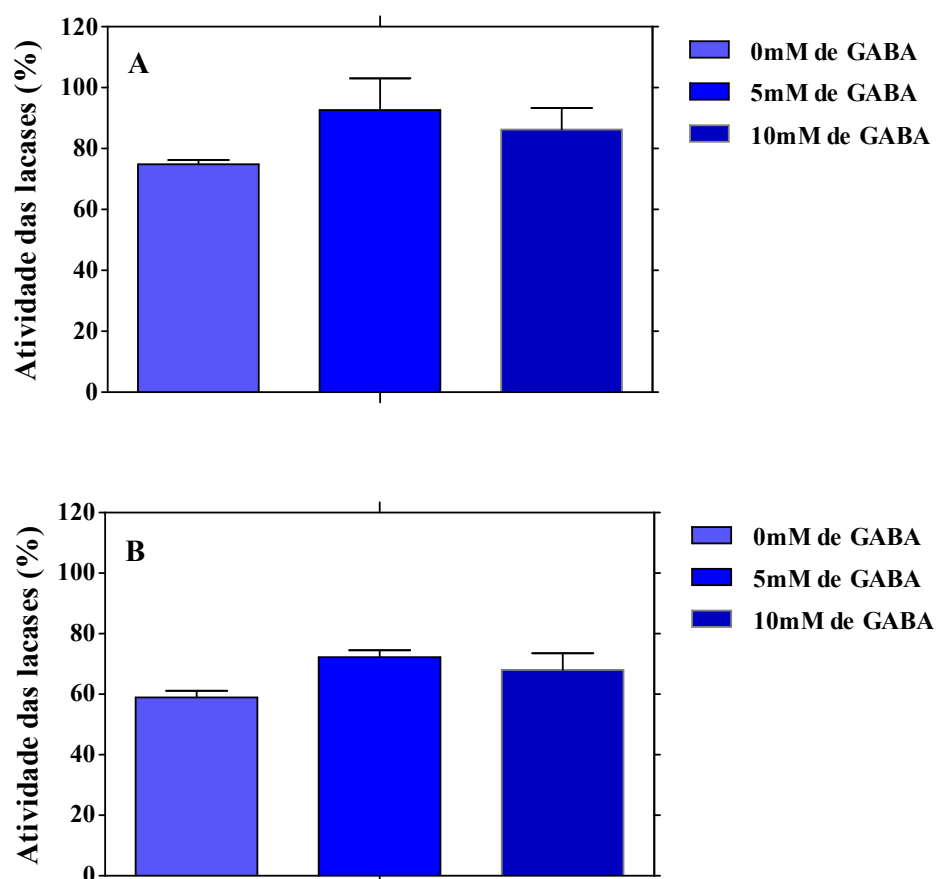


Figura 7: Determinação da atividade aminolítica (%) extracelular de *M. phaseolina*. Atividade amilolítica (%) produzida por *M. phaseolina* na presença de 0, 5 e 10mM de GABA a 25°C (A) e 37°C (B). Crescimento de *M. phaseolina* em meio do amido a 25°C na presença de 5mM de GABA (C). One way ANOVA, seguida de um teste de comparações múltiplas de Tukey, foram usados para determinar a significância estatística da atividade aminolítica extracelular de *M. phaseolina* na presença de concentrações crescentes de GABA, a temperaturas distintas (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Os resultados obtidos permitem constatar que existe um aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade aminolítica a 25°C (figura 7A), quando *M. phaseolina* é crescido na presença de 5 e 10mM de GABA, comparativamente com o controlo. No entanto, não se verifica qualquer diferença significativa ($p > 0,05$) na atividade aminolítica extracelular dos fungos crescidos na presença de 5 ou 10mM de GABA. A 37°C (figura 7B), não se registou nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$) na atividade aminolítica independentemente da adição (5 e 10mM) ou não adição de GABA ao meio de amido. Os resultados obtidos sugerem que ambas as concentrações de GABA testadas promovem um aumento na atividade aminolítica, quando *M. phaseolina* cresce em meio de amido a 25°C.



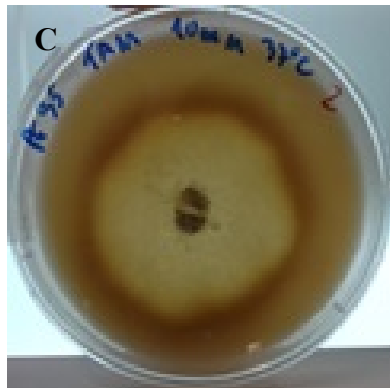


Figura 8: Determinação da atividade das lacases (%) extracelular de *M. phaseolina*. Atividade das lacases (%) produzida por *M. phaseolina* na presença de 0, 5 e 10mM de GABA a 25°C (A) e 37°C (B). Crescimento de *M. phaseolina* em meio de lacases a 37°C na presença de 10mM de GABA (C). One way ANOVA, seguida de um teste de comparações múltiplas de Tukey, foram usados para determinar a significância estatística da atividade das lacases extracelulares de *M. phaseolina* na presença de concentrações crescentes de GABA, a temperaturas distintas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Relativamente à atividade das lacases, não se verificou nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$) independentemente da adição (5 e 10mM) ou não adição de GABA a 25°C (figura 8A) e 37°C (figura 8B).

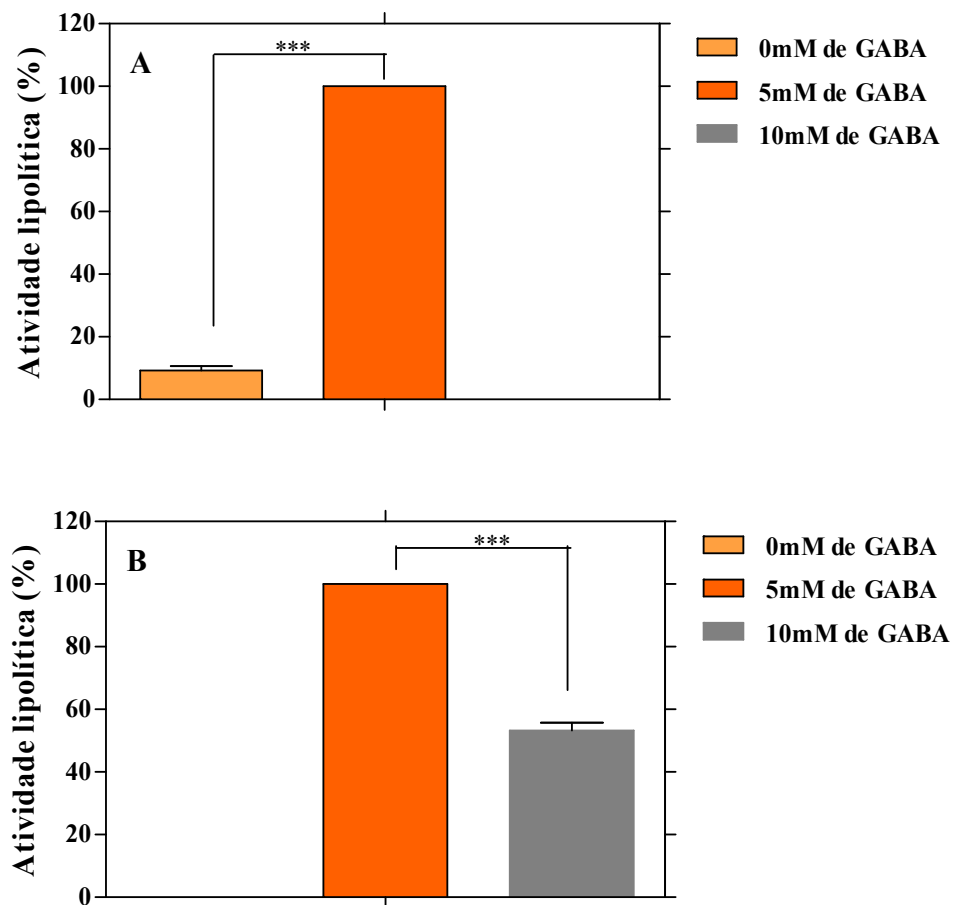


Figura 9: Determinação da atividade lipolítica (%) extracelular de *M. phaseolina*. Atividade lipolítica (%) produzida por *M. phaseolina* na presença de 0, 5 e 10mM de GABA a 25°C (A) e 37°C (B). One way ANOVA, seguida de um teste de comparações múltiplas de Tukey, foram usados para determinar a significância estatística da atividade lipolítica extracelular de *M. phaseolina* na presença de concentrações crescentes de GABA, a temperaturas distintas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

A determinação da atividade lipolítica permitiu constatar a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) em ambas as temperaturas. O crescimento de *M. phaseolina* em meio de lipase a 25°C (figura 9A), permitiu verificar uma diferença significativa ($p < 0,05$) na atividade lipolítica quando adicionado 5mM de GABA ao meio comparativamente com atividade lipolítica registrada quando não se adiciona qualquer concentração de GABA ao meio. Não se determinou qualquer atividade lipolítica produzida por *M. phaseolina* quando se adicionou uma concentração de 10mM de GABA.

O registo fotográfico (figura 10), permite visualizar uma larga produção de cristais de cálcio por *M. phaseolina* a 25°C, depois de 72h de incubação, quando adicionado uma concentração de 5mM de GABA ao meio.

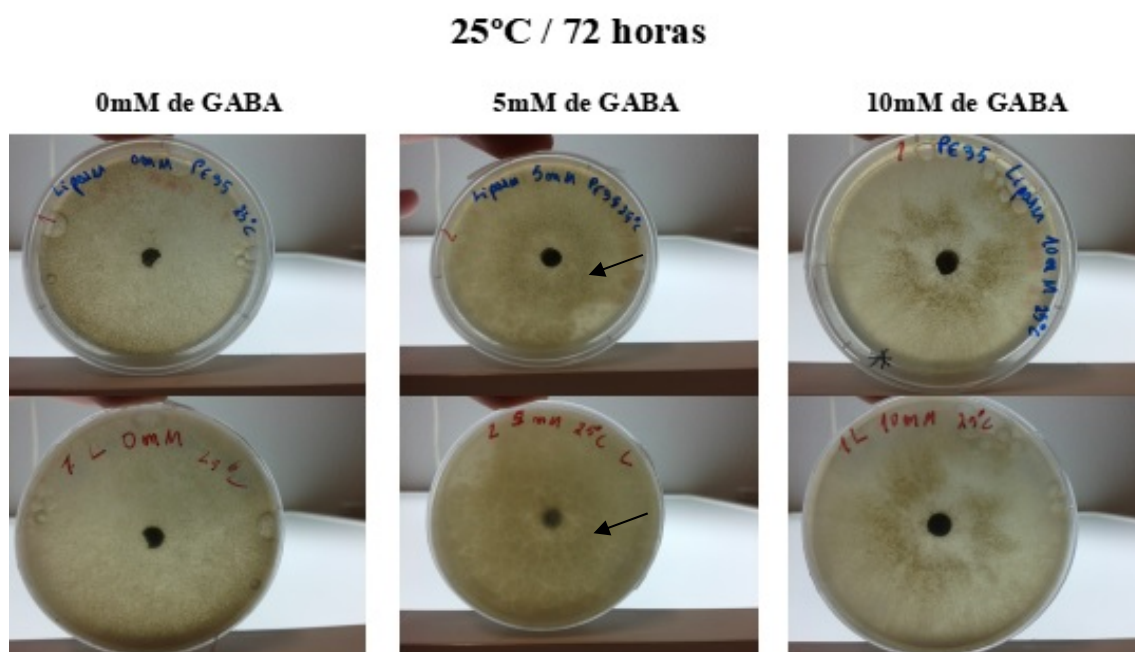


Figura 10: Crescimento de *M. phaseolina* em meio de lípase a 25°C. Registo fotográfico da porção anterior e posterior da placa de Petri, realizado depois de 72h de incubação a 25°C. As setas indicam que na presença de 5mM de GABA é maior a formação de cristais de cálcio em toda a placa.

O crescimento de *M. phaseolina* em meio de lípase a 37°C (figura 9B), permitiu verificar uma diferença significativa ($p < 0,05$) na atividade lipolítica de *M. phaseolina* na presença de 5mM de GABA, comparativamente com atividade lipolítica registada na presença 10mM de GABA. Não se registou qualquer atividade lipolítica produzida por *M. phaseolina* quando não se adicionou nenhuma concentração de GABA. O registo fotográfico (figura 11), permite visualizar uma larga produção de cristais por *M. phaseolina* a 37°C, depois de 72h de incubação, quando adicionado uma concentração de 5mM de GABA ao meio.

37°C / 72 horas

0mM de GABA

5mM de GABA

10mM de GABA

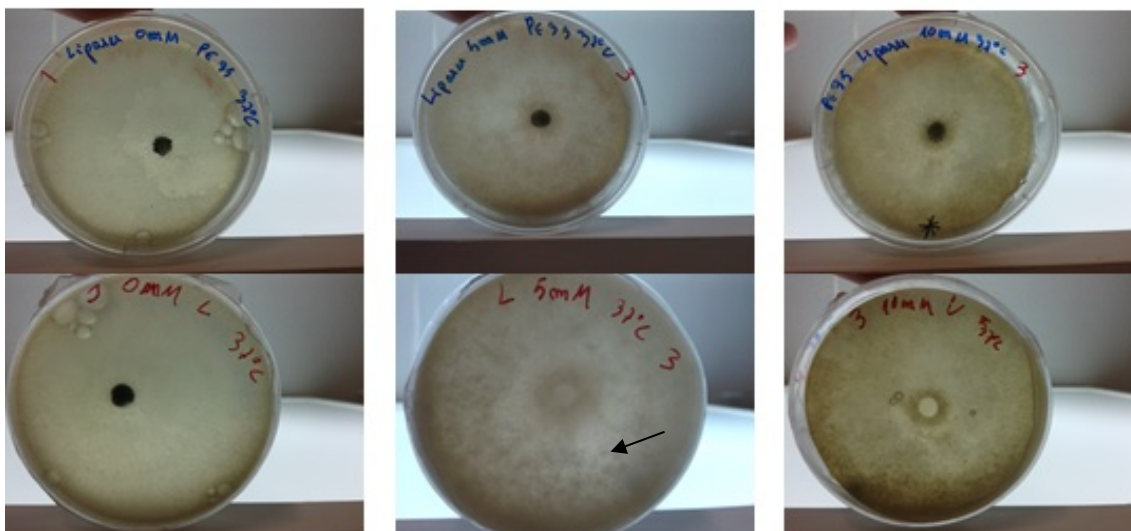


Figura 11: Crescimento de *M. phaseolina* em meio de lipase a 37°C. Registro fotográfico da porção anterior e posterior da placa de Petri, realizado depois de 72h de incubação a 37°C. As setas indicam que na presença de 5mM de GABA é maior a formação de cristais de cálcio distribuídos pela placa.

Perante os resultados obtidos podemos constatar que *M. phaseolina*, em ambas as temperaturas testadas (25 e 37°C) produz maior atividade lipolítica na presença de 5mM de GABA. Estes resultados foram cruciais para perspetivar o possível papel que o GABA pode desempenhar na virulência de *M. phaseolina*, uma vez que tanto as amilases como as lipases desempenham um papel importante na invasão contra um determinado hospedeiro^{30,31}.

4.4. Quantificação de atividade lipolítica

Perante o resultado obtido na deteção e determinação da atividade enzimática extracelular, a etapa seguinte consistiu em quantificar a atividade lipolítica, para verificar se realmente diferentes concentrações de GABA promovem um aumento desta. O primeiro passo consistiu em quantificar a atividade lipolítica contida no meio extracelular de *M. phaseolina*, mediante o seu crescimento a diferentes temperaturas. Como não se registou qualquer biomassa de *M. phaseolina*, quando incubado a temperaturas de 4 e 50°C não se procedeu à quantificação lipolítica do meio extracelular obtido a estas temperaturas. A atividade lipolítica extracelular de *M. phaseolina*, mediante o seu crescimento a diferentes temperaturas, encontra-se descrita na figura 12.

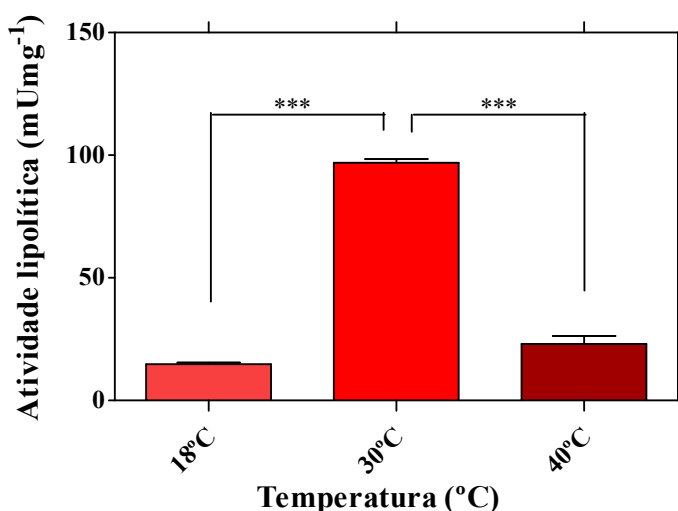


Figura 12: Determinação da atividade lipolítica (mUmg⁻¹) extracelular de *M. phaseolina*, mediante o efeito de diferentes temperaturas. One way ANOVA, seguida de um teste de comparações múltiplas de Tukey, foram usados para determinar a significância estatística da quantificação da atividade lipolítica extracelular de *M. phaseolina* a diferentes temperaturas (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Os resultados obtidos (figura 12), demonstram que existe um aumento significativo (p<0,05) na quantificação da atividade lipolítica, expressa em mUmg⁻¹, quando *M. phaseolina* cresce a 30°C, comparativamente com os resultados obtidos a 10 e 40°C. É importante salientar que não se verificou uma diferença significativa (p>0,05) na quantificação da atividade lipolítica entre 10 e 40°C.

Uma vez realizada a quantificação da atividade lipolítica do meio extracelular de *M. phaseolina* a diferentes temperaturas, procedeu-se à quantificação da mesma atividade, do meio extracelular de *M. phaseolina*, resultante do seu crescimento a temperaturas de 25 e 37°C, na presença de concentrações crescentes de GABA. Os resultados que permitem analisar diferentes padrões de atividade lipolítica no meio extracelular de *M. phaseolina* e que permite estabelecer uma correlação entre a adição de GABA e produção de enzimas lipolíticas, encontra-se descrito na figura 13.

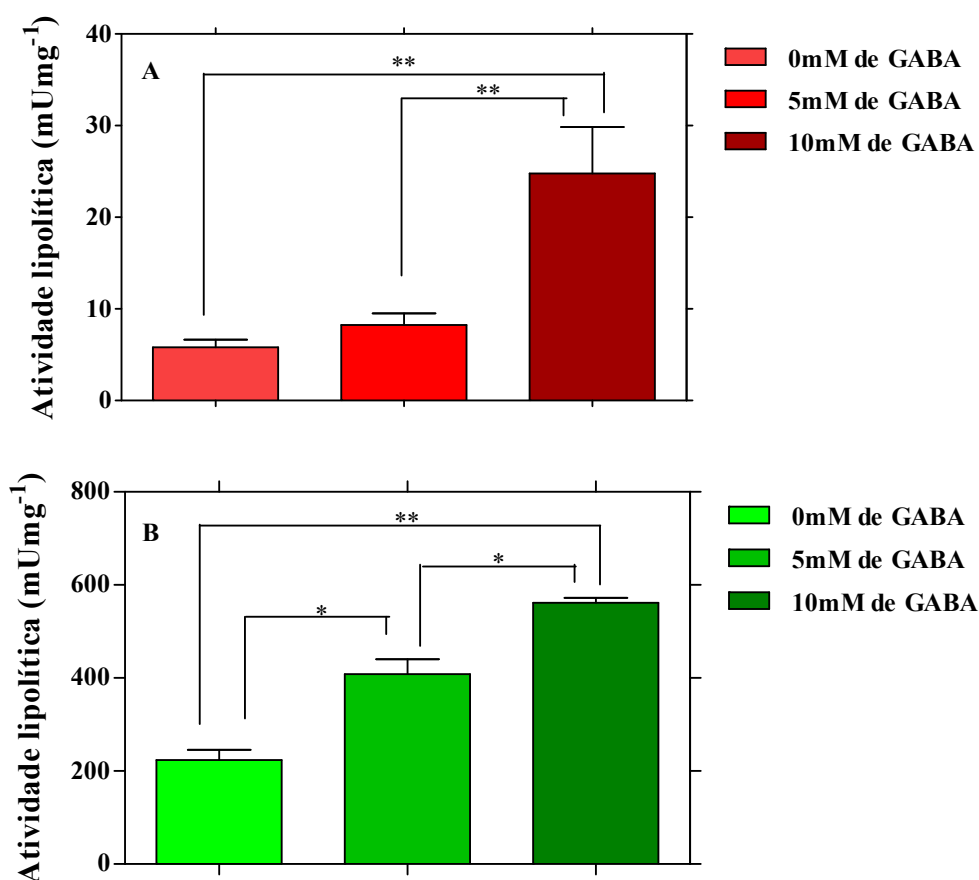


Figura 13: Determinação da atividade lipolítica (mUmg⁻¹) extracelular de *M. phaseolina*. Atividade lipolítica (mUmg⁻¹) produzida por *M. phaseolina* na presença de 0, 5 e 10mM de GABA a 25°C (A) e 37°C (B). One way ANOVA, seguida de um teste de comparações múltiplas de Tukey, foram usados para determinar a significância estatística da quantificação da atividade lipolítica extracelular de *M. phaseolina* na presença de concentrações crescentes de GABA, a temperaturas distintas (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Os resultados obtidos permitem constatar que a 25°C (figura 13A), existe uma diferença significativa ($p < 0,05$) na quantificação da atividade lipolítica do meio extracelular resultante do crescimento de *M. phaseolina* na presença de 10mM de GABA, a qual foi maior, comparativamente com o crescimento do fungo mediante a não adição e adição de 5mM de GABA. Não se verificou nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$) na quantificação da atividade lipolítica produzida por *M. phaseolina* mediante a não adição e adição de 5mM de GABA. Ao contrário do que aconteceu no ensaio de detecção e determinação da atividade lipolítica, no qual se obteve uma maior percentagem de atividade lipolítica com a adição de 5mM de GABA, na quantificação da atividade lipolítica, apenas se observou uma diferença significativa ($p < 0,05$) quando *M. phaseolina* cresceu na presença de 10mM de GABA.

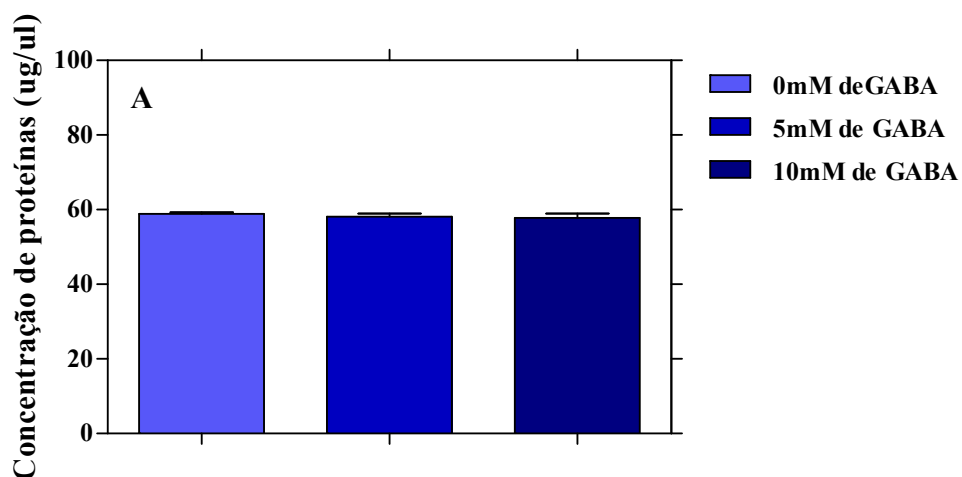
A 37°C (figura 13B), os resultados obtidos permitem constatar que existe uma diferença significativa ($p < 0,05$) na quantificação da atividade lipolítica do meio extracelular resultante do crescimento de *M. phaseolina* na presença de 5 e 10mM de GABA, a qual foi maior, comparativamente com o crescimento do fungo na ausência de GABA. O aumento mais significativo verifica-se quando *M. phaseolina* cresce na presença de 10mM de GABA, comparativamente com a ausência de GABA, o que significa uma maior atividade lipolítica. Verifica-se também uma pequena diferença significativa ($p < 0,05$) na atividade lipolítica, quando *M. phaseolina* cresce na presença de 10mM de GABA, a qual foi maior, comparativamente com a adição de 5mM de GABA. De igual modo, verifica-se também a existência de uma pequena diferença significativa ($p < 0,05$) na atividade lipolítica, quando *M. phaseolina* cresce na presença de 5mM de GABA, a qual foi maior, comparativamente com a ausência de GABA. A 37°C, os resultados sugerem que quanto maior é a concentração de GABA adicionado ao meio, maior é atividade lipolítica. Estes resultados contrariam os resultados obtidos a 37°C na detecção e determinação da atividade enzimática, na qual a concentração de 5mM foi a que promoveu uma maior percentagem de atividade lipolítica.

4.5. Quantificação total de proteínas extracelulares

Depois de comprovado que o GABA promove um aumento da atividade aminolítica e lipolítica, procurou-se perceber até que ponto este aminoácido pode provocar alterações no secretoma de *M. phaseolina*, ao ser metabolizado por este. Deste modo, procedeu-se à extração de proteínas extracelulares, que foram posteriormente quantificadas, segundo o método BCA.

4.5.1. Quantificação de proteínas extracelulares pelo método BCA

Os resultados obtidos na quantificação de proteínas extracelulares, secretadas por *M. phaseolina* na presença de concentrações crescentes de GABA, segundo o método BCA, encontram-se descritos na figura 14.



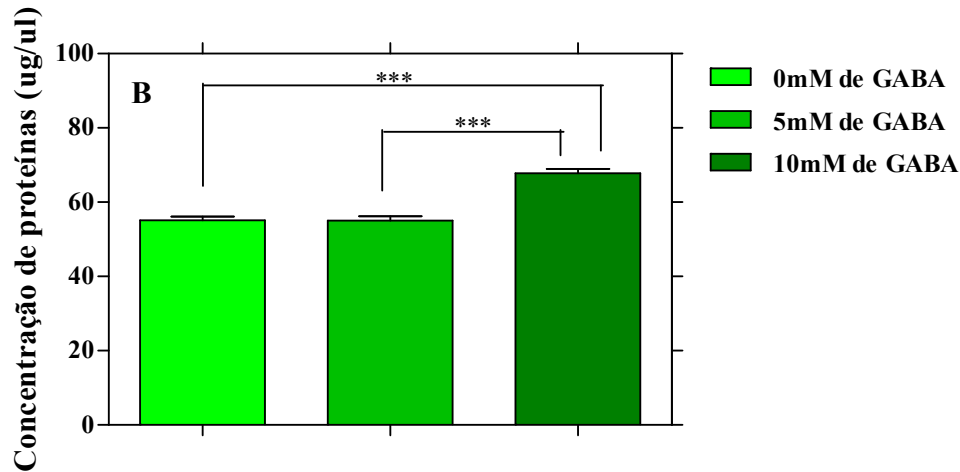


Figura 14: Determinação da concentração de proteínas extracelulares (ug/ul) secretadas por *M. phaseolina*, mediante a presença de concentrações crescentes de GABA, sobre o efeito de duas temperaturas, 25°C (A) e 37°C (B). One way ANOVA, seguida de um teste de comparações múltiplas de Tukey, foram usados para determinar a significância estatística da concentração de proteínas extracelulares de *M. phaseolina* na presença de concentrações crescentes de GABA, a temperaturas distintas (*p < 0,05; **p < 0,01, ***p < 0,001).

Os resultados obtidos permitem constatar que não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) na concentração de proteínas extracelulares, secretadas por *M. phaseolina* a 25°C (figura 14A), independentemente da adição ou não adição de diferentes concentrações de GABA. No entanto, a concentração de proteínas extracelulares secretadas por *M. phaseolina* a 37°C (figura 14B) é bastante significativa ($p < 0,05$) quando o fungo cresce na presença de 10mM de GABA, sendo esta maior comparativamente com a concentração obtida quando o fungo cresce na presença de 5mM de GABA, e ausência de GABA.

4.5.2. SDS-PAGE

Após crescimento a 25 e 37°C, na presença de concentrações crescentes de GABA, o secretoma de *M. phaseolina* foi analisado por SDS-PAGE (Figura 15).

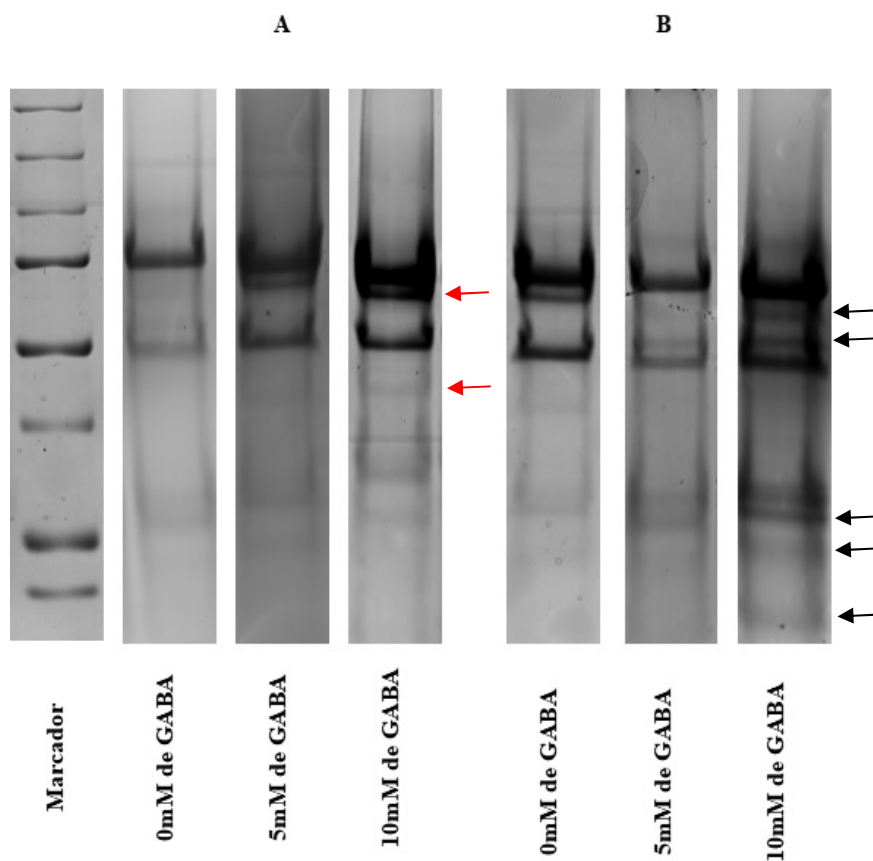


Figura 15: SDS-PAGE das amostras extracelulares, correspondentes ao secretoma de *M. phaseolina*, depois de sete dias de incubação, a 25 e 37°C, na presença de concentrações crescentes de GABA. Géis representativos de três análises. As setas a vermelho (25°C) e a preto (37°C) indicam as diferenças nas bandas detetadas.

A tabela 1 permite analisar diferenças nos pesos moleculares das proteínas extracelulares de *M. phaseolina* na presença de concentrações crescentes de GABA, a 25 e 37°C, permitindo estabelecer uma correlação entre a crescente adição de GABA e o respetivo peso das proteínas produzidas.

Tabela 1: Peso molecular aparente das proteínas extracelulares produzidas por *M. phaseolina*, crescido a 25 e 37°C, mediante o efeito de concentrações crescentes de GABA, detetadas por SDS-PAGE.

PE35	25°C			37°C		
	0mM de GABA	5mM de GABA	10mM de GABA	0mM de GABA	5mM de GABA	10mM de GABA
Peso Molecular (kDa)						
136.2	-	-	-	-	-	-
112.5	-	-	-	-	-	-
90.7	-	-	-	-	-	-
83.1	+	+	+	+	+	+
78.2	-	+	+	+	-	+
70.6	+	+	+	-	+	+
54.4	-	+	+	-	-	+
49.5	-	-	-	-	-	-
45	+	+	+	+	+	+
37.2	+	+	+	-	-	+
31.6	-	-	-	-	-	+
27.3	-	-	-	-	-	+

A caracterização electroforética do secretoma de *M. phaseolina* permite constatar que quando crescido a 25°C (figura 15A), na ausência de GABA secreta quatro proteínas em quantidade detetável por SDS-PAGE, sendo o seu peso molecular de 83,1; 70,6; 45,0 e 37,2 kDa. A 25°C, na presença de 5 e 10mM de GABA, *M. phaseolina* secreta 6 proteínas de peso molecular de 83,1; 78,2; 70,6; 54,4; 45,0 e 37,2 kDa. Quando *M. phaseolina* cresce a 37°C (figura 15B), na ausência de GABA secreta 3 proteínas de peso molecular de 83,1; 78,2 e 45, sendo que na presença 5mM de GABA, secreta 3 proteínas de peso molecular de 83,1; 70,6 e 45 kDa. Na presença de 10mM de GABA, secreta 8 proteínas de peso molecular de 83,1; 78,2; 70,6; 54,4; 45; 37,2; 31,6 e 27,3 kDa.

4.6. Zimografia

Realizaram-se ensaios de zimografia com o intuito de caracterizar as proteases e lipases extracelulares de *M. phaseolina*, quando crescido na presença de concentrações crescentes de GABA, a temperaturas de 25 e 37°C. Para tal, prepararam-se géis de zimografia, contendo como substrato gelatina (proteases) e azeite (lipases).

4.6.1. Atividade proteolítica

Os resultados obtidos, através da técnica de zimografia, que permitem caracterizar as proteases extracelulares de *M. phaseolina* crescido a duas temperaturas diferentes (25 e 37°C), na presença de concentrações crescentes de GABA (0, 5 e 10mM), encontram-se na figura 16.

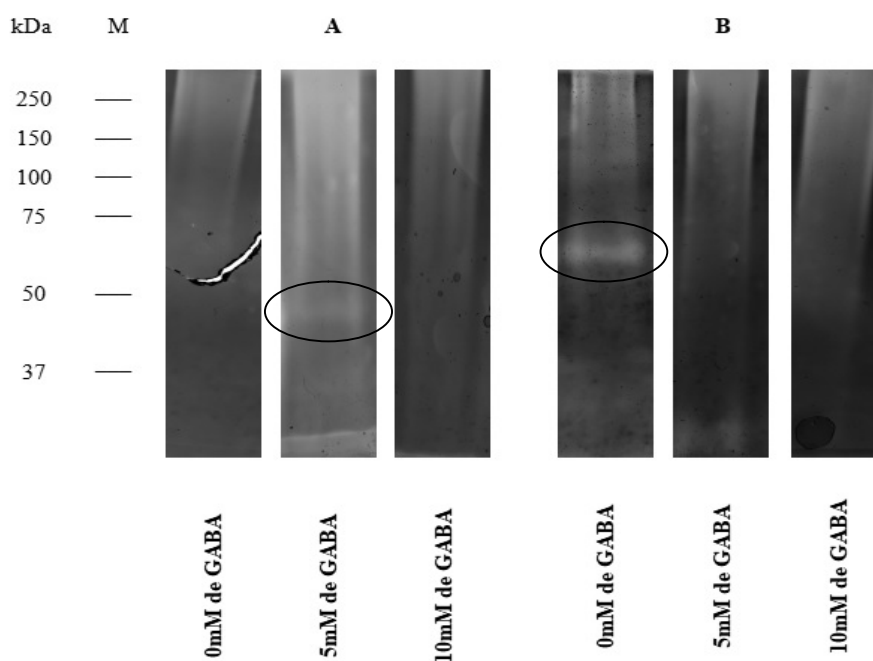


Figura 16: Atividade extracelular proteolítica de *M. phaseolina* detetada por zimografia, utilizando gelatina como substrato. Atividade extracelular proteolítica produzida por *M. phaseolina* na presença de 0, 5 e 10mM de GABA a 25°C (A) e 37°C (B). Géis representativos de três análises. M (Marcador). Os círculos indicam as bandas referentes à expressão de enzimas proteolíticas secretadas por *M. phaseolina*.

A 25°C (figura 16A) apenas existe expressão de enzimas proteolíticas no meio extracelular de *M. phaseolina* quando este cresce na presença de 5mM de GABA. As enzimas detetadas apresentam baixo peso molecular. A 37°C (figura 16B), visualizou-se a expressão de enzimas proteolíticas no meio extracelular de *M. phaseolina* quando crescido na ausência de GABA. As enzimas detetadas apresentam um peso molecular médio. A adição de 5 e 10mM de GABA, não induziu alterações nas proteases extracelulares de *M. phaseolina*.

4.6.2. Atividade lipolítica

Os resultados obtidos, através da técnica de zimografia, que permitem caracterizar as lipases extracelulares de *M. phaseolina* crescido a duas temperaturas diferentes (25 e 37°C), na presença de concentrações crescentes de GABA (0, 5 e 10mM), não revelaram a presença de qualquer atividade lipolítica, uma vez que não correu degradação do substrato. Esta situação ocorreu em todas as amostras testadas, independentemente da temperatura de crescimento ou da concentração de GABA. Este resultado não era esperado, uma vez que, perante os resultados obtidos, descritos anteriormente na deteção, determinação e quantificação da atividade lipolítica, equacionava-se a visualização de bandas fluorescentes que indicassem a presença de atividade lipolítica. Um dos principais motivos pode dever-se ao facto deste método apresentar uma grande sensibilidade, nomeadamente na preparação do meio sólido no qual se incorpora os géis, podendo ser necessário uma concentração muito elevada de lipases para que ocorra a degradação do substrato.

4.7. Ensaio de fitotoxicidade em tomateiros

Como descrito anteriormente, *M. phaseolina* é um fungo fitopatogénico que apresenta a particularidade de afetar um grande número de plantas¹. Sendo o GABA um aminoácido, descrito pelo papel que desempenha na defesa das plantas, para que este estudo fosse o mais completo possível, era crucial realizar ensaios de fitotoxicidade, utilizando o secretoma de *M. phaseolina*, resultante do crescimento deste fungo a 25 e 37°C, na presença de concentrações crescentes de GABA. Seguindo esta linha de pensamento teórico, a planta alvo selecionada para este estudo foi o tomateiro. A escolha por este tipo de planta reside no facto de ser descrito a infeção deste por *M. phaseolina* e ser uma planta relativamente pouco complexa comparativamente com outros tipos de plantas infetadas por este fungo^{10,11}. Os resultados obtidos que permitem analisar diferentes níveis de fitotoxicidade em tomateiros, induzidos pelo secretoma de *M. phaseolina* crescido a 25 e 37°C na presença de concentrações crescentes de GABA, encontram-se na figura 17.

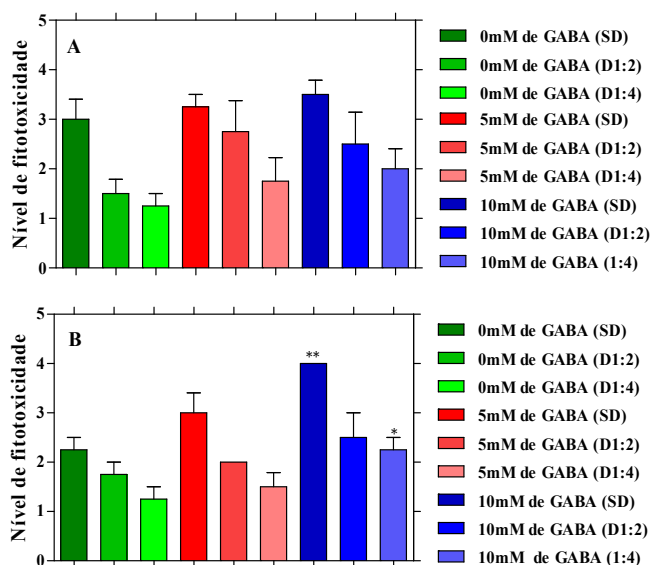


Figura 17: Níveis de fitotoxicidade, baseados numa pontuação (0-4) atribuída às alterações morfológicas das plantas, causados pelo secretoma de *M. phaseolina* obtido a 25°C (A) e 37°C (B). One way ANOVA, seguida de um teste de comparações múltiplas de Tukey, foram usados para determinar a significância estatística dos níveis de fitotoxicidade causados pelo secretoma de *M. phaseolina* na presença de concentrações crescentes de GABA, a temperaturas distintas (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001). Os controlos utilizados foram 0mM GABA (SD), 0mM GABA (D1:2) e 0mM GABA (D1:4).

Foi efetuado um registo fotográfico dos tomateiros infetados e dos respetivos controlos. Este registo pretende complementar a pontuação atribuída com base em alterações morfológicas da planta (figuras 18 - 20).

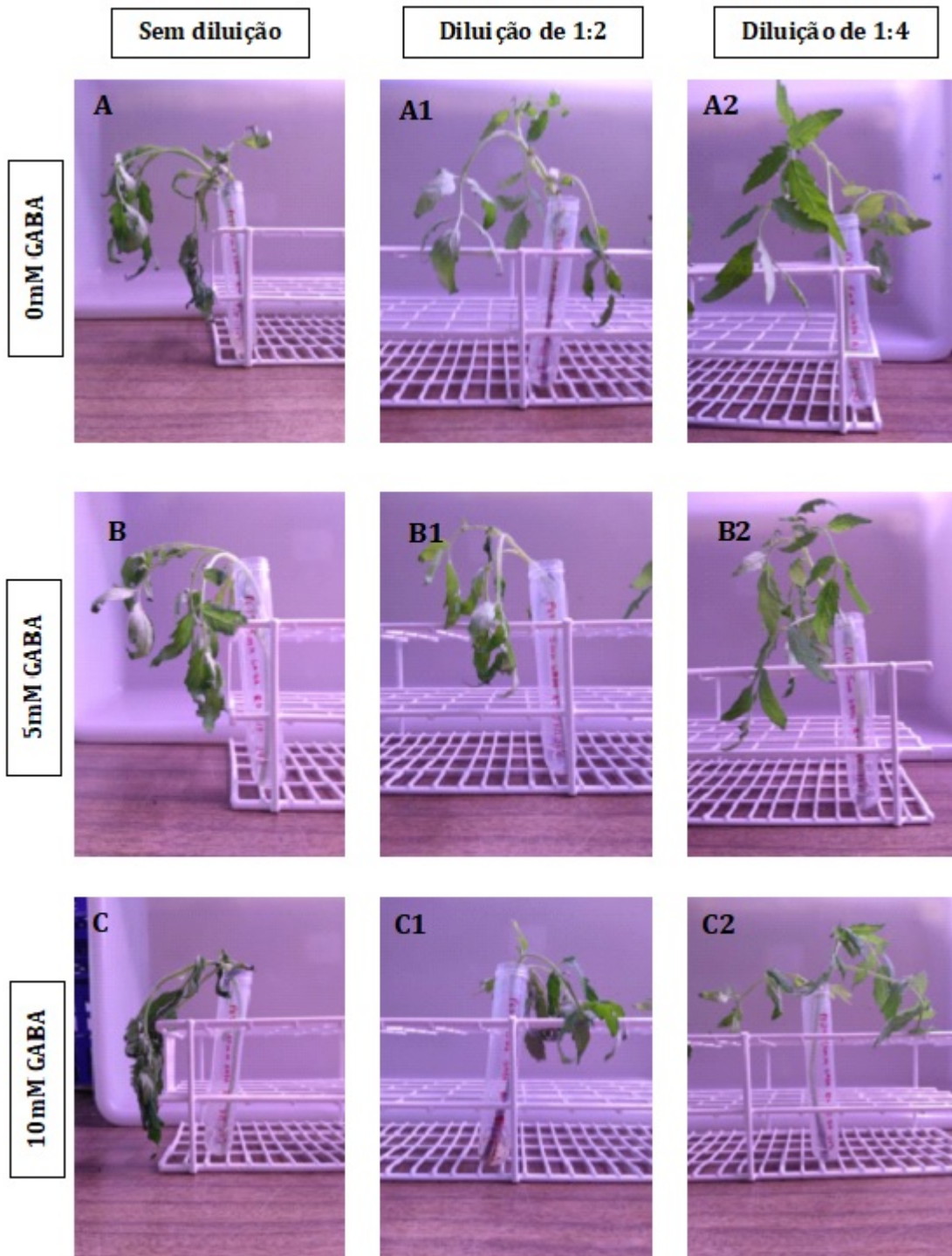


Figura 18: Registo fotográfico das alterações fisiológicas do tomateiro induzidas pelo secretoma de *M. phaseolina* crescido a 25°C, na presença de concentrações crescentes de GABA.

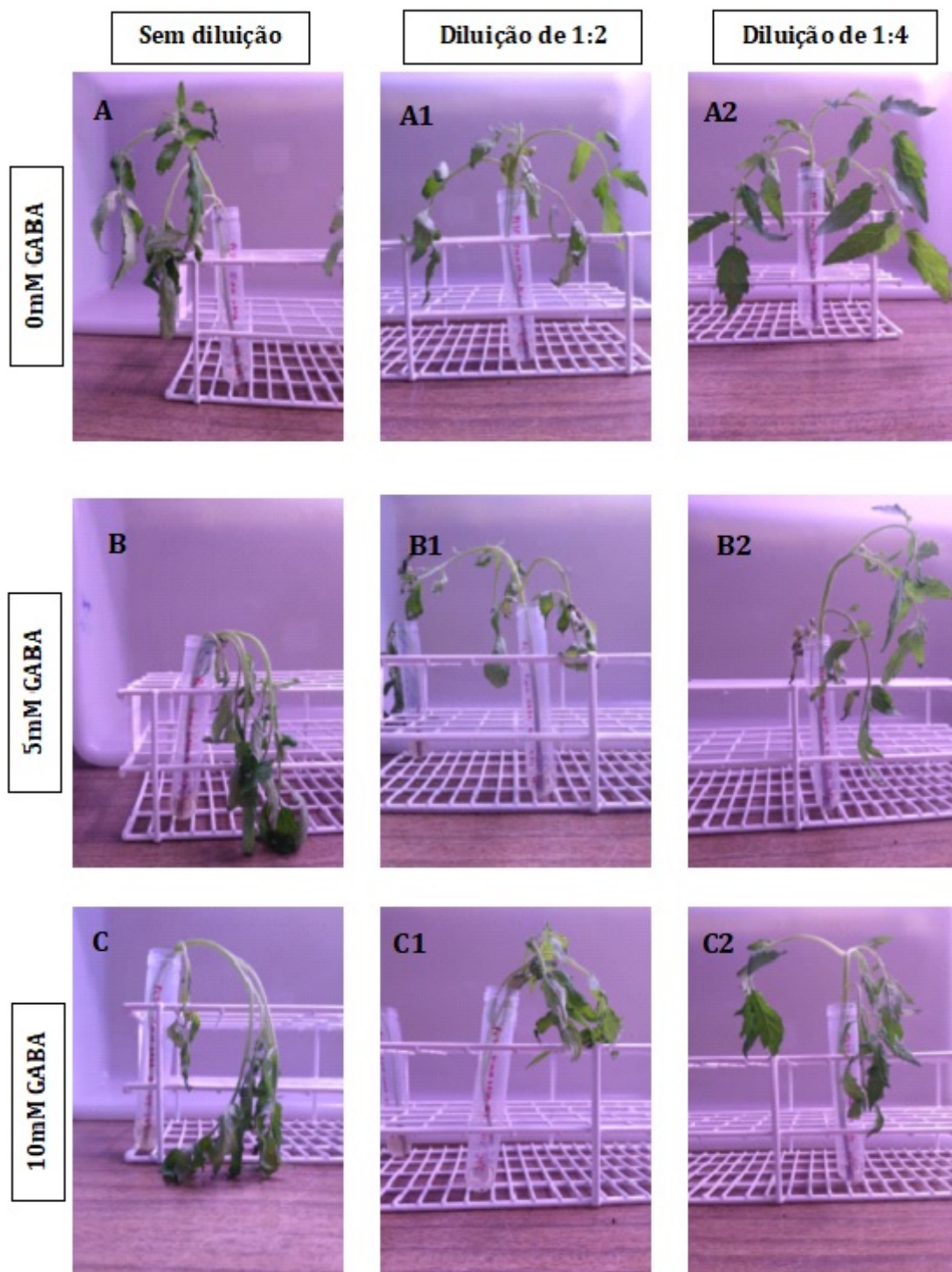


Figura 19: Registo fotográfico das alterações fisiológicas do tomateiro induzidas pelo secretoma de *M. phaseolina* crescido a 37°C, na presença de concentrações crescentes de GABA.

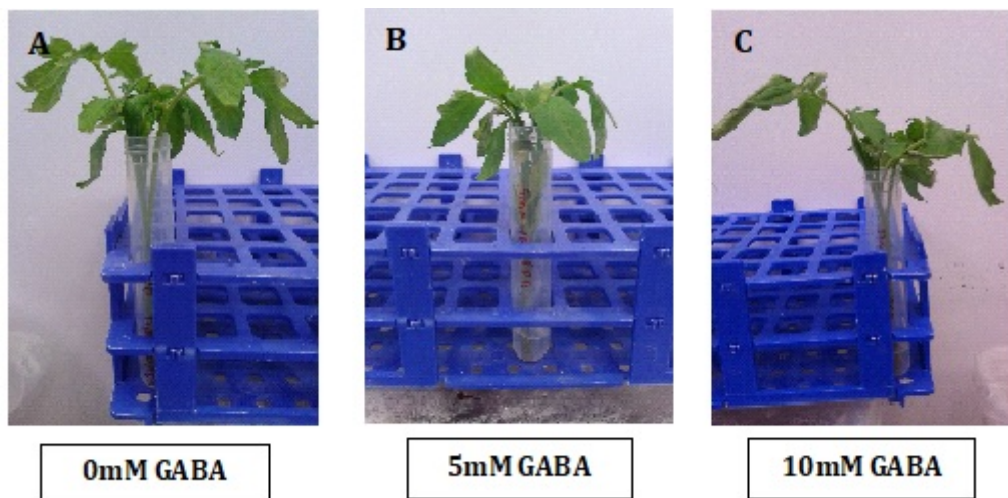


Figura 20: Registo fotográfico dos controlos dos ensaios de fitotoxicidade, que permitem avaliar se concentrações crescentes de GABA, sem secretoma, provocam alterações morfológicas nos tomateiros.

Os resultados obtidos quando testado o secretoma de *M. phaseolina*, crescido a 25°C (figura 17A), na presença de concentrações crescentes de GABA (0, 5 e 10mM) não revelou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) nos níveis de fitotoxicidade registados, embora o registo fotográfico (figura 18) permita observar ligeiras diferenças, nomeadamente no murchamento da planta, provocadas pelo secretoma (sem diluição) de *M. phaseolina* na presença de 10mM de GABA.

Os resultados obtidos quando testado o secretoma de *M. phaseolina*, crescido a 37°C (figura 17B), na presença de concentrações crescentes de GABA (0, 5 e 10mM), permitiram constatar a existência de um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de fitotoxicidade registados, causado pelo secretoma (sem diluição) produzido por *M. phaseolina* na presença de 10mM de GABA. O registo fotográfico (figura 19) permite visualizar níveis diferentes de fitotoxicidade (10mM de GABA): existe claramente uma maior murchamento da planta com as folhas muito descaídas, um dos sintomas característicos da infeção por *M. phaseolina*^{24,35}. Verifica-se de igual modo, a 37°C (figura 17B), um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de fitotoxicidade, provocado pelo secretoma (diluição 1:4) produzido por *M. phaseolina* na presença de 10mM de GABA.

Os resultados obtidos nos ensaios de fitotoxicidade sugerem que o secretoma de *M. phaseolina* apresenta uma maior virulência, quando este fungo cresce na presença de 10mM de GABA, a 37°C. É importante salientar que os controlos foram tratados como

amostra, mas em vez de secretoma, os controlos consistiam em PDB contendo as diferentes concentrações de GABA testadas. No fim dos ensaios, os tomateiros encontravam-se sem alterações morfológicas, o que indica que o GABA por si só não induz alterações fitotóxicas nos tomateiros.

4.8. Ensaio de citotoxicidade

Como referido anteriormente, é descrito na literatura que *M. phaseolina* é um fungo oportunista em seres humanos^{7,45,46}, sendo crucial verificar se este fungo apresenta a capacidade de induzir efeitos citopáticos em células animais, e se esta capacidade é alterada quando este fungo cresce a 25 e 37°C, na presença de diferentes concentrações de GABA (0, 5 e 10mM de GABA).

Para avaliar os efeitos do secretoma de *M. phaseolina* em células Vero, os extratos extracelulares produzidos pelo isolado PE35, foram incubados a 37°C, realizando-se posteriormente ensaios de citotoxicidade. Para cada extrato, quatro diluições [1:1, 1:4 e 1:16 (v:v)] foram preparadas, nas quais a quantidade inicial do extrato foi normalizada mediante os valores do peso seco do micélio. Extratos com capacidade em induzir efeitos citopáticos, até diluições de 1:16, em mais de 50% das células encontra-se descrito na literatura¹¹³. Os resultados obtidos encontram-se descritos na figura 21 e 22.

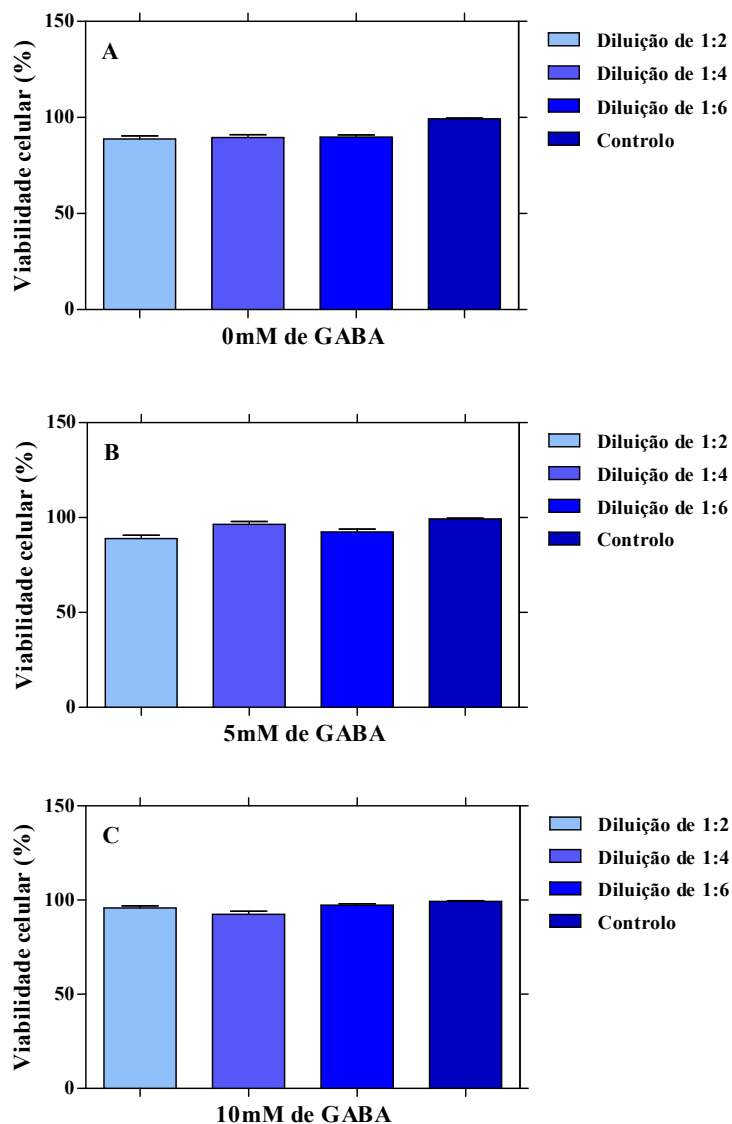


Figura 21: Avaliação do efeito de diferentes concentrações de GABA na verotoxicidade da fração extracelular de *M. phaseolina* na presença de concentrações crescentes de GABA a 25°C, nomeadamente 0mM de GABA (A), 5mM de GABA (B) e 10mM de GABA (C). Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

A 25°C (figura 21), os extratos resultantes do crescimento de *M. phaseolina*, independentemente da diluição testada e da concentração de GABA, não causaram uma diminuição significativa considerável na viabilidade celular.

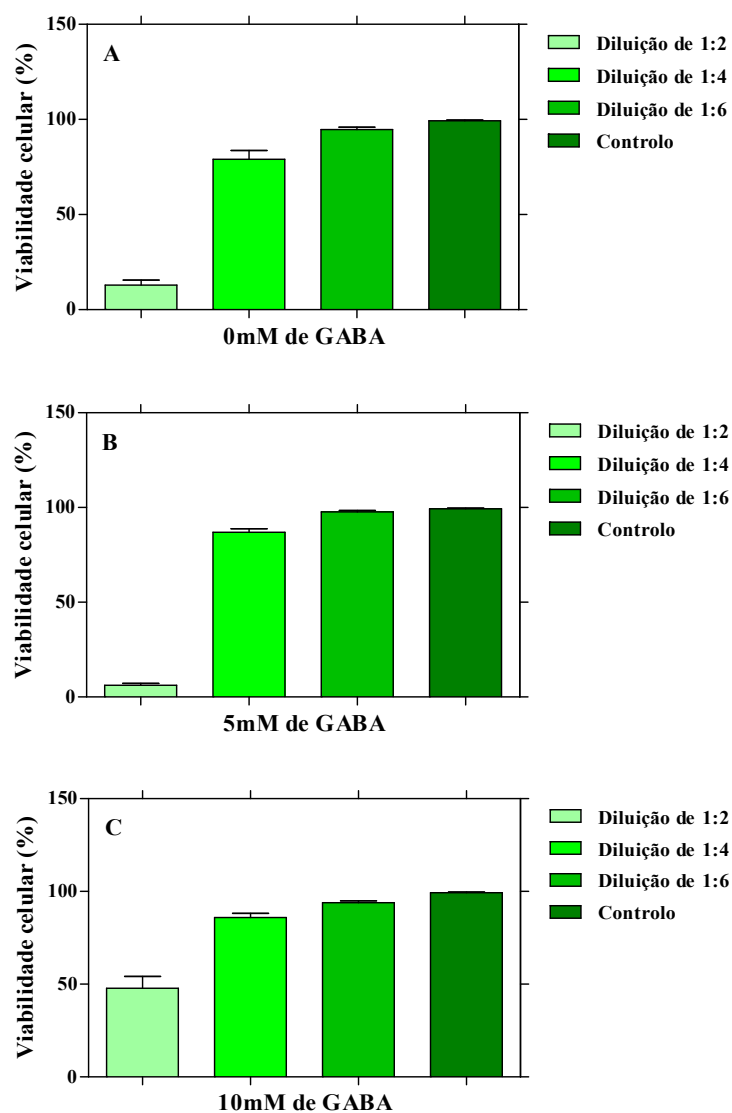


Figura 22: Avaliação do efeito de diferentes concentrações de GABA na verotoxicidade da fração extracelular de *M. phaseolina* na presença de concentrações crescentes de GABA a 37°C, nomeadamente 0mM de GABA (A), 5mM de GABA (B) e 10mM de GABA (C). Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

No entanto, a 37°C (figura 22), os extratos resultantes do crescimento de *M. phaseolina*, revelam que existe uma produção de metabolitos citotóxicos, quando este fungo cresce na presença (5 e 10mM) ou mesmo na ausência de GABA. A maior redução na percentagem da viabilidade celular observou-se quando *M. phaseolina* cresce na presença de 5mM de GABA. Registou-se uma menor redução na viabilidade celular quando este fungo cresce na presença de 10mM de GABA, sendo que parece que, a esta concentração, o GABA

confere algum grau de proteção às células. A diluição em que se observou as alterações anteriormente referidas, foi a diluição de 1:2.

Perante os resultados obtidos na realização deste estudo podemos equacionar que o GABA parece desempenhar um papel na virulência de *M. phaseolina*. Este estudo não permite esclarecer se este fungo metaboliza o GABA sintetizado pela planta em situações de stress. Para finalizar, é importante referir que não foi realizada uma comparação com outros estudos, uma vez que durante a pesquisa bibliográfica não se encontrou informação referente ao efeito do GABA em fungos fitopatogénicos, envolvendo estudos de proteómica.

5. Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo permitem equacionar um possível papel do GABA na virulência de *M. phaseolina*. Uma das correlações mais interessantes que este estudo apresenta está relacionada como o facto de *M. phaseolina* apresentar variações no seu crescimento e virulência, na presença de diferentes concentrações de GABA, a diferentes temperaturas. Podemos concluir que diferentes concentrações de GABA, mediante o efeito de diferentes temperaturas promovem não só o crescimento de *M. phaseolina*, mas também alterações na atividade enzimática, produção de enzimas envolvidas na patogenicidade deste fungo, assim como alterações ao nível do secretoma. Futuras investigações são necessárias.

6. Perspetivas futuras

- ✓ Caracterizar proteínas intracelulares secretadas por *M. phaseolina* mediante o efeito de diferentes concentrações de GABA sobre as mesmas condições de caracterização do secretoma, podem fornecer informações importantes sobre o efeito do GABA na virulência de fungos fitopatogénicos;
- ✓ Verificar se o GABA promove um aumento na síntese de toxinas produzidas por *M. phaseolina*;
- ✓ Analisar possíveis alterações morfológicas em *M. phaseolina*, como por exemplo a produção de microesclerócios, mediante a adição de diferentes concentrações de GABA, a diferentes temperaturas;
- ✓ Perceber se no decorrer do processo infeccioso, *M. phaseolina* utiliza o GABA produzido pelas plantas quando estas se encontram na presença de fatores de stress;
- ✓ É importante testar a hipótese apresentada neste estudo com outros fungos fitopatogénicos do solo. De igual modo, diferentes tipos de plantas devem ser utilizados nos ensaios de fitotoxicidade;
- ✓ Por fim, seria interessante investigar se a infeção causada por *M. phaseolina* promove um aumento na síntese de GABA em plantas, até níveis tão elevados que poderiam ser tóxicos para estas, afetando os seus mecanismos de defesa, o que poderia facilitar a invasão por *M. phaseolina*.

7. Anexos

7.1. Preparação e plaqueamento do meio de cultura PDA

- 1- Calcular a quantidade de meio de cultura a hidratar;
- 2- Pesar o meio em pó;
- 3- Transferir para um frasco de 500mL;
- 4- Hidratar com dH₂O (quantidade adequada à concentração do meio de cultura);
- 5- Homogeneizar manualmente o frasco contendo o meio de cultura, lentamente, para assegurar que o agar não fica retido nas paredes do frasco. Identificar;
- 6- Autoclavar a 121°C durante 20 minutos;
- 7- Arrefecer a 50°C;
- 8- Inserir 10mL de meio em placas de Petri de 50mm ou 16mL em placas de Petri de 90mm. Deixar 5 minutos arrefecer o meio de cultura na presença de chama para solidificar corretamente;
- 9- Armazenar as placas em sacos de plásticos a 4°C.

7.2. Preparação do meio de cultura PDB

- 1- Calcular a quantidade de meio de cultura (PDA) a hidratar;
- 2- Pesar o meio de cultura em pó com auxílio de uma folha de papel;
- 3- Transferir para um frasco de 500mL;
- 4- Hidratar com dH₂O (quantidade adequada à concentração do meio de cultura);
- 5- Filtrar a solução através de um papel de filtro Whatman nº1 de modo a remover o agar;
- 6- Retirar o papel de filtro;
- 7- Inserir 50mL do meio líquido em cada erlenmeyer;
- 8- Selar cada erlenmeyer com folha de alumínio e colocar fita de autoclave;
- 9- Identificar os erlenmeyers;
- 10- Autoclavar a 121°C durante 20min;

11- Armazenar à temperatura ambiente.

7.3. Inoculação em meio sólido

O procedimento é realizado numa câmara de fluxo laminar com as devidas condições assépticas:

- 1- Esterilizar a parte interior da câmara e o furador para remover um *plug* de micélio com um diâmetro de 5mm, com recurso a álcool e chama;
- 2- Remover um *plug* de micélio da borda da placa do meio de cultura PDA (micélio mais recente), com a ajuda de um furador;
- 3- Inocular o *plug* no centro da placa de Petri, contendo meio de cultura PDA (utilizam-se palitos autoclavados para retirar o *plug* de micélio do furador);
- 4- Selar as placas com parafilme;
- 5- Incubar as placas à temperatura desejada num incubador (ausência de luz), durante um período de 5 dias.

7.4. Determinação do crescimento radial

- 1- Colocar a quantidade apropriada de meio de cultura PDA (10mL para placas de Petri de 50mm e 16mL para placas de Petri de 90mm);
- 2- Inocular um *plug* no centro da placa de Petri, com aproximadamente 5mm;
- 3- Incubar as placas de Petri depois de identificadas e seladas com parafilme, às condições desejadas;
- 4- Medir o crescimento do micélio (cm) no decorrer do período de incubação.

7.5. Crescimento em meio líquido

O procedimento é realizado numa câmara de fluxo laminar com as devidas condições assépticas:

- 1- Esterilizar a parte interior da câmara, o furador para remover um *plug* de micélio com um diâmetro de 5mm, com recurso a álcool e chama;
- 2- Remover dois *plugs* de micélio da borda da placa de uma cultura em meio sólido com sete dias de crescimento, com a ajuda de um furador;
- 3- Inocular dois *plugs* no interior de cada erlenmeyer, contendo meio de cultura PDB (utilizam-se palitos autoclavados para retirar o *plug* de micélio do furador);
- 4- Selar as placas com parafilme;
- 5- Selar cada erlenmeyer com tampa apropriada;
- 6- Incubar os erlenmeyers à temperatura desejada (ausência de luz), por um período de sete dias.

7.6. Determinação da biomassa

Parte 1: Depois de realizado o ponto 7.5. da secção dos anexos procede-se à preparação dos papeis de filtro Whatman nº1.

- 1.1- Cortar uma folha de papel de filtro em 9 quadrados e dobrar 2x. A quantidade é diretamente proporcional ao número de amostras;
- 1.2- Numerar os filtros com um lápis (marcação permanente);
- 1.3- Secar os filtros a 50°C durante 3 dias;
- 1.4- Pesar os filtros (peso inicial).

Parte 2: Filtração do meio extracelular.

- 2.1- Filtrar o meio extracelular em cada erlenmeyer num papel de filtro para tubos de Falcon de 50mL;

- 2.2- Transferir 4mL para tubos de 10mL, para ensaios de fitototoxicidade;
- 2.2- Transferir 1mL para cada eppendorf, para ensaios de citotoxicidade;
- 2.3- Guardar 20mL de meio extracelular para a extração de proteínas extracelulares;
- 2.4- Transferir as restantes amostras para alíquotas de 1mL, para a quantificação de lipases e ensaios de zimografia;
- 2.5- Armazenar tudo num recipiente, com as amostras devidamente identificadas, a -80°C.

Parte 3: Cálculos da biomassa do micélio

- 3.1- Depois de efetuada a filtração do meio extracelular, colocar cada filtro em placas de Petri (90mm), identificadas com o número do filtro e possível informação adicional;
- 3.2- Secar o micélio a 50°C durante 3 dias;
- 3.3- Pesquisar o peso seco do micélio contido no filtro;
- 3.4- Calcular a biomassa do micélio (peso do micélio contido no filtro - peso do filtro inicial).

7.7. Preparação da solução stock de GABA (5M)

- 1- Pesquisar 2,578g de GABA em pó para um tubo de 13mL;
- 2- Adicionar 5mL de água ultra-pura (água Mili-Q) para dissolver o GABA;
- 3- Esterilizar a solução GABA, processo que é realizado com o auxílio de uma seringa de 5mL, à qual é adicionada um filtro com poro de 2µm;
- 4- Dividir o GABA esterilizado para alíquotas de 1mL;
- 5- Armazenar a solução final -20°C.

7.8. Adição de GABA em meio de cultura PDA

Em meio de cultura PDA, o GABA é adicionado quando o meio ainda se encontra quente e liquefeito. Perante um total de 450mL de PDA, 150mL destes repartiram-se por três frascos de 250mL. Deste modo:

1° Frasco

- ✓ Contêm 150mL de PDA, sem qualquer adição de GABA.

2° Frasco

- ✓ Contêm 150mL de PDA, com adição de 5mM de GABA, o correspondente a 150 μ L da solução stock.

3° Frasco

- ✓ Contêm 150mL de PDA, com adição de 10mM de GABA, o correspondente a 300 μ L da solução stock.

7.9. Adição de GABA em meio de cultura PDB

Em meio de cultura PDB, o GABA é adicionado quando o meio ainda se encontra quente. Perante um total de 1400mL de PDB, 50mL foram repartidos para 26 erlenmeyers de 250mL. Deste modo:

- ✓ A um total de 8 erlenmeyers contendo meio de cultura PDB não foi adicionada qualquer quantidade de GABA;
- ✓ A um total de 8 erlenmeyers contendo meio de cultura PDB foi adicionado, individualmente, uma concentração de 50 μ L da solução stock de GABA, o correspondente a 5mM de GABA;
- ✓ A um total de 8 erlenmeyers contendo meio de cultura PDB foi adicionado, individualmente, uma concentração de 100 μ L da solução stock de GABA, o correspondente a 10mM de GABA.

Em ambos os casos, depois da adição de GABA ao meio procede-se a uma agitação cautelosa. O crescimento de fungos em ambos os meios segue as especificações referidas nos pontos 7.3. e 7.5. na secção dos anexos.

7.10. Quantificação da atividade lipolítica

Composição dos padrões:

Padrão A: 0,05 mM pNPP – 0,1mL ss pNPP + 1,9mL DMSO + Solução tampão.

Padrão B: 0,1 mM pNPP – 0,2mL ss pNPP + 1,8mL DMSO + Solução tampão.

Padrão C: 0,25 mM pNPP – 0,5mL ss pNPP + 1,5mL DMSO + Solução tampão.

Padrão D: 0,33 mM pNPP – 0,66mL ss pNPP + 1,34mL DMSO + Solução tampão.

Padrão E: 0,5 mM pNPP – 1mL ss pNPP + 1mL DMSO + Solução tampão.

Padrão F: 0,66 mM pNPP – 1,32mL ss pNPP + 0,68mL DMSO + Solução tampão.

Padrão G: 0,75 mM pNPP – 1,5mL ss pNPP + 0,5mL DMSO + Solução tampão.

Princípio do método:

- 1- Adicionar 50µL de cada padrão e controlo positivo nos respetivos poços, em triplicado;
- 2- Adicionar 100µL de dH₂O aos mesmos poços;
- 3- Adicionar o branco (150µL de dH₂O) aos respetivos poços, em triplicado;
- 4- Adicionar 150µL de meio extracelular fúngico nos respetivos poços, em triplicado;
- 5- Adicionar 50µL de pNPP a cada poço;
- 6- Para a reação de 0min, adicionar imediatamente em todos os poços 50µL de 0,1mM bicarbonato de sódio para parar a reação. Para as placas de 45 e 90min, deixar à temperatura ambiente e parar a reação com 0,1mM de bicarbonato de sódio nos tempos pretendidos;
- 7- Ler a absorvância a 405nm.

7.11. Extração total de proteínas extracelulares

Para a realização deste método, utilizaram-se tubos de 50mL contendo cerca de 20-30mL de meio extracelular filtrado. É recomendado preparar a solução de TCA/acetona um dia antes do procedimento. A solução de DTT deve ser preparada no dia do ensaio, e adicionada apenas no dia em que é preparada. Durante todo o procedimento as amostras devem ser colocadas em gelo.

Procedimento:

- 1- Recolher o meio de cultura previamente do filtrado e congelá-lo a -20°C pelo menos a uma hora, ou no decorrer da noite para promover a precipitação de polissacarídeos;
- 2- Centrifugar a $4800\times g$, 1h a 4°C . O equipamento utilizado foi uma ultracentrifuga Beckman Coulter Optima, recorrendo a um rotor SW Ti32 (utilizar tubos ultra limpos de 38,5mL). Todos os tubos devem ter o mesmo peso;
- 3- Remover o sobrenadante para tubos de 50mL previamente identificados e adicionar um volume de TCA/Acetona [20%/80% (w/v)] com 0,14% (w/v) de DTT e incubar a -20°C (1h);
- 4- Centrifugar a $1500\times g$, 20min (4°C) e descartar o sobrenadante. Esta etapa, assim como as lavagens a realizar depois desta, devem ser executadas de forma minuciosa para evitar ao máximo a perda de proteínas;
- 5- Remover o excesso de TCA lavando o *pellet* sucessivamente com 10mL de acetona gelada (2x), e 10mL de acetona gelada (80%) (v/v). A acetona deve ser mantida a -20°C e em gelo enquanto se usa;
- 6- Descartar a acetona e transferir o *pellet* para um eppendorf com a ajuda de uma ponta;
- 7- Ressuspender o *pellet* em 500 μl de buffer lysis (7M ureia, 2M tioureia, 4% CHAPS), dividir em alíquotas e armazenar a -20°C (ou -80°C).

7.12. SDS-PAGE

1º Desnaturação da amostra

- 1.1- Transferir 20µL de amostra para um microtubo;
- 1.2- Adicionar 20µL da solução desnaturante;
- 1.3- Aquecer as amostras a 100°C por 5min;
- 1.4- Deixar arrefecer à temperatura ambiente;
- 1.5- Carregar no gel ou armazenar a -20°C.

Solução desnaturante:

- ✓ B-mercaptoetanol 2%;
- ✓ SDS 2%;
- ✓ Ureia 8M;
- ✓ Tris 100mM;
- ✓ Bicina 100mM.

2º Eletroforese

- 2.1- Montar os vidros, colocando água MiliQ entre estes para verificar possíveis fugas;
- 2.2- Preparação dos géis de separação (10%) e de concentração (4%);

Receita para 2 Géis:

<i>10% Acrilamida: Bisacrilamida</i>		<i>4% Acrilamida: Bisacrilamida</i>	
<i>(Gel de separação)</i>		<i>(Gel de concentração)</i>	
Reagente	Quantidades	Reagente	Quantidades
H ₂ O MiliQ	3,98mL	H ₂ O MiliQ	3,26mL
Tris 1,5M pH 8,8	3,35mL	Tris 0,625M pH 6,8	1,25mL
SDS 10%	200µL	SDS 10%	100µL
Acrilamida:	2,545mL	Acrilamida:	488µL
Bisacrilamida (40%)		Bisacrilamida (40%)	
Persulfato de Amónia (10%)	100µL	Persulfato de Amónia (10%)	50µL

TEMED	5 μ L	TEMED	2,5 μ L
-------	-----------	-------	-------------

- 2.3-** Adicionar 4,5mL da mistura do gel de separação, após suave homogeneização para não fazer bolhas, e adicionar Isopropanol 50% (v/v);
- 2.4-** Após a polimerização da acrilamida, retirar o isopropanol;
- 2.5-** Preencher o restante espaço com gel de concentração (4%);
- 2.6-** Colocar os pentes (10 poços), evitando a formação de bolhas;
- 2.7-** Transferir o gel para o suporte da tina da eletroforese (gel com os pentes virados para dentro);
- 2.8-** Preencher a tina com tampão corrida, removendo concomitantemente o pente;
- 2.9-** Adicionar 2,5 μ L de marcador molecular (Precision Plus Protein Standard, Bio-Rad), 20 μ L de cada amostra nos poços selecionados para o efeito, utilizando uma seringa de Hamilton (50 μ L);
- 2.10-** Iniciar a corrida eletroforética a 100V durante 100min num Mini-Proteon 3 (Bio-rad);
- 2.11-** Retirar o gel, com a ajuda da raspa e cortar as zonas dos poços;
- 2.12-** Colocar 50mL de solução corante por gel. A coloração realizada pelo Coomassie blue deteta concentrações da ordem de 100 ng;
- 2.13-** Deixar agitar durante 1 hora (verificar se o gel está corado);
- 2.14-** Retirar a solução corante;
- 2.15-** Passar o gel (dentro da caixa) por água destilada (no fim descartar);
- 2.16-** Colocar a solução descorante (aproximadamente 100mL por gel) sob agitação;
- 2.17-** Substituir a solução descorante quando esta ficar azulada até que as bandas de proteína apareçam coradas num fundo incolor;
- 2.18-** Digitalizar e analisar os géis.

Composição das soluções:

Tampão de corrida

- ✓ Tris-Bicina 100mM;
- ✓ SDS 10%;
- ✓ dH₂O.

Tampão de carga

- ✓ Tris 1,5M pH 8,8;
- ✓ SDS 10% (m/v);
- ✓ Glicerol 20%.
- ✓ dH₂O.

Solução corante

- ✓ Coomassie Brilliant Blue 0,25% (w/v);
- ✓ Acido acético 10% (v/v);
- ✓ Etanol 50% (v/v);
- ✓ dH₂O.

Solução descorante

- ✓ Etanol 25% (v/v);
- ✓ Acido acético 5% (v/v);
- ✓ dH₂O.

7.13. Zimografia

Atividade proteolítica

- 1- Montar os vidros, colocando H₂O MiliQ entre estes para verificar possíveis fugas no suporte;
- 2- Preparação dos géis de separação (10%) e de concentração (4%);

Receita para 2 Géis:

<i>10% Acrilamida: Bisacrilamida (Gel de separação)</i>		<i>4% Acrilamida: Bisacrilamida (Gel de concentração)</i>	
Reagente	Quantidades	Reagente	Quantidades
H ₂ O MiliQ	3,34mL	H ₂ O MiliQ	3,36mL
Gelatina 1%	500µL	Gelatina 1%	-
Tris 1,5M pH 8,8	3,36mL	Tris 0,625M pH 6,8	1,6mLµL
SDS 10%	200µL	SDS 10%	100µL
Acrilamida:	2,5mL	Acrilamida:	488µL
Bsisacrilamida (40%)		Bsisacrilamida (40%)	
Persulfato de Amónia (10%)	100µL	Persulfato de Amónia (10%)	50µL
TEMED	10µL	TEMED	2,5µL

- 3- Adicionar 4,5mL da mistura do gel de separação, após suave homogeneização para não fazer bolhas, e adicionar Isopropanol 50% (v/v);
- 4- Após a polimerização da acrilamida, retirar o isopropanol;
- 5- Preencher o restante espaço com gel de concentração (4%);
- 6- Colocar os pentes (10 poços), evitando a formação de bolhas;
- 7- Preparação das amostras:
 - 7.1- Hidratar as amostras liofilizadas com 150µL de Água MiliQ;
 - 7.2- Utilizar um suporte utilizado para amostras de PCR e respetivos eppendorfs, identificar;
 - 7.3- Colocar 15µL de tampão de carga e 15µL de amostra e controlo em microtubos devidamente identificados, esperar 10min em gelo.

- 8- Transferir o gel para o suporte da tina da eletroforese (gel com os pentes virados para dentro);
 - 9- Preencher a tina com tampão corrida, removendo concomitantemente o pente;
 - 10- Adicionar 2,5 μ L de marcador molecular (Precision Plus Protein Standard, Bio-Rad), 20 μ L de cada amostra nos poços selecionados para o efeito, utilizando uma seringa de Hamilton (50 μ L);
 - 11- Iniciar a corrida eletroforética a 100V durante 100min num Mini-Proteon 3 (Bio-rad);
 - 12- Retirar o gel, com a ajuda da raspa e cortar as zonas dos poços;
 - 13- Submergir o gel em Triton X-100 (v/v), durante uma hora sobre agitação;
 - 14- Incubar o gel em tampão de reação durante 14h (overnigth), com agitação constante;
 - 15- Colocar 50mL de solução corante por gel. A coloração realizada pelo Coomassie blue deteta concentrações da ordem de 100 ng;
 - 16- Deixar agitar durante 1 hora (verificar se o gel está corado);
 - 17- Retirar a solução corante;
 - 18- Passar o gel (dentro da caixa) por água destilada (no fim descartar);
 - 19- Colocar a solução descorante (aproximadamente 100mL por gel) sob agitação;
 - 20- Substituir a solução descorante quando esta ficar azulada até que as bandas de proteína apareçam coradas num fundo incolor;
- 2.21- Digitalizar e analisar os géis.

Composição das soluções:

Tampão de reação

- ✓ Tris 50mM ph 8,8;
- ✓ NaCl 5mM;
- ✓ CaCl₂ 10mM;
- ✓ ZnCl₂ 1 μ M;
- ✓ dH₂O.

Atividade lipolítica

- 1- Montar os vidros, colocando H₂O MiliQ entre estes para verificar possíveis fugas no suporte;
- 2- Preparação dos géis de separação (10%) e de concentração (4%);

Receita para 2 Géis:

<i>10% Acrilamida: Bisacrilamida (Gel de separação)</i>		<i>4% Acrilamida: Bisacrilamida (Gel de concentração)</i>	
Reagente	Quantidades	Reagente	Quantidades
H ₂ O MiliQ	3,98mL	H ₂ O MiliQ	3,36mL
TrIS 1,5M pH 8,8	3,95mL	TrIS 0,625M pH 6,8	1,25mL
SDS 10%	200µL	SDS 10%	100µL
Acrilamida:	2,545mL	Acrilamida:	488µL
Bisacrilamida (40%)		Bisacrilamida (40%)	
Persulfato de Amónia (10%)	100mL	Persulfato de Amónia (10%)	50mL
TEMED	5µL	TEMED	2,5µL

- 3- Adicionar 4,5mL da mistura do gel de separação, após suave homogeneização para não fazer bolhas, e adicionar Isopropanol 50% (v/v);
- 4- Após a polimerização da acrilamida, retirar o isopropanol;
- 5- Preencher o restante espaço com do suporte com gel de concentração (4%);
- 6- Colocar os pentes (10 poços), evitando a formação de bolhas;
- 7- Preparação das amostras:
 - 7.1- Hidratar as amostras liofilizadas com 150µL de Água MiliQ;
 - 7.2- Utilizar um suporte utilizado para amostras de PCR e respetivos eppendorfs, identificar;
 - 7.3- Colocar 15µL de tampão de carga e 15µL de amostra e controlo em microtubos devidamente identificados, esperar 10min em gelo.
- 8- Transferir o gel para o suporte da tina da eletroforese (gel com os pentes virados para dentro);
- 9- Preencher a tina com tampão corrida, removendo concomitantemente o pente;

- 10- Adicionar 2,5µL de marcador molecular (Precision Plus Protein Standard, Bio-Rad), 20µL de cada amostra nos poços selecionados para o efeito, utilizando uma seringa de Hamilton (50µL);
- 11- Iniciar a corrida eletroforética a 100V durante 100min num Mini-Proteon 3 (Bio-rad);
- 12- Retirar o gel, com a ajuda da raspa e cortar as zonas dos poços;
- 13- Submergir o gel em Triton X-100 (v/v), durante uma hora sobre agitação;
- 14- Sobrepor o gel num meio solido de rodamina B/azeite preparado anteriormente durante três horas a 37°C. Colocar tampão de reação (“tampão universal” pH 8), apenas em quantidade suficiente para humedecer toda a placa:

Composição do meio rodamina B/azeite

- ✓ 0,001% de rodamina B (w/v);
- ✓ 3% de azeite;
- ✓ 2,5% de agar;
- ✓ Hidratar com 40mL de Tampão Tris-HLC ph8.0.

- 14.1- Colocar o frasco, contendo o meio rodamina B/azeite, num agitador (colocar íman) com temperatura constante (50°C) para ajudar a dissolver o agar, durante 15 min;
- 14.2- De seguida, retira-se o íman e coloca-se no micro-ondas (tampa desenroscada), parando sucessivas vezes para agitar manualmente. Quando apresentar uma consistência homogénea, depositar para uma placa de 40mL;
- 14.3- Esperar que solidifique e identificar a placa consoante o número de géis e o número de amostras.
- 15- Digitalizar e analisar os géis.

7.14. Avaliação da citotoxicidade pelo método da Resazurina

1º Contagem da viabilidade das células

- 1.1- Remover cerca 100-200µL da suspensão celular para um microtubo;
- 1.2- Adicionar um volume igual da solução azul de tripano;
- 1.3- Colocar uma lamínula sobre a câmara de contagem de hematocitómetros;
- 1.4- Adicionar 5-10µL da suspensão celular na camara de contagem e observar no microscópio com uma amplificação 20x;
- 1.5- Contar o número de células viáveis (células brilhantes) e células não viáveis (células azuis). Para se obter uma elevada precisão na contagem, vários campos devem ser contados;
- 1.6- Calcular a concentração da percentagem das células viáveis e não viáveis.

2º Ensaio de citotoxicidade pelo método da Resazurina

- 2.1- Adicionar 50µL de sucessivas diluições das amostras (1:1; 1:4; 1:16), todas em triplicado;
- 2.2- Usar, também em triplicado, poços vazios, poços apenas com células, poços com soro fisiológico e poços com meio de cultura do fungo;
- 2.3- Incubar durante 24 horas a 37°C;
- 2.4- Finalizado o período de incubação, remover o meio por aspiração e adicionar 50µL de DMEM com 10% de resazurina (0,1mg/mL);
- 2.5- Incubar a 37°C em condições de 5% de CO₂ até que ocorra a reação de redução da resazurina;
- 2.6- Usar um leitor de microplacas baseado em princípios de espectrofotometria (Infinite 200, Tecan i-control) para ler a absorvância nos comprimentos de onda de 570nm e 600nm;
- 2.7- Calcular a viabilidade das células.

Capítulo 3: Avaliação do potencial antagonista de *Trichoderma harzianum* T1A e *Trichoderma atroviride* T17 contra *Macrophomina phaseolina*

1. Introdução

1.1. Controlo biológico

A grande maioria das doenças em plantas, transmitidas pelo solo, são causadas maioritariamente por bactérias, fungos e nemátodes, os quais por sua vez são responsáveis por elevadas perdas económicas na área do setor agrícola¹²⁴.

De forma a controlar estes agentes patogénicos, bactericidas, fungicidas e nematicidas têm sido largamente utilizados com sucesso. No entanto, apesar de serem medidas económicas mais eficientes, as consequências ambientais e toxicológicas da sua utilização limitaram a sua comercialização¹²⁵. De igual modo, é importante salientar que o uso repetido destes produtos originou um fenómeno de resistência por parte de alguns agentes patogénicos¹²⁶.

Deste modo, o controlo biológico, contra agentes patogénicos do solo que infetam plantas, por microrganismos antagonistas é um método não químico, com elevado potencial para controlar a doença em plantas¹²⁴. De facto, o controlo biológico é visto como uma medida estratégica no controlo de pragas agrícolas, apresentando inúmeras vantagens, nomeadamente:

- ✓ Potencia a formação de uma comunidade microbiana antagonista na rizosfera;
- ✓ Supressão de agentes patogénicos;
- ✓ Melhoramento geral na saúde das plantas;
- ✓ Potenciam o crescimento das plantas;
- ✓ Aumentam a captura e disponibilidade de nutrientes;
- ✓ Favorecem a resistência do hospedeiro perante situações de stress biótico e abiótico^{124,125,127}.

De uma forma generalista, os modos de ação pelos quais os microrganismos antagónicos atuam são nomeadamente:

- ✓ Estimulação dos mecanismos de resistência da planta;

- ✓ Competição por nutrientes (carbono e nitrogénio) em sítios de colonização;
- ✓ Inibição ou parasitismo de agentes patogénicos, através da produção de antibióticos, por vezes combinados com CWDEs^{127,128,129}.

É descrito na literatura que um grande número de microrganismos apresenta propriedades benéficas para as plantas, ao estabelecerem uma relação mutualista com estas¹³⁰. Fungos pertencentes ao género *Trichoderma* e bactérias pertencentes ao género *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* e *Enterobacter* desenvolveram mecanismos que permitiram não só melhorar a resistência das plantas a doenças, mas também o crescimento e a produtividade destas. De igual modo, é descrito que rhizobactéria, um grupo de bactérias que habitam na rizosfera, apresentam as propriedades anteriormente referidas¹³¹.

1.2. *Trichoderma*

A grande maioria dos fungos pertencentes ao género *Trichoderma* desenvolveram uma capacidade incrível de estabelecer relações mutualistas com plantas¹³¹. De facto, esta capacidade de conseguir afetar outros fungos, produzir antibióticos que posteriormente afetam outros microrganismos e sobretudo de atuar como agente de controlo biológico, é descrita há mais de 70 anos¹³².

As propriedades anteriormente referidas relativamente ao potencial antagonista de *Trichoderma* spp. permitem perceber a grande importância que estes fungos representam a nível industrial¹³³. O facto de as espécies de *Trichoderma* serem largamente utilizadas como agentes de controlo biológico deve-se ao facto de estas apresentarem enormes benefícios para a planta, desde promoverem o seu crescimento, aumentar a captura de nutrientes a partir do solo e reduzir a atividade de agentes patogénicos transmitidos pelo solo que podem afetar o normal crescimento da planta^{130,134}.

No entanto, não deixa de ser intrigante que alguns fungos representativos deste género sejam patogénicos oportunistas emergentes em seres humanos¹³⁵. Determinadas espécies de *Trichoderma* (*Trichoderma citrinoviride* e *Trichoderma longibrachiatum*) apresentam a capacidade de infetar pacientes imunodeprimidos, depois de submetidos a transplantes e em pacientes portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana e leucemia. Problemas

respiratórios causados pela inalação de compostos voláteis orgânicos (CVOs) produzidos por espécies de *Trichoderma*, também têm sido documentados^{135,136}. No entanto, não deixa de ser interessante que *T. longibrachiatum*, o mais comum entre os isolados clínicos do gênero *Trichoderma*, apesar de causar doença, seja considerado uma fonte de drogas com potencial antifúngico contra *Candida* e *Aspergillus* spp.¹³⁷.

1.2.1. Taxonomia

O gênero *Trichoderma* foi introduzido à comunidade científica por Persoon em 1794¹³³. A classificação taxonômica deste fungo encontra-se descrita de seguida^{138,139,140}.

Reino: *Fungi*

Divisão: *Ascomycota*

Classe: *Sordariomycetes*

Ordem: *Hypocreales*

Família: *Hypocreaceae*

Gênero: *Trichoderma*

1.2.2. Características gerais de *Trichoderma* spp.

Trichoderma é um fungo filamentosso saprófita amplamente distribuído por todo o mundo, presente com maior frequência em solos de regiões de clima temperado e tropical, sendo caracterizado por um crescimento rápido, numerosos conídios com coloração verde brilhante e estruturas de conidiósporos repetidamente ramificadas¹⁴¹. Os principais habitats destes fungos são nomeadamente o solo e a madeira podre, podendo também ser encontrados em esclerócios¹²⁹. Apresentam a capacidade de colonizar grãos, raízes e folhas de plantas¹⁴².

Condições de crescimento de *Trichoderma* spp.

As condições ótimas de crescimento de *Trichoderma* são temperatura de 25°C, condições de humidade em torno de 70% e um pH entre 6,0 a 6,5. Quando cultivado em meio de cultura as condições ótimas de crescimento oscilam entre os 25-30°C, sendo que a temperaturas superiores a 35°C apenas algumas espécies conseguem crescer de forma normal¹⁴³.

Características morfológicas de *Trichoderma*

O crescimento em meio de cultura PDA, numa fase inicial, permite observar colónias com coloração branca. Quando ocorre o desenvolvimento dos conídios, ocorre uma alteração da cor, passando a observar-se manchas azul-esverdeadas ou verde-amareladas dispersas pelo meio de cultura. É também frequentemente observada a formação de anéis concêntricos durante o desenvolvimento dos conídios¹⁴⁴. Algumas espécies de *Trichoderma*, como *Trichoderma viride*, apresentam a particularidade de produzir um cheiro doce característico¹⁴⁵. Uma vez referidas as características macroscópicas, serão descritas de forma geral as características microscópicas. Deste modo, é descrito que as espécies de *Trichoderma* formam hifas separadas, hialinas e de paredes lisas¹⁴⁶.

Os conidiósporos são estruturas altamente ramificadas. As ramificações laterais produzidas a partir dos ramos principais, podem ser emparelhadas, constituindo uma estrutura piramidal^{147,148}.

As fiáides, também denominadas por células conidiogénicas, encontram-se principalmente ampliadas no meio em forma de frasco, podendo ter uma forma cilíndrica ou sub-globosa, sendo mantidas, de forma emparelhada ou separadas, em vértices divergentes no final dos conidiósporos¹⁴⁸.

Os conídios, compreendem estruturas unicelulares, podendo ser elipsoidais ou globosos. Apresentam uma tonalidade verde, podendo por vezes serem incolores, acinzentados ou acastanhados. A superfície destas estruturas é tipicamente lisa, no entanto, em algumas espécies de *Trichoderma* (*T. viride*) apresentam uma superfície áspera^{142,147}.

Os clamidiósporos, células vegetativas dilatadas com citoplasma condensado, desempenham um papel crucial na sobrevivência. São unicelulares, de consistência

globosa a sub-globosa, sendo formadas dentro ou nas pontas das hifas. Relativamente à sua tonalidade, podem ser incolores, amarelo pálido ou esverdeadas^{142,148}.

1.3. *Trichoderma* como agente de controlo biológico

Os fungos que pertencem ao género *Trichoderma* são os mais reconhecidos a nível mundial pelas propriedades antagonistas que possuem contra um grande número de fungos fitopatogénicos¹²⁶. Esta notável capacidade pode ocorrer de duas formas, a indireta e a direta. A primeira está relacionada com a competição por espaço e nutrientes com fungos fitopatogénicos, através da modificação das condições ambientais, produção de antibióticos e inativação de enzimas dos agentes patogénicos, necessárias no decorrer do processo de infeção. A forma direta está intimamente relacionada com o micoparasitismo¹⁴⁹, o qual envolve uma série de eventos sequenciais complexos, que incluem o reconhecimento, a penetração e a posterior morte do fungo patogénico. A produção de metabolitos secundários, voláteis ou não voláteis, por diversas espécies de *Trichoderma* tem sido descrita. Estes metabolitos apresentam um largo espectro de ação antimicrobiana¹⁵⁰, sendo descrito que fungos do género *Trichoderma* apresentam a particularidade de produzirem, vitaminas, auxinas e giberelinas responsáveis por estimular o crescimento de plantas¹⁵¹.

De todas as espécies do género *Trichoderma*, *Trichoderma harzianum* e *T. viride*, são as mais utilizadas a nível mundial, tendo sido utilizadas em 87 culturas diferentes e testadas contra 18 agentes patogénicos foliares diferentes¹⁵².

1.3.1. Metabolitos secundários produzidos por *Trichoderma* spp.

Dos principais metabolitos secundários produzidos por *Trichoderma* spp. é de salientar o ácido harziânico, bisorbicillinoídes, azafilonas, ácido heptelídico, alameticinas, antraquinonas, daucanas, harzialactonas, butenolides, tricholina, glisopreninas, gliovirina, pironas, tricotecenos, viridina, peptaiboles, isocianatos, trichosetina, entre outros¹³⁵. A produção e secreção destes metabolitos, que ocorre durante as fases de crescimento e respetiva esporulação, estão entre os produtos naturais mais importantes na inibição do crescimento de agentes patogénicos¹⁵³.

1.3.2. Compostos voláteis orgânicos (CVOs)

Os CVOs são produzidos por um grande número de microrganismos, correspondendo a produtos intermediários ou finais das vias metabólicas microbianas, pertencendo a uma grande diversidade de classes estruturais (cetonas, alcenos, ésteres, lactonas, álcoois, furanos e terpenos). A sua produção pode ser resultante do normal metabolismo dos microrganismos ou mediante determinadas respostas com o intuito de impor um efeito, como por exemplo a inibição do crescimento de um competidor e a promoção do crescimento do hospedeiro¹⁵⁴.

Em culturas de *Trichoderma* spp. foi identificado uma grande diversidade de CVOs, compostos que incluíam o 1-Octen-3-ol (octenol) e respetivos análogos, sendo que estes constituem os produtos finais do metabolismo dos ácidos gordos¹⁴⁰. Estes compostos encontram-se aumentados na presença da micotoxina produzida por *Fusarium moniliforme*. De facto, os CVOs podem ser estimulados pela presença exógena de outros metabolitos secundários^{154,155}.

Um outro composto produzido por fungos do género *Trichoderma* é o composto C8 (aldeído C-8), o qual é responsável por estimular a conidiação¹⁵⁶.

1.3.3. Produção de enzimas por *Trichoderma* spp.

Apesar de ser largamente descrito o papel antagônico que as espécies de *Trichoderma* desempenham contra fungos fitopatogênicos, no decorrer dos últimos anos, diversos investigadores têm procurado perceber melhor os processos de micoparasitismo de *Trichoderma* spp., utilizando como modelo a espécie *T. harzianum* ALL42, através da identificação de genes e proteínas (quitinases e glucanases) pela análise do transcriptoma e proteoma^{157,158}.

Quitinases

A quitina é um homopolímero de N-acetil-glicosamina com ligações β -1,4 intracadeia e ligações de hidrogênio intercadeia, que origina as microfibrilhas responsáveis pela integridade da parede celular de microrganismos¹⁵⁹. Não se encontra presente em plantas e vertebrados, sendo um elemento estrutural fulcral em fungos e insetos¹⁶⁰.

As quitinases são enzimas hidrolíticas, com tamanho variável que oscila entre os 20 e os 90kDa, que se encontram presentes em quase todos os organismos, desde humanos, a plantas, bactérias, fungos e outros. Estas enzimas são responsáveis pela degradação da parede celular de fungos¹⁶¹. Há medida que os oligómeros de quitina são libertados, resultantes da ação enzimática das quitinases, estes induzem uma rápida produção de mais quitinases, intensificando a ação destas. Durante esta etapa, a libertação de oligómeros induz a expressão de genes que codificam determinadas enzimas hidrolíticas, nomeadamente proteases, β -1,3-glucanases e β -1,6-glucanases^{162,163}.

Glucanases

A parede celular dos fungos é composta, para além de quitina, por outros polímeros lineares, tais como α -1,3-glucanos, β -1,3-glucanos, β -1,6-glucanos, entre outras proteínas¹⁶⁴.

Deste modo, o papel das α -1,3-glucanases, β -1,3-glucanases e β -1,6-glucanases, consiste em degradar os componentes anteriormente referidos, sendo elementos diretos na interação micoparasitária entre determinadas espécies de *Trichoderma* e os seus hospedeiros. A

título de exemplo, as β -1,3 e β -1,6-glucanases inibem a germinação de esporos e o crescimento celular de alguns fungos fitopatogénicos¹⁶³.

De uma forma geral, as enzimas anteriormente referidas, são responsáveis por destruir a integridade da parede celular de fungos fitopatogénicos, constituída maioritariamente por polissacarídeos, quitinas e β -glucanos, o que posteriormente facilita a penetração de *Trichoderma* no citoplasma do fungo alvo^{163,165}. As enzimas líticas produzidas por *Trichoderma*, apresentam uma grande diversidade, variando desde enzimas celulolíticas, proteolíticas, pectinolíticas e quitinolíticas¹⁶⁶. Todos os mecanismos antagónicos anteriormente referidos, podem ter um efeito sinérgico que potencia a inibição contra microrganismos invasores¹³³.

1.3.4. *Trichoderma harzianum*

Trichoderma harzianum é uma das espécies mais utilizada e estudada a nível de controlo biológico. A sua interação com fungos fitopatogénicos caracteriza-se pelo crescimento micoparasitário ao longo das hifas hospedeiras, pela produção de estruturas morfológicas semelhantes à apressoria, enrolamento e pela produção CWDEs¹⁶⁷.

Um estudo efetuado, com o intuito de avaliar o efeito antagonista de *T. harzianum* T39 sobre *Botrytis cinerea*, demonstrou que as enzimas produzidas por *B. cinerea* (endo-poligalacturonases e exo-poligalacturonases) encontravam-se desativadas por proteases, mais precisamente a protease NCIM11185, produzidas pelo isolado de *T. harzianum*. Em culturas líquidas, contendo *T. harzianum* T39, as proteases produzidas por este foram responsáveis por uma diminuição de 80% no comprimento do tubo germinativo e por uma redução de 55% na germinação de *B. cinerea*. Este estudo comprovou de igual modo que *T. harzianum* reduz substancialmente a severidade da doença em folhas de feijão, causada por *B. cinerea*¹⁶⁸.

Um outro estudo, foi realizado para verificar o efeito de *T. harzianum* como agente de controlo biológico contra *Fusarium graminearum*, responsável pela podridão do caule em culturas de milho, permitiu constatar que a estirpe *T. harzianum* CCTCC-RW0024 apresentou uma atividade antagonista de 96,30%, uma redução de 86,66% na doença e uma elevada expressão de genes e enzimas relacionadas com biocontrolo. O mesmo estudo

revelou, através da pirosequenciação, que a inoculação exógena desta estirpe na rizosfera do milho promoveu o crescimento da planta e a diminuição da prevalência de *F. graminearum*¹⁶⁹. A função antagonica de *T. harzianum* na interação com *Fusarium oxysporum* foi alvo de um estudo recente, o qual demonstrou que a produção de compostos voláteis e não voláteis por *T. harzianum* desempenham um papel crucial contra a doença causada por *F. oxysporum*, embora a sua eficácia esteja dependente da fase em que se encontra a respetiva doença¹⁷⁰.

Recentemente, num estudo levado a cabo, identificou e caracterizou-se um novo metabolito com propriedades benéficas contra fungos fitopatogénicos, produzido por *T. harzianum*, denominado de ácido isoharzianico, um estereoisómero do ácido harzianico, através da utilização de métodos espectroscópicos. Este novo composto, quando aplicado *in vitro*, inibiu o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*¹⁷¹.

1.3.5. *Trichoderma atroviride*

Trichoderma atroviride é um fungo filamentoso do solo, conhecido pela sua função de agente de controlo biológico contra agentes patogénicos aéreos e transmitidos pelo solo, os quais se revestem de grande importância económica¹⁷².

As suas propriedades antagonistas estão relacionadas com os mecanismos de micoparasitismo, competição por nutrientes, antibioses e produção de enzimas que degradam a parede celular^{173,174}. De acordo com o descrito na literatura, a principal forma de *T. atroviride* controlar *S. sclerotiorum* é através do micoparasitismo de hifas e esclerócios¹⁷⁴.

Um estudo realizado demonstrou que a estirpe *T. atroviride* P1 (ATCC 74058) secreta proteínas reguladoras mediante a presença da parede celular de *R. solani*, tais como, N-acetil-a-D-glucosaminidase, uma superóxido dismutase, 1,3-β-glucosidase, o fator eucariótico de iniciação 4-alfa, 42-kDa endoquitinase e proteases do tipo tripsina PRA1. O mesmo estudo permitiu aferir que a maior parte das proteínas diferenciais no proteoma de *T. atroviride* P1, durante a interação com raízes de feijão e *R. solani*, são nomeadamente a HEX1, HSP70, hidrofobina e diferentes membros da família transportadora ABC¹⁷⁵. É

também descrito na literatura que *T. atroviride*, tal como *T. harzianum*, apresenta a capacidade de produzir lacases¹⁷⁶.

Relativamente aos CVOs produzidos por *T. atroviride*, um estudo levado a cabo com intuito de averiguar os efeitos destes compostos sobre o ácido fusárico (FA), produzido por um grande numero de espécies de *Fusarium*, revelou resultados muito interessantes. Utilizando a estirpe *T. atroviride* P1, demonstrou-se que alguns CVOs produzidos por esta estirpe eram inibidos pelo FA, enquanto que outros CVOs como o 1-octen-3-ol, 3-octanol e 3-octanona, encontravam-se aumentados, possivelmente como resposta antagónica face ao FA¹⁷⁷.

1.4. Controlo biológico de *Macrophomina phaseolina*

A estratégia de controlo mais eficaz contra *M. phaseolina* envolve a fumigação do solo com brometo de metilo. No entanto, perante os efeitos nefastos causados no ambiente, a sua utilização é proibida¹⁷⁸.

Deste modo, a descoberta de novos microrganismos com propriedades antagonistas, passíveis de serem utilizados no controlo biológico de *M. phaseolina*, reveste-se de maior importância, sendo uma opção promissora em termos eco-ambientais através da substituição do tradicional uso de pesticidas¹⁷⁹.

Os principais microrganismos descritos na literatura que apresentam propriedades antagonistas contra *M. phaseolina* são nomeadamente bactérias (*Bacillus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces*) e fungos dos géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Gliocladium* e *Aspergillus*^{180,181}.

2. Objetivos

Tendo em consideração a necessidade crescente de um controlo ecosustentável de fungos fitopatogénicos, nomeadamente de *M. phaseolina*, o principal objetivo deste trabalho consistiu em:

- ✓ Avaliar o potencial antagónico de duas espécies de *Trichoderma* (*T. harzianum* T1A e *T. atroviride* T17) contra *M. phaseolina*.

3. Metodologia

3.1. Isolados

Para a realização deste trabalho foi testada uma estirpe de *M. phaseolina* PE35 (isolada de *E. globulus* em Portugal), e duas estirpes de *Trichoderma*, nomeadamente *T. harzianum* T1A e *T. atroviride* T17.

Macrophomina phaseolina PE35 pertence à coleção do Prof. Dr. Artur Alves (Universidade de Aveiro). As estirpes de *Trichoderma* foram gentilmente cedidas pelo Departamento de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

3.1.1. Condições de crescimento

As estirpes anteriormente referidas foram crescidas em meio de cultura PDA, a uma temperatura constante de 25°C, durante um período de 5 dias. O protocolo encontra-se descrito no ponto 7.1. na secção dos anexos.

3.2. Método de oposição direta

Para avaliar a capacidade antagonista dos isolados de *Trichoderma* contra *M. phaseolina*, realizou-se o método de oposição direta (MOD) descrito por Dennis e Webster (1971)¹⁸². Deste modo, numa placa de Petri (90mm) contendo PDA, inoculou-se um *plug* de cerca de 5mm de micélio de *M. phaseolina* em crescimento ativo, a cerca de 2,5cm da parede da placa e no lado oposto inoculou-se um *plug* de tamanho idêntico dos isolados de *Trichoderma*. Como controlo, *M. phaseolina* foi cultivado em PDA. As placas foram

incubadas a uma temperatura constante de 25°C durante 15 dias. O ensaio foi realizado em triplicado.

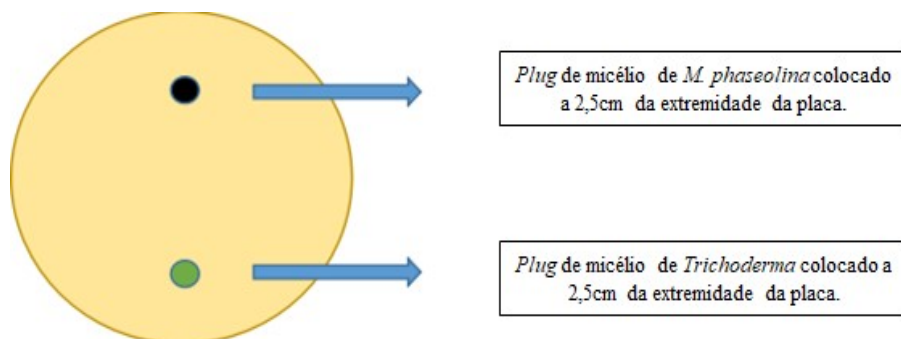


Figura 1: Desenho esquemático do MOD.

A medição, com auxílio de uma régua, é efetuada desde o ponto onde se colocou o *plug* de micélio até à extremidade do crescimento da cultura. Efetuou-se um registo fotográfico sempre que se procedeu às respetivas medições. Estas foram realizadas de forma consecutiva nos primeiros 7 dias, sendo que as restantes foram realizadas no 10^o e 15^o dia. O protocolo encontra-se descrito no ponto 7.2. na secção dos anexos.

3.3. Teste de inibição por compostos orgânicos voláteis

Este ensaio, descrito por Bharat et al. (1980)¹⁸³, tem como principal objetivo avaliar o efeito da produção de compostos voláteis orgânicos (CVOs), por parte das estirpes de *Trichoderma* testadas, na inibição de *M. phaseolina*.

Uma vez ocorrido o crescimento consoante as condições referidas no ponto 3.1.1., procedeu-se a um novo isolamento em PDA, mas com um período de incubação de um dia, a uma temperatura de incubação constante de 25°C. Depois de um dia de crescimento, as placas contendo *M. phaseolina* foram colocadas, invertidas, no topo de cada uma das placas contendo cada um dos isolados de *Trichoderma*. Para o controlo, utilizou-se o mesmo princípio, mas com a placa contendo *M. phaseolina* a servir de base para uma placa contendo apenas PDA. Os ensaios foram realizados em triplicado. Para determinar a

inibição de *M. phaseolina* foram realizadas medições diárias, com auxílio de uma régua, ao diâmetro do micélio, durante sete dias. As medições começaram no dia zero, antes de se inverter as placas. O protocolo encontra-se descrito no ponto 7.3 na secção dos anexos.

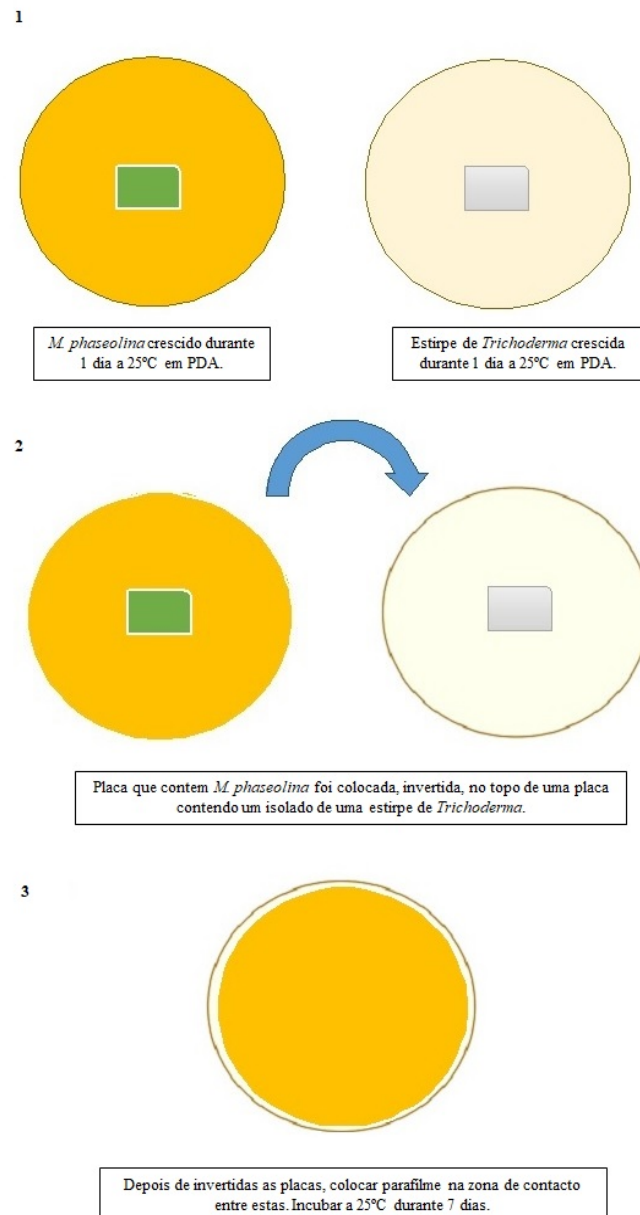


Figura 2: Desenho esquemático do teste de inibição dos CVOs.

3.4. Inibição do crescimento de *M. phaseolina* pelo secretoma de estirpes de *Trichoderma*, em meio mínimo sólido

Através da separação do micélio de *T. atroviride* T17 e *T. harzianum* T1A do respetivo meio mínimo (MM), utilizando papel de filtro Whatman n.º.1, obteve-se o filtrado, o qual foi dividido posteriormente em duas frações:

1º Fração - Adição de Agar (15%).

2º Fração - Adição de Agar (15%) e glicose (20%), ou seja, MM com secretoma com glicose.

O controlo não continha qualquer secretoma proveniente do crescimento dos isolados de *Trichoderma*, contendo apenas PDA. Os meios depois de autoclavados, foram utilizados para o crescimento de *M. phaseolina* por um período de tempo de 7 dias, a uma temperatura constante de 25°C.

Durante este período foram realizadas medições diárias ao diâmetro do micélio de *M. phaseolina*, assim como, registo fotográfico para avaliar possíveis alterações morfológicas. O ensaio foi realizado em triplicado, segundo o descrito por Lima (2016)¹⁸⁴. O protocolo encontra-se no ponto 7.4. na secção dos anexos.

3.5. Inibição do crescimento de *M. phaseolina* pelo secretoma de estirpes de *Trichoderma*, em meio mínimo líquido

Através da separação do micélio de *T. atroviride* T17 e *T. harzianum* T1A do respetivo MM, recorrendo a duas filtrações, a primeira com papel de Whatman n.º.1, e a segunda com um filtro com poro de 0,2µm acoplado a uma seringa de 5mL, obteve-se o filtrado, o qual foi dividido posteriormente em duas frações:

1º Fração - MM com secretoma;

2º Fração - MM com secretoma e adição de 20% de glicose.

O controlo não continha qualquer secretoma proveniente do crescimento dos isolados de *Trichoderma*, contendo apenas PDB. Os meios, não autoclavados, foram utilizados para o crescimento de *M. phaseolina* por um período de tempo de 7 dias, a uma temperatura constante de 25°C. Finalizado este período, procedeu-se à determinação da biomassa do micélio (g), por secagem deste a 50°C (durante 3 dias), de forma a obter o valor do seu peso seco. O ensaio foi realizado em triplicado, segundo o descrito por Lima (2016)¹⁸⁴. O protocolo encontra-se no ponto 7.5. na secção dos anexos.

4. Resultados e discussão

Para a realização deste estudo foram selecionadas duas estirpes de *Trichoderma*, nomeadamente o *T. harzianum* T1A e o *T. atroviride* T17, com o intuito de avaliar a sua capacidade enquanto agentes de controlo biológico contra *M. phaseolina*.

A escolha destas estirpes baseou-se nos resultados obtidos por Lima (2016)¹⁸⁴, os quais permitiram constatar o potencial antagonista destas estirpes contra *Guignardia citricarpa*. Para tal, foram realizados diversos ensaios que permitem avaliar diferentes parâmetros fisiológicos das estirpes de *Trichoderma* testadas.

4.1. Método de oposição direta (MOD)

Os resultados obtidos através do MOD, que permitem avaliar o potencial antagonista do fungo *T. harzianum* T1A contra *M. phaseolina*, encontram-se descritos na figura 3.

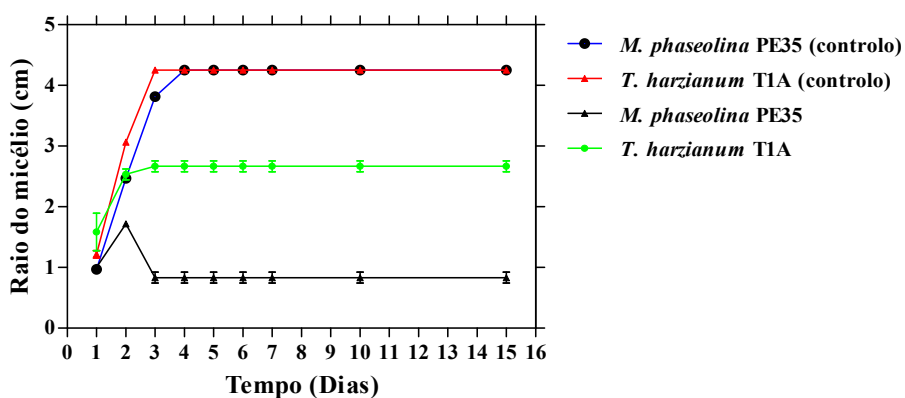


Figura 3: Inibição do crescimento micelial (cm) de *M. phaseolina* por *T. harzianum* T1A, segundo o MOD. A inibição micelial foi determinada por co-cultura a 25°C durante um período de 15 dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão.

Foi efetuado um registo fotográfico diário com o intuito de complementar a informação fornecida pela componente estatística. O registo fotográfico dos diferentes dias encontra-se no ponto 7.6. na secção dos anexos.

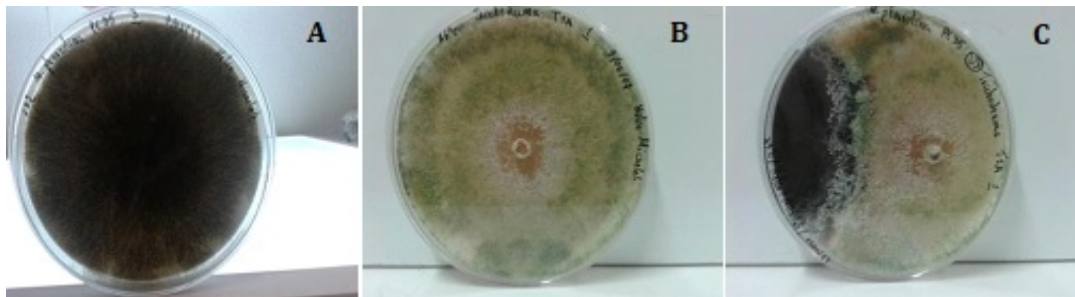


Figura 4: Registo fotográfico do sétimo dia da inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina* por *T. harzianum* T1A, segundo o MOD. Crescimento de *M. phaseolina* em PDA, controlo (A). Crescimento de *T. harzianum* T1A em PDA, controlo (B). Crescimento de *M. phaseolina* em contacto direto com *T. harzianum* T1A, em PDA (C). Registo fotográfico do sétimo dia de crescimento a 25°C.

De acordo com a mesma metodologia (MOD), os resultados obtidos que permitem avaliar o potencial antagonista de *T. atroviride* T17, encontram-se descritos na figura 5.

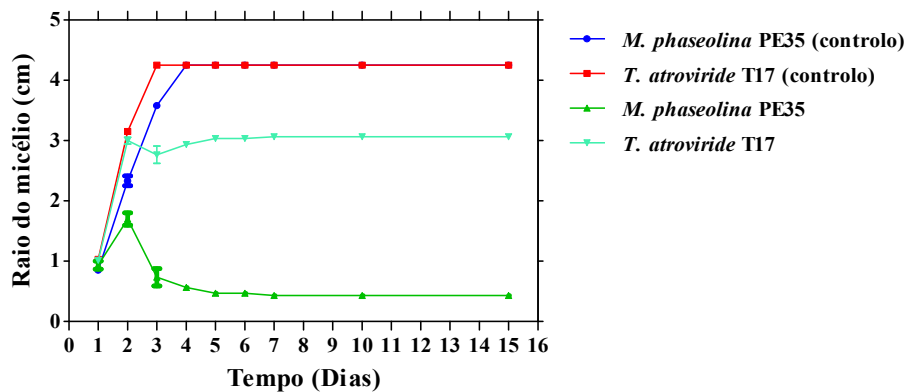


Figura 5: Inibição do crescimento micelial (cm) de *M. phaseolina* por *T. atroviride* T17, segundo o MOD. A inibição micelial foi determinada por co-cultura a 25°C durante um período de 15 dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão.

De igual modo, realizou-se um registo fotográfico diário com o intuito de complementar a informação fornecida pela componente estatística. O registo fotográfico diário encontra-se no ponto 8.7. na secção dos anexos.

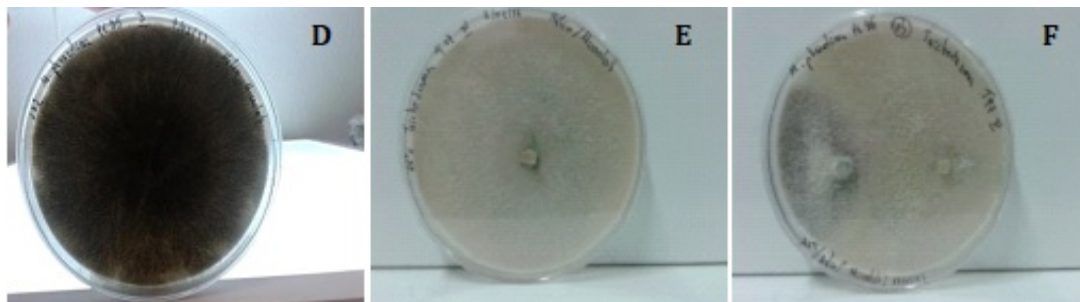


Figura 6: Registo fotográfico do sétimo dia da inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina* por *T. atroviride* T17, segundo o MOD. Crescimento de *M. phaseolina* em PDA, controlo (D). Crescimento de *T. atroviride* T17 em PDA, controlo (E). Crescimento de *M. phaseolina* em contacto direto com *T. atroviride* T17, em PDA (F). Registo fotográfico do sétimo dia de crescimento a 25°C.

Os resultados obtidos no MOD permitem constatar que ambas as estirpes inibem o crescimento micelial de *M. phaseolina* quando colocados em contacto direto com este. Apesar de ambas serem responsáveis por uma inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina*, a que apresentou uma maior inibição no crescimento foi a estirpe *T. atroviride* T17, embora a diferença seja apenas ligeiramente superior. Ao realizar uma comparação entre os dias de crescimento, durante os quais houve um contacto direto entre as estirpes de *Trichoderma* e *M. phaseolina*, podemos aferir que em ambos os casos, o segundo dia foi o que registou um decréscimo significativo no crescimento micelial de *M. phaseolina*.

Um dado muito importante a ter em consideração está relacionado com a linearidade visualizada no crescimento de *M. phaseolina*, cuja interpretação permite constatar que, a linha que representa o crescimento deste fungo, em contacto com *T. harzianum* T1A permanece praticamente constante desde o dia 3 (figura 3). No entanto, quando *M. phaseolina* se encontra em contacto direto com *T. atroviride* T17, a linha que corresponde ao crescimento de *M. phaseolina* apresenta desde o segundo ao décimo dia um decréscimo constante (figura 5), embora que ligeiro.

O registo fotográfico levado a cabo foi muito importante para colmatar a informação fornecida pela componente estatística, uma vez que a figura 6 permite constatar que *T. atroviride* T17 praticamente cobriu a área de crescimento de *M. phaseolina* com esporos. No entanto, como a medição do crescimento micelial de ambos os fungos foi realizada na

parte posterior da placa, a inibição de *M. phaseolina* não foi completa como aparenta na figura 6, uma vez que durante a realização das medições visualizou-se o micélio de *M. phaseolina* com a tonalidade que lhe é característica. Relativamente à estirpe *T. harzianum* T1A testada, não se verificou a mesma intensidade de sobreposição de esporos, comparativamente com *T. atroviride* T17, embora também tenha ocorrido, como comprova a figura quatro. Em ambos os casos a produção de esporos aumentou substancialmente até ao décimo quinto dia, como podemos constatar ao observar a figura 17 e 18.

Através da realização do MOD, podemos afirmar que a estirpe *T. atroviride* T17 manifestou uma maior capacidade antagonista contra *M. phaseolina*, comparativamente com *T. harzianum* T1A, embora, segundo os resultados obtidos nesta metodologia, ambos podem ser considerados fungos com propriedades antagonistas excelentes quando colocados em contacto direto com *M. phaseolina in vitro*.

Um estudo realizado por Ramezani (2008)¹⁸⁵, demonstrou que *Trichoderma polysporum*, quando colocado em contacto direto com *M. phaseolina* reduz consideravelmente o seu crescimento micelial. A sobreposição de esporos sobre o micélio de *M. phaseolina* também foi bastante evidente, revelando ser um fungo com potencial antagonista contra este. É importante salientar que a distância de ambos os fungos, quando cultivados, à parede da placa foi de 2,5cm e não de 1cm, o mais comum em ensaios de MOD. A decisão de utilizar esta distância prende-se com o facto de ambos os fungos crescerem relativamente bem em meio PDA. O principal objetivo foi provocar um contacto direto entre ambos mais rápido do que aconteceria se cultivados a 1cm da parede da placa, simulando de certa forma o que acontece *in vivo*.

4.2. Testes de inibição por compostos voláteis orgânicos (CVOs)

Para avaliar o efeito dos CVOs produzidos pelas estirpes de *Trichoderma* testadas, no crescimento micelial de *M. phaseolina*, realizou-se o método de inibição por CVOs. Os resultados que permitem avaliar o potencial antagonista dos CVOs produzidos por *T. harzianum* T1A no crescimento de *M. phaseolina*, encontram-se descritos na figura 7.

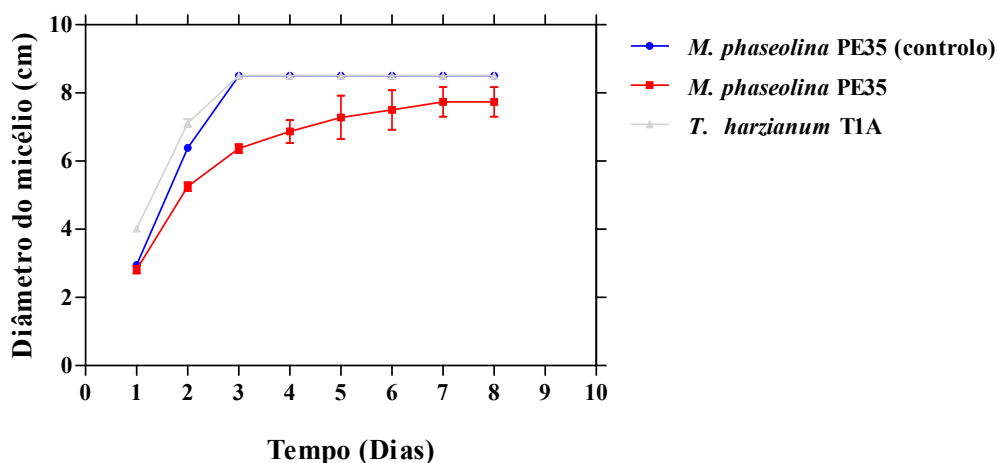


Figura 7: Inibição do crescimento micelial (cm) de *M. phaseolina* induzido pela produção de CVOs de *T. harzianum* T1A. A inibição micelial foi determinada por co-cultura sobreposta a 25°C durante um período de 7 dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão.

Foi efetuado um registo fotográfico (figura 8) ao sétimo dia com o intuito de complementar a informação fornecida pela componente estatística.

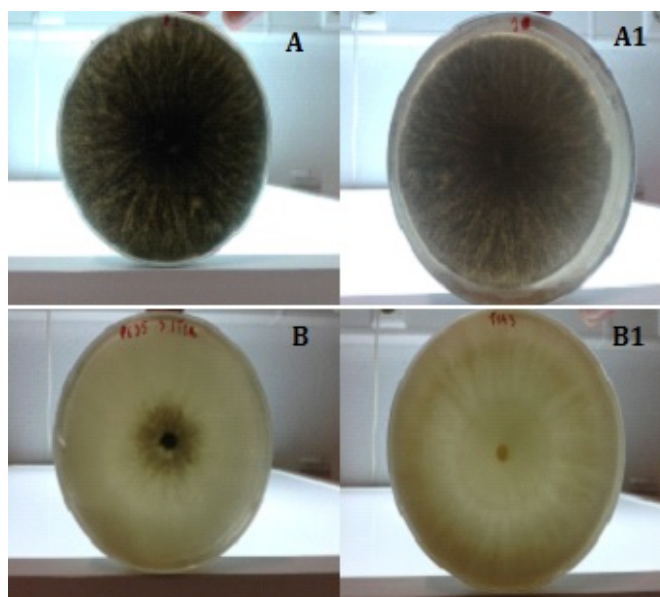


Figura 8: Registo fotográfico da inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina* induzida pela produção de CVOs de *T. harzianum* T1A. Crescimento de *M. phaseolina* em PDA (A), e respetiva placa sobreposta contendo apenas PDA (A1). Crescimento de *M. phaseolina* em PDA (B), em contacto com CVOs produzidos por *T. harzianum* T1A crescido em PDA (B1). Crescimento a 25°C durante 7 dias.

De acordo com a mesma metodologia, os resultados obtidos que permitem avaliar o potencial antagonista dos CVOs produzidos por *T. atroviride* T17 no crescimento de *M. phaseolina*, encontram-se descritos na figura 9.

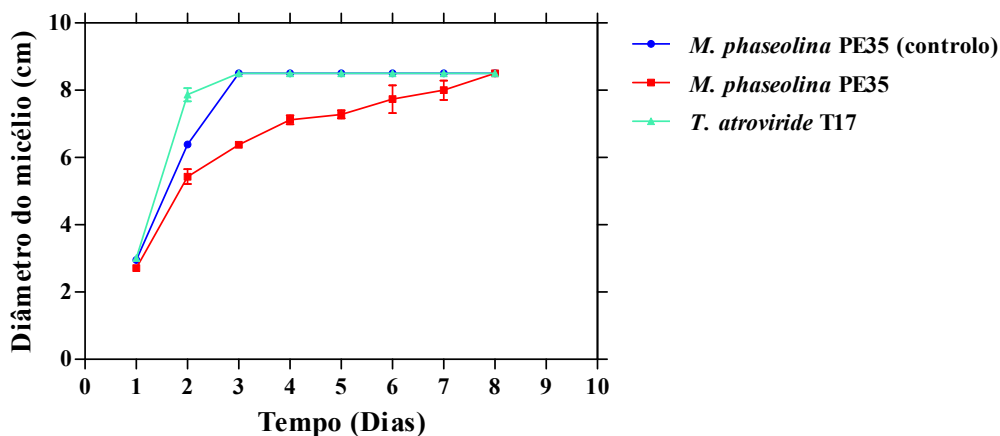


Figura 9: Inibição do crescimento micelial (cm) de *M. phaseolina* induzido pela produção de CVOs de *T. atroviride* T17. A inibição micelial foi determinada por co-cultura sobreposta a 25°C durante um período de 7 dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão.

De igual modo, realizou-se um registo fotográfico (figura 10) ao sétimo dia com o intuito de complementar a informação fornecida pela componente estatística.

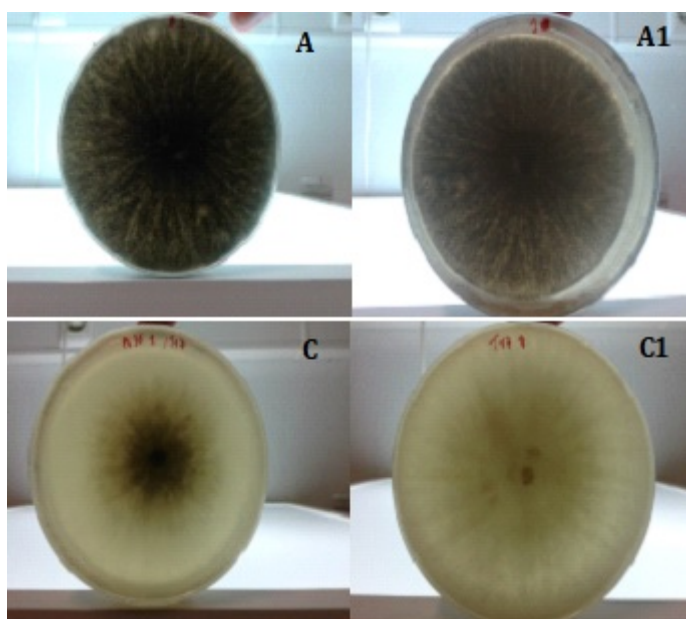


Figura 10: Registo fotográfico da inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina* induzida pela produção de CVOs de *T. atroviride* T17. Crescimento de *M. phaseolina* em PDA (A), e respetiva placa sobreposta contendo apenas PDA (A1). Crescimento de *M. phaseolina* em PDA (C), em contacto com CVOs produzidos por *T. atroviride* T17 crescido em PDA (C1). Crescimento a 25°C durante 7 dias.

Os resultados obtidos permitiram aferir que os CVOs produzidos por *T. harzianum* T1A (figura 7) foram responsáveis por uma maior diminuição do crescimento micelial de *M. phaseolina* comparativamente com *T. atroviride* T17. De acordo com estes resultados, a produção de CVOs por parte de *T. atroviride* T17 (figura 9), não foi suficiente para impedir que o crescimento do micélio atinge-se a mesma dimensão verificada no controlo, ao fim de sete dias. O registo fotográfico (figura 8) realizado ao sétimo dia, comprova a componente gráfica ao visualizarmos um micélio menos mielinizado, apenas visível em redor do *plug*, comparativamente com o micélio na figura 10, o qual se encontra mais desenvolvido, e mais mielinizado. Deste modo podemos concluir que *T. harzianum* T1A produz CVOs com propriedades antagonistas mais eficazes, comparativamente com os CVOs produzidos por *T. atroviride* T17 contra *M. phaseolina*.

Um estudo realizado por Aarti e Meenu (2015)¹⁸⁶, demonstrou que os CVOs produzidos por *T. citrinoviride*, reduzem consideravelmente o crescimento micelial de *M. phaseolina*, sendo, portanto, considerado um fungo com propriedades antagonistas contra este.

4.3. Inibição do crescimento de *M. phaseolina* em MM sólido

Os resultados que permitem avaliar o potencial antagonista dos compostos secretados por *T. harzianum* T1A em MM sólido, com capacidade de inibir o crescimento de *M. phaseolina*, encontram-se descritos na figura 11.

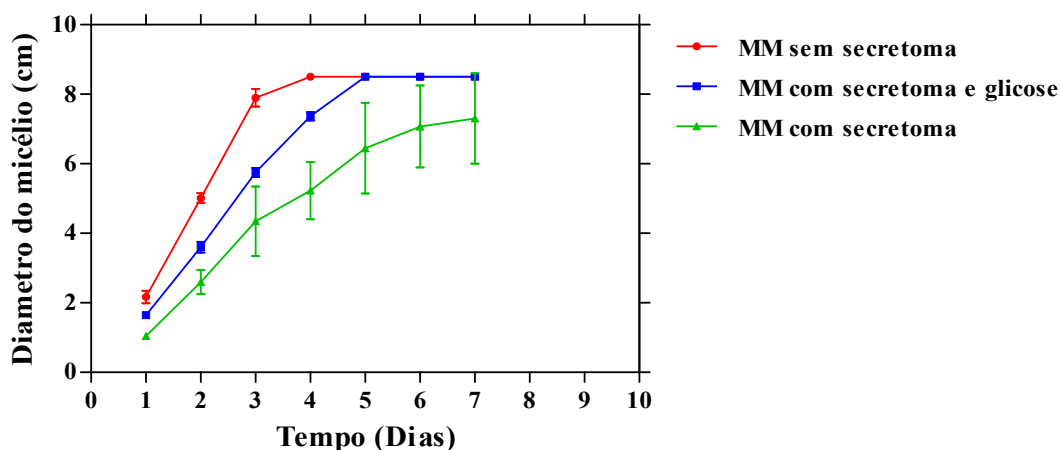


Figura 11: Análise do crescimento micelial (cm) de *M. phaseolina* na presença de secretoma de *T. harzianum* T1A. Diâmetro micelial (cm) de *M. phaseolina* crescido em MM sem secretoma, MM com secretoma e glicose e em MM sem glicose. Crescimento ocorreu em meio sólido, a 25°C durante sete dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão.

Foi efetuado um registo fotográfico diário com o intuito de complementar a informação fornecida pela componente estatística. O registo fotográfico diário encontra-se no ponto 7.8. na secção dos anexos.

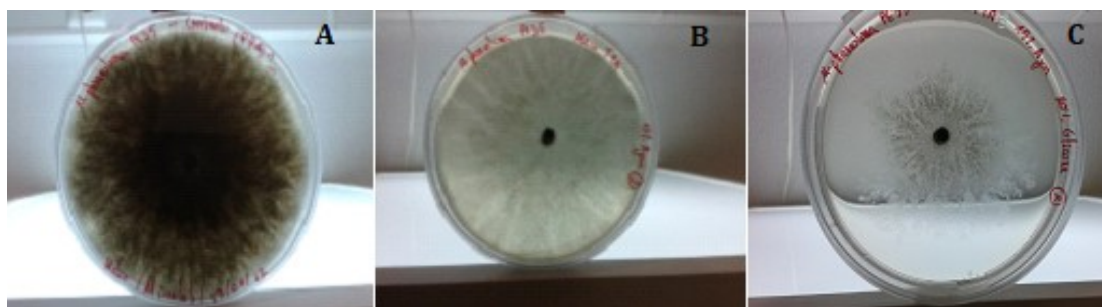


Figura 12: Registo fotográfico da inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina* induzido na presença de secretoma de *T. harzianum* T1A. Crescimento de *M. phaseolina* em MM sem secretoma (A). Crescimento de *M. phaseolina* em MM com secretoma e adição de 20% de glicose (B). Crescimento de *M. phaseolina* em MM com secretoma (C). Registo fotográfico do sétimo dia de crescimento.

Relativamente aos resultados que permitem analisar o potencial antagonista dos compostos secretados por *T. atroviride* T17 em MM sólido, com capacidade de inibir o crescimento de *M. phaseolina*, encontram-se descritos na figura 13.

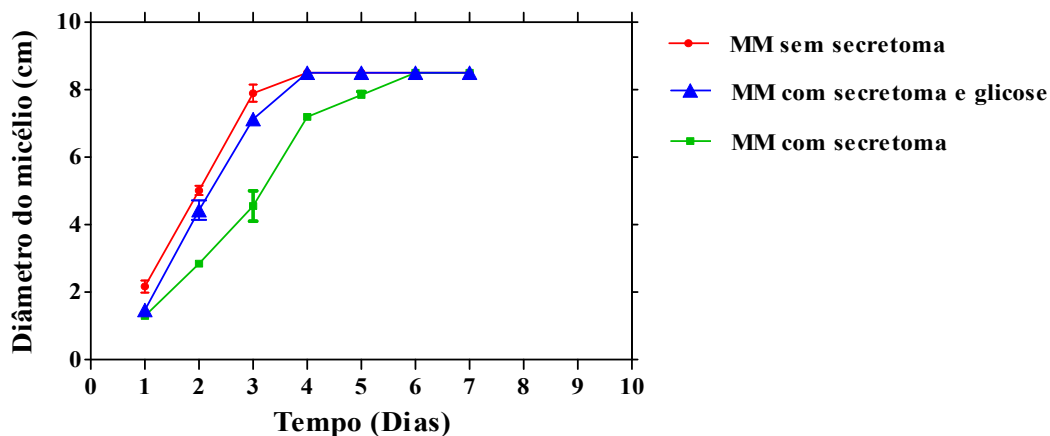


Figura 13: Análise do crescimento micelial (cm) de *M. phaseolina* na presença de secretoma de *T. atroviride* T17. Diâmetro micelial (cm) de *M. phaseolina* crescido em MM sem secretoma, MM com secretoma e glicose e em MM sem glicose. Crescimento ocorreu em meio sólido, a 25°C durante sete dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão.

Foi efetuado um registo fotográfico diário com o intuito de complementar a informação fornecida pela componente estatística. O registo fotográfico diário encontra-se no ponto 7.9. na secção dos anexos.

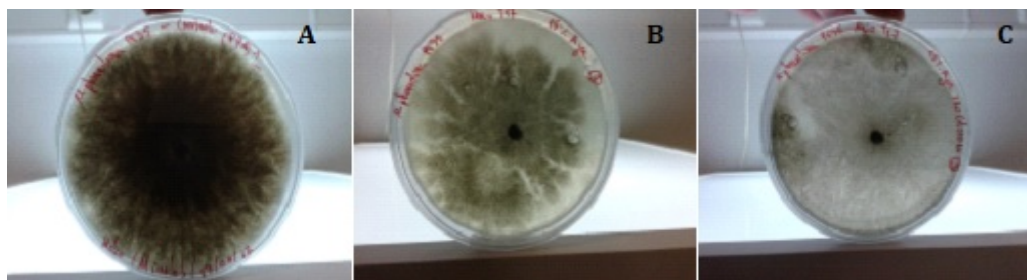


Figura 14: Registo fotográfico da inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina* induzido na presença de secretoma de *T. atroviride* T17. Crescimento de *M. phaseolina* em MM sem secretoma (A). Crescimento de *M. phaseolina* em MM com secretoma e adição de 20% de glicose (B). Crescimento de *M. phaseolina* em MM com secretoma (C). Registo fotográfico do sétimo dia de crescimento.

Os resultados obtidos, quando *M. phaseolina* cresceu em MM sólido, permitem constatar que o secretoma de *T. harzianum* T1A induziu uma maior inibição no crescimento de *M. phaseolina* (figura 11), quando comparado com o secretoma de *T. atroviride* T17 (figura 13). No entanto, quando é adicionada glicose ao secretoma, a inibição do crescimento é menor em ambos os casos (figura 11 e 13). Este último resultado era esperado uma vez que a glicose possivelmente serve como fonte de nutriente para *M. phaseolina*.

Se analisarmos com atenção a figura 12, verificamos que *M. phaseolina* não cresce do mesmo modo comparativamente com o controlo. Neste caso, o crescimento do micélio de *M. phaseolina*, ao fim de sete dias, ocorre em toda a placa mesmo quando crescido em MM com secretoma mais glicose. No entanto, o desenvolvimento do fungo é alterado, apresentando uma mielinização anormal e um micélio fraco. O mesmo acontece quando *M. phaseolina* cresce em MM com secretoma sem qualquer adição de glicose. A inibição do crescimento do micélio é maior, não chegando a ocupar a placa na sua totalidade. A mielinização é praticamente inexistente.

Quando o meio mínimo utilizado inclui o secretoma de *T. atroviride* T17, o registo fotográfico é de igual modo imprescindível para uma análise mais completa e detalhada. A figura 14 permite aferir que, quando *M. phaseolina* cresce em MM com secretoma mais adição de glicose, o crescimento do micélio ocorre em toda a placa com uma mielinização considerável. Quando o crescimento ocorre em MM com secretoma, mas sem adição de glicose, o micélio cresce em toda a placa, mas com uma mielinização mais fraca.

Deste modo, podemos concluir que o MM contendo secretoma de *T. harzianum* T1A, apresentou melhores resultados na inibição de *M. phaseolina*, comparativamente com *T. atroviride* T17. No entanto, é importante salientar que o MM com secretoma, com adição ou não adição de glicose, foram autoclavados. Situação que pode explicar o porquê de haver uma discrepância nos resultados obtidos com *T. atroviride* T17, equacionando-se que os compostos contidos no secretoma deste, sejam mais sensíveis a temperaturas elevadas, do que os compostos produzidos por *T. harzianum* T1A.

De forma a contrariar esta situação procedeu-se ao mesmo ensaio, mas desta vez utilizou-se MM líquido.

4.4. Inibição do crescimento de *M. phaseolina* em MM líquido

Os resultados que permitem avaliar o potencial antagonista dos compostos secretados por *T. harzianum* T1A e *T. atroviride* T17 em MM líquido, com capacidade de inibir o crescimento de *M. phaseolina*, encontram-se descritos na figura 15 e 16.

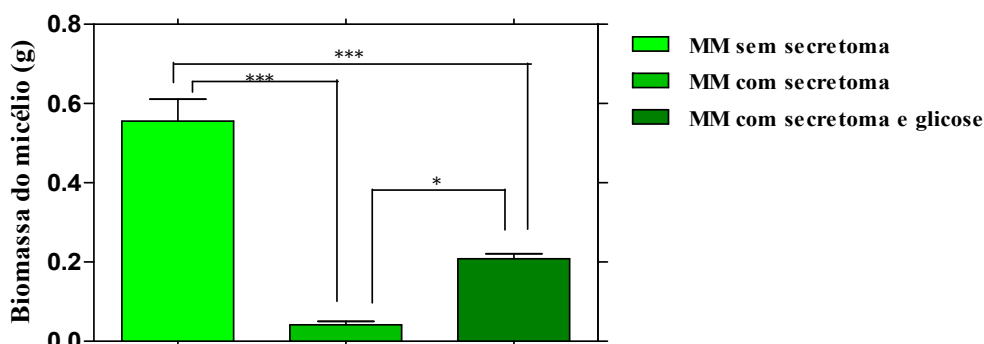


Figura 15: Análise da biomassa micelial (g) de *M. phaseolina* na presença de secretoma de *T. harzianum* T1A. Biomassa micelial (g) de *M. phaseolina* crescido em MM sem secretoma, MM com secretoma e glicose e em MM sem glicose. Crescimento ocorreu em meio líquido, a 25°C durante sete dias. One way ANOVA, seguida de um teste de comparações múltiplas de Turkey, foram usadas para determinar a significância estatística da biomassa de *M. phaseolina* na presença de secretoma de *T. harzianum* T1A (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

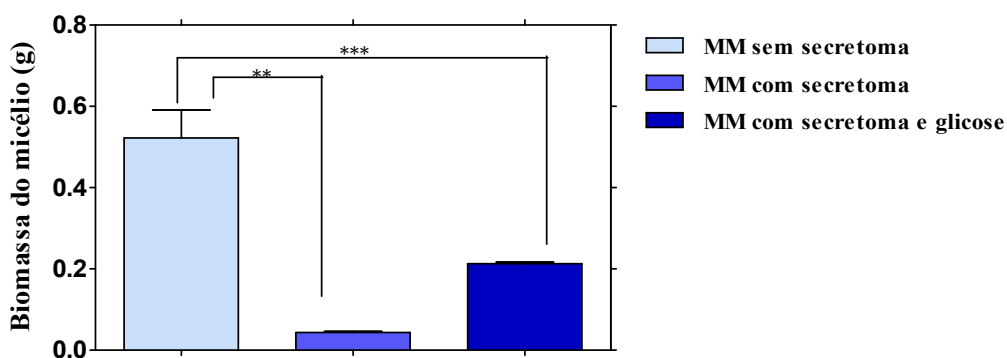


Figura 16: Análise da biomassa micelial (g) de *M. phaseolina* na presença de secretoma de *T. atroviride* T17. Biomassa micelial (g) de *M. phaseolina* crescido em MM sem secretoma, MM com secretoma e glicose e em MM sem glicose. Crescimento ocorreu em meio líquido, a 25°C durante sete dias. One way ANOVA, seguida de um teste de comparações múltiplas de Turkey, foram usadas para determinar a significância estatística da biomassa de *M. phaseolina* na presença de secretoma de *T. atroviride* T17 (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Os resultados obtidos foram avaliados pela comparação do peso seco da biomassa (g) do micélio de *M. phaseolina*. Quando utilizado o MM de *T. harzianum* T1A verifica-se a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes MM testados. Relativamente ao MM contendo secretoma de *T. harzianum* T1A, ocorreu uma diminuição significativa no crescimento da biomassa de *M. phaseolina* em relação ao meio de controlo (MM sem secretoma) (Figura 15). É de salientar que o crescimento de *M. phaseolina* em MM com secretoma e glicose apresentou um crescimento inferior comparativamente com o controlo, sendo estatisticamente significativo. Existe de igual modo uma diferença significativa no crescimento de *M. phaseolina* em MM com secretoma, quando comparado com o crescimento em MM com secretoma e glicose, sendo a inibição maior no primeiro. Os resultados obtidos indicam que o MM contendo secretoma de *T. harzianum* T1A, possui compostos capazes de inibir o crescimento de *M. phaseolina*.

Quando utilizado o MM de *T. atroviride* T17 verificou-se também a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes MM testados. No que diz respeito ao MM com secretoma de *T. atroviride* T17, ocorreu uma diminuição significativa no crescimento micelial em relação ao meio de controlo (MM sem secretoma) (Figura 16). De igual modo, é importante salientar que o crescimento de *M. phaseolina* em MM com secretoma e glicose foi inferior comparativamente com o controlo, sendo estatisticamente significativo. Não se verificou uma diferença significativa ($p > 0,05$) no crescimento de *M. phaseolina* em MM com secretoma, quando comparado com o crescimento deste em MM com secretoma e glicose. Os resultados obtidos indicam que o MM contendo secretoma de *T. atroviride* T17, possui compostos capazes de inibir o crescimento de *M. phaseolina*.

Num estudo realizado por Lima (2016)¹⁸⁴, o filtrado do cultivo de *T. harzianum* T1A e *T. atroviride* T17 foi utilizado para avaliar o efeito do secretoma na inibição do crescimento de *G. citricarpa*. Este estudo não só demonstrou que estas duas estirpes de *Trichoderma* apresentam potencial antagonista, mas também que o seu secretoma reduziu consideravelmente o crescimento/desenvolvimento micelial de *G. citricarpa*.

Para finalizar, todos os ensaios realizados demonstraram, mediante a análise de diferentes parâmetros fisiológicos, que tanto *T. harzianum* T1A como *T. atroviride* T17, têm as características necessárias para serem considerados potenciais agentes de controlo biológico contra *M. phaseolina*.

É importante referir que *T. atroviride* T17 apresentou uma melhor inibição no crescimento do micélio de *M. phaseolina* no MOD, no entanto, nos outros testes realizados, *T. harzianum* T1A apresentou uma melhor inibição do crescimento do micélio de *M. phaseolina*. Num ponto de vista pessoal, é possível que *T. atroviride* T17 provoque uma inibição mais acentuada no crescimento de *M. phaseolina* devido a um efeito sinérgico dos seus constituintes. Por outro lado, *T. harzianum* apresenta melhores propriedades antagónicas, quando se analisa determinados compostos tendo como base testes mais específicos, como o teste de inibição dos CVOs.

Este estudo não só comprova a capacidade das duas estirpes de *Trichoderma* testadas como possíveis agentes de controlo biológico contra *M. phaseolina*, mas também corrobora a importância em estudar diferentes estirpes de *T. harzianum* e *T. atroviride*, uma vez que estas podem apresentar propriedades diferentes mediante os mesmos testes. É crucial especificar propriedades específicas dentro de estirpes específicas.

5. Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo permitem tirar diversas conclusões, relativamente ao potencial antagonista das estirpes *T. harzianum* T1A e *T. atroviride* T17 contra *M. phaseolina*. Quando realizado o MOD, *T. atroviride* T17 apresentou melhor capacidade de inibição contra *M. phaseolina*, comparativamente com *T. harzianum* T1A. No entanto ambos apresentaram uma boa capacidade de inibição contra *M. phaseolina*.

No teste de inibição por CVOs, podemos concluir que os CVOs produzidos por *T. harzianum* T1A apresentam propriedades antagónicas mais eficazes contra *M. phaseolina*, comparativamente com os produzidos por *T. atroviride* T17.

Quando se analisou a capacidade do secretoma produzido pelas estirpes de *Trichoderma* testadas, na inibição de *M. phaseolina*, podemos concluir que ambos os secretomas inibem consideravelmente o crescimento de *M. phaseolina*.

Deste modo, ambas as estirpes de *Trichoderma* testadas, podem ser consideradas bons agentes de controlo biológico. Os resultados obtidos são promissores e permitem perspetivar futuras investigações. Devido ao enorme prejuízo que *M. phaseolina* acarreta anualmente em diversos países, este estudo reveste-se de maior importância ao identificar possíveis agentes de controlo biológico contra este fungo. Futuras investigações são necessárias.

6. Perspetivas futuras

- ✓ Caracterizar o metaboloma de *T. harzianum* T1A e *T. atroviride* T17, e posteriormente identificar os metabolitos secundários secretados por estes microrganismos com maior relevância no processo antagónico contra *M. phaseolina*;
- ✓ Compreender a função que estes metabolitos desempenham contra *M. phaseolina*, nomeadamente na morfologia e desenvolvimento, assim como a sua função na redução da atividade dos fatores de virulência deste fungo fitopatogénico;
- ✓ Avaliar o potencial antagónico que *T. harzianum* T1A e *T. atroviride* T17 apresentam contra microesclerócios produzidos por *M. phaseolina*, nomeadamente na redução do seu tempo de viabilidade;
- ✓ Procurar perceber quais as enzimas que são mais eficientes no biocontrolo da doença provocada por *M. phaseolina*, e de igual modo identificar quais as menos agressivas para o meio ambiente envolvente;
- ✓ Ampliar os conhecimentos já existentes para posteriormente estabelecer a ponte entre os pontos anteriormente referidos, recorrendo a técnicas de proteómica e cromatografia mais elaboradas;
- ✓ Realizar ensaios *in vivo* com as estirpes de *Trichoderma* utilizadas neste estudo, com o intuito de perceber se realmente podem ser utilizadas como agentes de controlo biológico contra *M. phaseolina*.

7. Anexos

7.1. Crescimento de *T. harzianum* T1A e *T. atroviride* T17 em PDA

- 1- Preparar e autoclavar meio de cultura PDA;
- 2- Plaquear o respetivo meio para placas de Petri (50mm);
- 3- Inocular o *plug* de micélio, com auxílio de furador (5mm de micélio) dos fungos em questão, no centro da placa de Petri;
- 4- Selar a placa de Petri com parafilme e identificar;
- 5- Incubar a 25°C durante 5 dias.

7.2. Método de oposição direta

- 1- Crescimento do fungo fitopatogénico em meio de cultura PDA (protocolo igual ao referido na secção 7.1. dos Anexos);
- 2- Crescimento do fungo antagonista em meio de cultura PDA (protocolo referido na secção 7.1. dos Anexos);
- 3- Preparar, autoclavar e plaquear em placas de Petri (90mm) meio de cultura PDA;
- 4- Colocar na placa de Petri (90mm), com auxílio de um furador, um *plug* de micélio do fungo fitopatogénico a 2,5cm da parede da placa de Petri, e no lado oposto da placa, também a 2,5cm da parede deste colocar um *plug* do fungo antagonista;
- 5- Ensaio realizado em triplicado;
- 6- O controlo corresponde a *M. phaseolina* crescido a 2,5cm da parede da placa de Petri contendo meio de cultura PDA;
- 7- Incubar a 25°C durante 15 dias;
- 8- Durante o período de incubação, efetuam-se medições do crescimento (medição desde o ponto onde se colocou o *plug* de micélio até à extremidade do crescimento da cultura),

tanto para o fungo fitopatogénico, como para o fungo antagonista testado, durante os primeiros 7 dias, efetuando-se medições também ao 10º e 15º dias;

9- Realizar um registo fotográfico nos dias em que se efetuam as medições;

10- Realizar os cálculos necessários para posteriormente serem introduzidos no programa estatístico GraphPad5, sendo o resultado final observado na forma de gráfico.

7.3. Teste de inibição por compostos voláteis orgânicos

1- Crescimento do fungo fitopatogénico em meio de cultura PDA (protocolo igual ao referido na secção 7.1. dos Anexos);

2- Crescimento do fungo antagonista em meio de cultura PDA (protocolo referido na secção 7.1. dos Anexos);

3- Preparar, autoclavar e plaquear em placas de Petri (90mm) meio de cultura PDA;

4- Colocar um *plug* de micélio do fungo fitopatogénico no centro de uma placa de Petri;

5- Colocar um *plug* de micélio do fungo antagonista no centro de outra placa de Petri;

6- Identificar e selar as placas de Petri com parafilme;

7- Incubar a 25°C durante um dia;

8- Medir o diâmetro do micélio de ambos os fungos;

9- Inverter a placa contendo o fungo fitopatogénico sobre a placa contendo o fungo antagonista;

10- Selar as duas placas sobrepostas com parafilme, identificar e incubar a 25°C durante 7 dias. Ensaio realizado em triplicado;

11- Como controlo inverte-se uma placa de Petri contendo apenas PDA, sobre uma placa de Petri contendo um *plug* de micélio do fungo fitopatogénico no centro desta;

12- Medir o diâmetro do micélio de ambos os fungos, durante o período de incubação anteriormente referido. Realizar um registo fotográfico no último dia de incubação;

13- Realizar os cálculos necessários para posteriormente serem introduzidos no programa estatístico GraphPad5, sendo o resultado final observado na forma de gráfico.

7.4. Inibição do crescimento de *M. phaseolina* em Meio Mínimo Sólido

Parte 1: Crescimento de *T. harzianum* T1A e *T. atroviride* T17 em meio líquido

- 1- Crescimento do fungo antagonista em meio de cultura PDA (protocolo igual ao referido na secção 7.1. dos Anexos);
- 2- Filtrar meio de cultura PDA, e colocar em 50mL de PDB (o filtrado) em erlenmeyers de 250mL;
- 3- Autoclavar;
- 4- Colocar 2 *plugs* de micélio do fungo antagonista (com auxílio de um furador) em meio de cultura PDB;
- 5- Identificar os erlenmeyers com a informação necessária;
- 6- Incubar a 25°C durante 7 dias;
- 7- Dois dias depois do início do período de incubação crescer o fungo fitopatogénico em meio de cultura PDA, conforme o descrito na secção 7.1. dos Anexos.

Parte 2: Obtenção do MM e finalização do ensaio

- 8- Obter o filtrado através da separação do micélio do fungo antagonista do respetivo MM, recorrendo a papel de filtro Whatman nº1;
- 9- Dividir o filtrado em duas frações para recipientes apropriados e devidamente identificados:
 - ✓ 1º Fração - Adição de agar (15%), ou seja, MM com secretoma sem glicose;
 - ✓ 2º Fração - Adição de agar (15%) e Glicose (20%), ou seja MM com secretoma com glicose.
- 10- Autoclavar a 121°C durante 20min;
- 11- Plaquear para placas de Petri (90mm) previamente identificadas;
- 12- Crescer o fungo fitopatogénico de acordo com o protocolo descrito no ponto 7.1. na secção dos anexos. Ensaio realizado em triplicado para cada fração;

13- Medir o diâmetro do micélio do fungo fitopatogénico, durante o decorrer do período de incubação. Realizar um registo fotográfico no último dia de incubação;

14- Realizar os cálculos necessários para posteriormente serem introduzidos no programa estatístico GraphPad5, sendo o resultado final observado na forma de gráfico.

7.5. Inibição do crescimento de *M. phaseolina* em Meio Mínimo líquido

Parte 1: Crescimento de *T. harzianum* T1A e *T. atroviride* T17 em meio líquido

1- Crescimento do fungo antagonista em meio de cultura PDA (protocolo igual ao referido na secção 7.1. dos Anexos);

2- Filtrar meio de cultura PDA, e colocar em 50mL de PDB (o filtrado) em erlenmeyers de 250mL;

3- Autoclavar;

4- Colocar 2 *plugs* de micélio do fungo antagonista (com auxílio de um furador) em meio de cultura PDB;

5- Identificar os erlenmeyers com a informação necessária;

6- Incubar a 25°C durante 7 dias;

7- Dois dias depois do início do período de incubação crescer o fungo fitopatogénico em meio de cultura PDA, conforme o descrito na secção 7.1. dos Anexos.

Parte 2: Obtenção do MM e finalização do ensaio

8- Obter o filtrado através da separação do micélio do fungo antagonista do respetivo MM, recorrendo a duas filtrações, a primeira com papel de Whatman nº1, e a segunda com um filtro com poro de 2µm acoplado a uma seringa de 5mL;

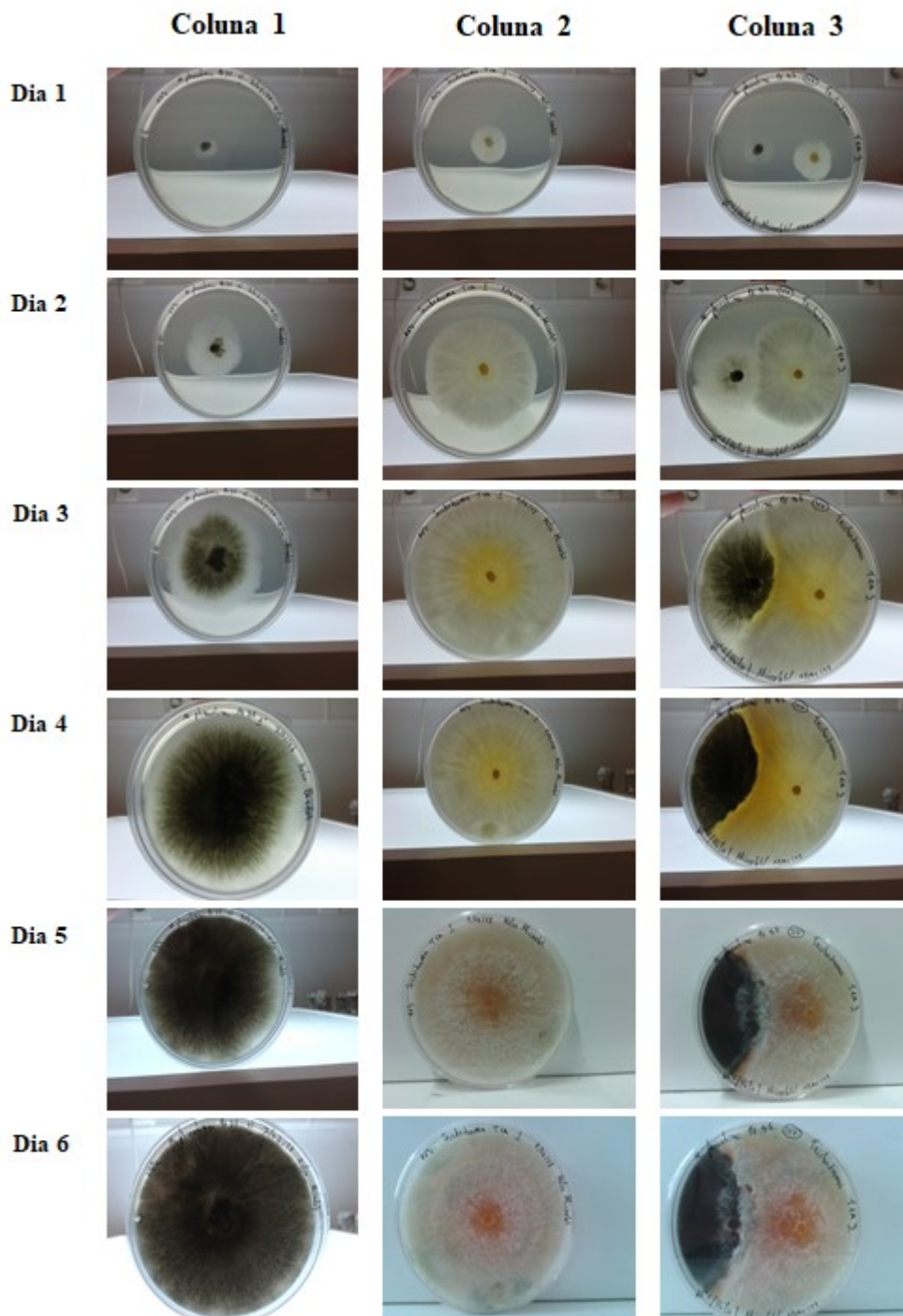
9- Dividir o filtrado em duas frações para erlenmeyers devidamente identificados e esterilizados:

1º Fração - MM com secretoma sem adição de glicose;

2º Fração - MM com secretoma e adição de 20% de glicose.

- 10- Crescer o fungo fitopatogénico de acordo com os parâmetros referidos anteriormente;
- 11- O controlo não continha qualquer secretoma proveniente do crescimento do fungo antagonista, contendo apenas meio de cultura PDB, no qual se cresceu o fungo fitopatogénico;
- 12- Incubar a 25°C durante 7 dias;
- 13- Determinação da biomassa do micélio (g) do fungo fitopatogénico, por secagem deste a 50°C (durante 3 dias), de forma a obter o valor do seu peso seco. Ensaio realizado em triplicado para cada fração;
- 14- Realizar os cálculos necessários para posteriormente serem introduzidos no programa estatístico GraphPad5, sendo o resultado final observado na forma de gráfico.

7.6. Registo fotográfico diário da inibição do crescimento de *M. phaseolina* por *T. harzianum* T1A, durante a realização do MOD



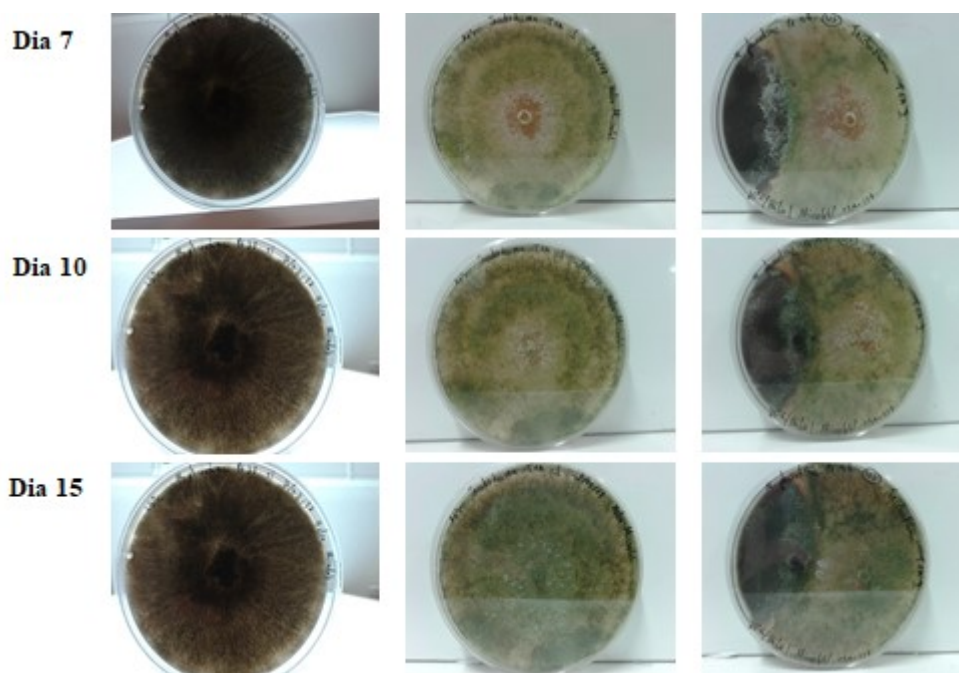
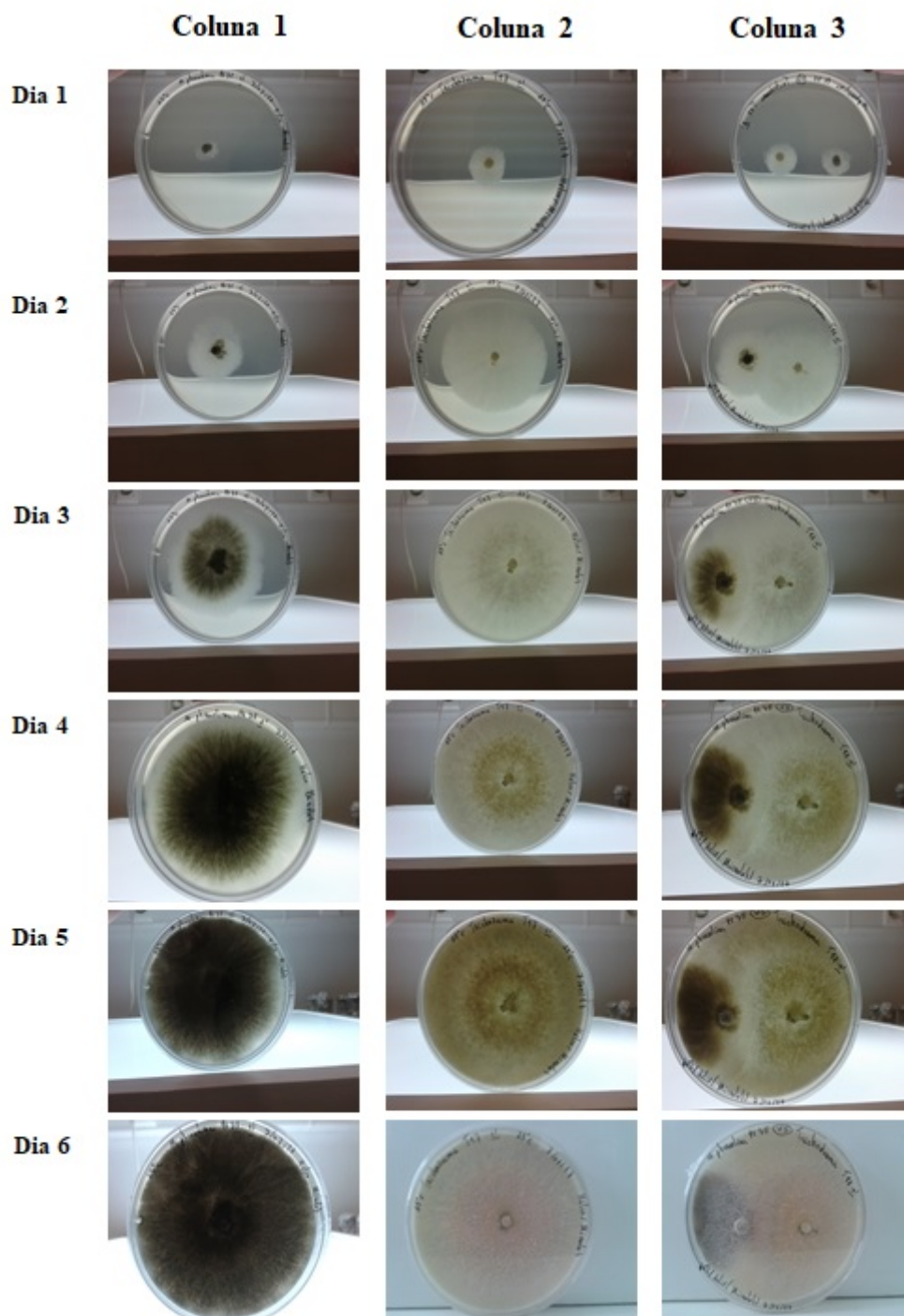


Figura 17: Registo fotográfico diário da inibição de *M. phaseolina* por *T. harzianum* T1A, do dia um ao sétimo dia de crescimento, e também no 10º e 15º dia de crescimento. Crescimento de *M. phaseolina* em meio de cultura PDA (Coluna 1). Crescimento de *T. harzianum* T1A em meio de cultura PDA (Coluna 2). Crescimento de *M. phaseolina* em contacto direto com *T. harzianum* T1A (Coluna 3). Crescimento a 25°C durante 15 dias.

7.7. Registo fotográfico diário da inibição do crescimento de *M. phaseolina* por *T. atroviride* T17, durante a realização do MOD



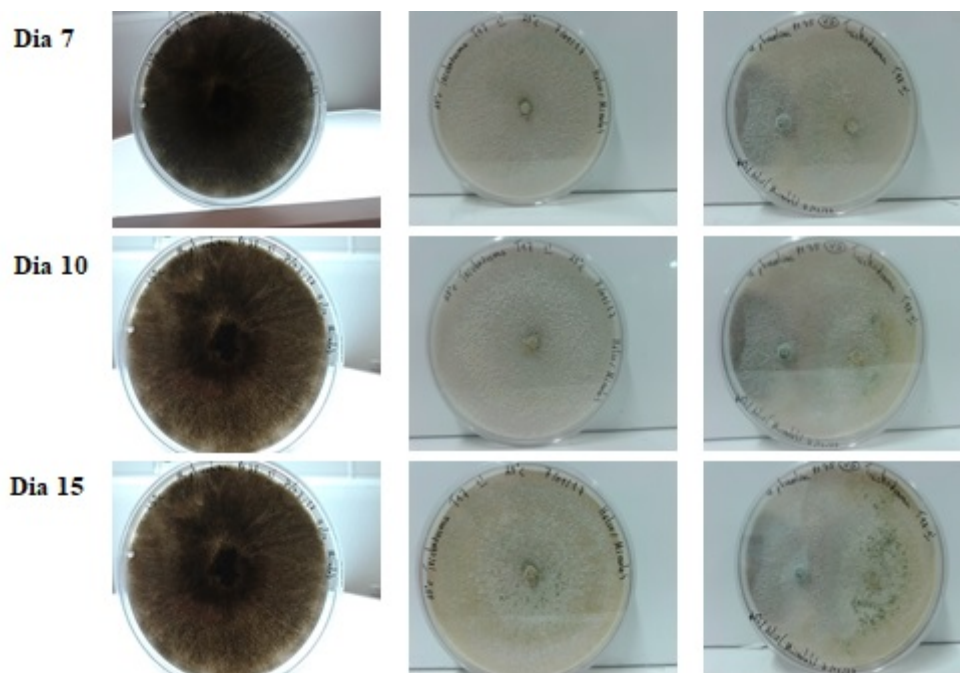
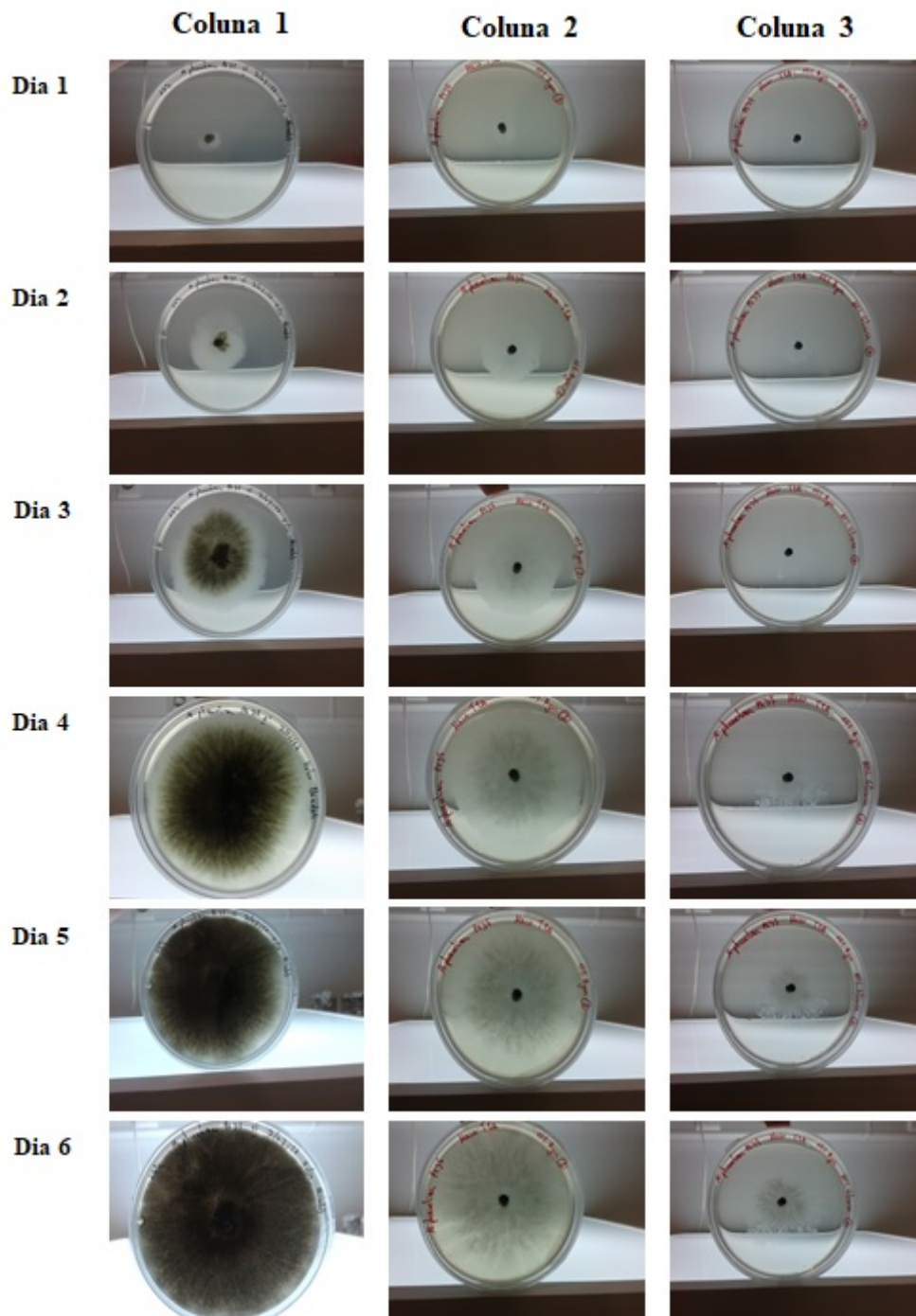


Figura 18: Registo fotográfico diário da inibição de *M. phaseolina* por *T. atroviride* T17, do dia um ao sétimo dia de crescimento, e também no 10º e 15º dia de crescimento. Crescimento de *M. phaseolina* em meio de cultura PDA (Coluna 1). Crescimento de *T. atroviride* T17 em meio de cultura PDA (Coluna 2). Crescimento de *M. phaseolina* em contacto direto com *T. atroviride* T17 (Coluna 3). Crescimento a 25°C durante 15 dias.

7.8. Registo fotográfico diário inibição do crescimento de *M. phaseolina* por *T. harzianum* T1A, em MM sólido



Dia 7

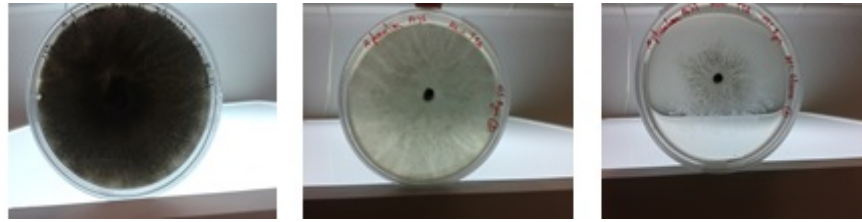
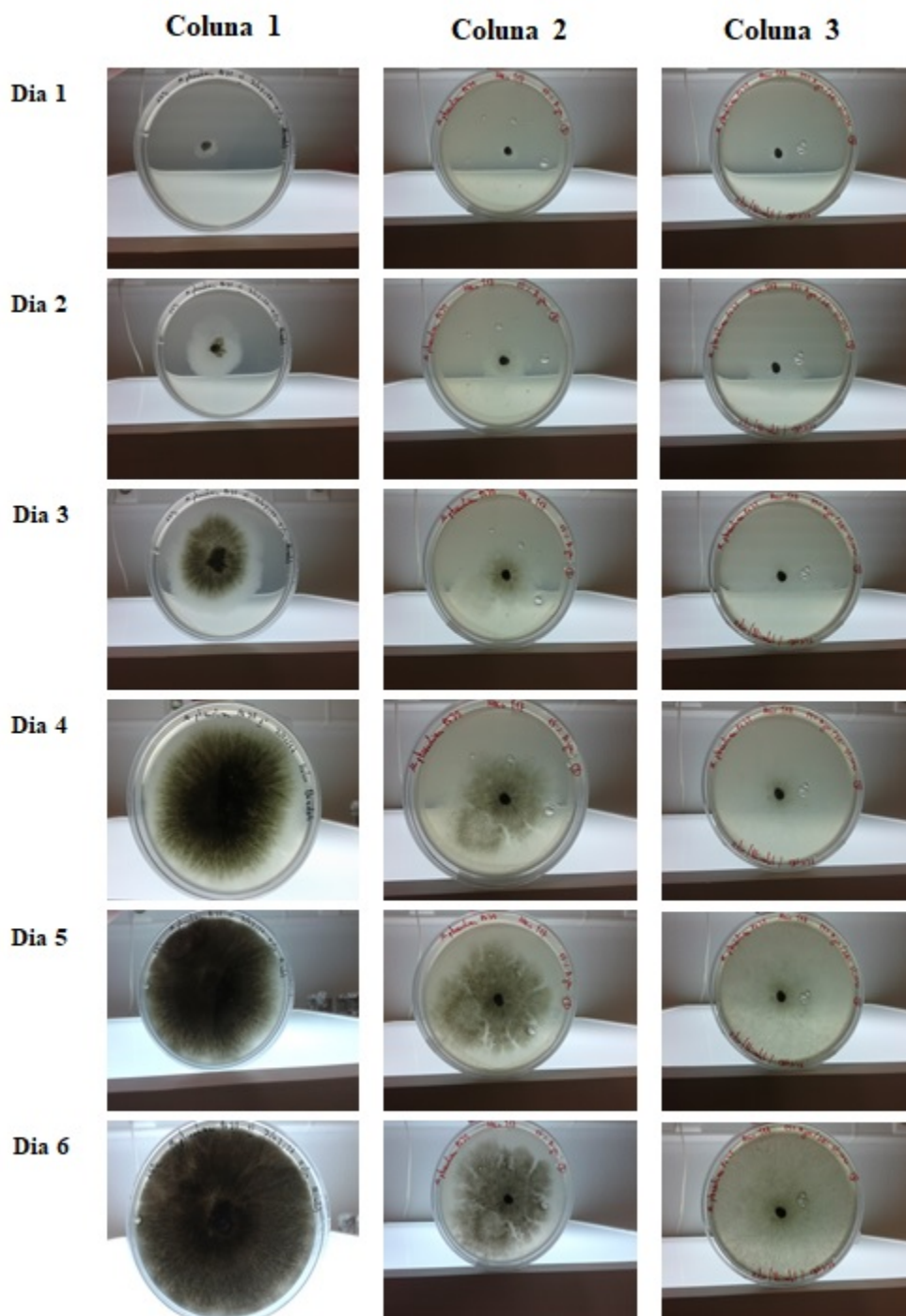


Figura 19: Registo fotográfico diário do crescimento de *M. phaseolina* em MM sólido contendo secretoma de *T. harzianum* T1A. Crescimento de *M. phaseolina* em meio de cultura PDA (Coluna 1). Crescimento de *M. phaseolina* em MM com secretoma de *T. harzianum* T1A com adição de 20% de Glicose (Coluna 2). Crescimento de *M. phaseolina* em MM com secretoma de *T. harzianum* T1A sem adição de Glicose (Coluna 3). Crescimento a 25°C durante 7 dias.

7.9. Registo fotográfico diário inibição do crescimento de *M. phaseolina* por *T. atroviride* T17, em MM sólido



Dia 7



Figura 20: Registo fotográfico diário do crescimento de *M. phaseolina* em MM sólido contendo secretoma de *T. atroviride* T17. Crescimento de *M. phaseolina* em meio de cultura PDA (Coluna 1). Crescimento de *M. phaseolina* em MM com secretoma de *T. atroviride* T17 com adição de 20% de Glicose (Coluna 2). Crescimento de *M. phaseolina* em MM com secretoma de *T. atroviride* T17 sem adição de Glicose (Coluna 3). Crescimento a 25°C durante 7 dias.

Capítulo 4: Bibliografía

1. Kunwar, I. K., Singh, T., Machado, C. C. & Sinclair, J. B. Histopathology of soybean seed and seedling infection by *Macrophomina phaseolina*. *The American Phytopathological Society*. **76**, 532–535 (1985).
2. Khan, S. N. *Macrophomina phaseolina* as causal agent for charcoal rot of sunflower. *Mycopath*. **5**, 111–118 (2007).
3. Cloud, G.L., Rupe, J.C. Preferential host selection of *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology*. **78**, 1563–1564 (1988).
4. Mihail, J.D. and Taylor, S. J. Interpreting of variability among isolates of *Macrophomina phaseolina* in pathogenicity, pycnidium production, and chlorate utilization. *Can. Journal Bot.* **73**, 1596–1603 (1995).
5. Mahdizadeh, V., Safaie, N., Goltapeh, E. M. & Mayek-Perez, N. Intraspecies diversity of *Macrophomina phaseolina* in Iran. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* **45**, 963–976 (2012).
6. Prasad, R. D. Cultural, morphological, pathogenic and molecular diversity in *Macrophomina phaseolina* isolates of safflower from southern India. *Indian Phytopathol.* **64**, 247–253 (2011).
7. Tan, D. D. H. S., Sigler, L., Gibas, C. & Fong, I. W. Disseminated fungal infection in a renal transplant recipient involving *Macrophomina phaseolina* and *Scytalidium dimidiatum*: Case report and review of taxonomic changes among medically important members of the *Botryosphaeriaceae*. *Med. Mycol.* **46**, 285–292 (2008).
8. Sutton, B. C. *The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*. (CMI, Kew, 1980).
9. Gupta, G. K., Sharma, S. K. & Ramteke, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of Soybean. *J. Phytopathol.* **160**, 167–180 (2012).

10. Fuhlbohmer, M. J., Ryley, M. J. & Aitken, E. A. B. Infection of mungbean seed by *Macrophomina phaseolina* is more likely to result from localized pod infection than from systemic plant infection. *Plant Pathol.* **62**, 1271–1284 (2013).
11. Chaturvedi, D. D. Incidence and plant stage relationship of rootrot incited by *Macrophomina phaseolina* on mothbean assessed using novel inoculation methods. *Int. J. Sci. Res. Manag.* **5**, (2017).
12. Gray, F. A., Mihail, J. D., Lavigne, R. J. & Porter, P. M. Incidence of charcoal rot of sorghum and soil populations of *Macrophomina phaseolina* associated with sorghum and native vegetation in Somalia. *Mycopathologia.* **114**, 145–151 (1991).
13. Mihail, J. D. *Macrophomina phaseolina*: spatio-temporal dynamics of inoculum and of disease in a highly susceptible crop. *Phytopathology.* **79**, 848–855 (1989).
14. Sánchez Hernández, M. E., Ruiz Dávila, A., Pérez De Algaba, A., Blanco López, M. A. & Trapero Casas, A. Occurrence and etiology of death of young olive trees in southern Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* **104**, 347–357 (1998).
15. Kaur, S. et al. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Crit. Rev. Microbiol.* **38**, 136–151 (2012).
16. Almomani, F., Alhawatemala, M. & Hameed, K. Detection, identification and morphological characteristic of *Macrophomina phaseolina*: The charcoal rot disease pathogens isolated from infected plants in Northern Jordan. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* **46**, 1005–1014 (2013).
17. Csöndes, I. Effect of culture media on the growth and morphology of Hungarian *Macrophomina phaseolina* isolates. *Acta Agron. Hungarica.* **60**, 109–129 (2012).

18. Iqbal, U. & Mukhtar, T. Morphological and pathogenic variability among *Macrophomina phaseolina* isolates associated with mungbean (*Vigna radiata* L.). Pakistan. Sci. World J. **2014**, 1–9 (2014).
19. Reis, E. M., Boaretto, C. & Danelli, A. L. D. *Macrophomina phaseolina*: density and longevity of microsclerotia in soybean root tissues and free on the soil, and competitive saprophytic ability. *Summa Phytopathol.* **40**, 128–133 (2014).
20. Beas-Fernández, R., De Santiago-De Santiago, A., Hernández-Delgado, S. & Mayek-Pérez, N. Characterization of Mexican and non-Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on morphological characteristics, pathogenicity on bean seeds and endoglucanase genes. *J. Plant Pathol.* **88**, 53–60 (2006).
21. Campus, Q., Diseases, C. & Road, P. Effect of climatic conditions on life cycle of charcoal rot infected sunflower plant. *Pakistan J. Bot.* **39**, 2657–2662 (2007).
22. Sukanya, R., Jayalakshmi, S. K. & Girish, G. Effectt of temperature and pH levels on growth of *Macrophomina Phaseolina* (Tassi) Goid. infecting sorghum. *Int. J. Agric. Sci.* **8**, 1768–1770 (2016).
23. Mayek-Pérez, N. et al. Water relations, histopathology and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* under drought stress. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **60**, 185–195 (2002).
24. Claudino, M. R. & Soares, D. J. Pathogenicity and aggressiveness of *Macrophomina phaseolina* isolates to castor (*Ricinus communis*). *Trop. Plant Pathol.* **39**, 453–456 (2014).
25. Pratt, R. G., Mclaughlin, M. R., Pederson, G. A., Rowe, D. E. Pathogenicity of *Macrophomina phaseolina* to mature plant tissues of alfalfa and white clover. *Plant Dis.* **82**, 1033–1038 (1998).

26. Singh, P. & Mehrotra, R. Penetration and invasion of gram roots by *Rhizoctonia bataticola*. *Ind. Phytopathol.* **35**, 336–338 (1982).
27. Ramos, A. M. et al. In vitro growth and cell wall degrading enzyme production by Argentinean isolates of *Macrophomina phaseolina*, the causative agent of charcoal rot in corn. *Rev. Argent. Microbiol.* **48**, 267–273 (2016).
28. Wang, H., Jones, R. W., Wang, H. & Jones, R. W. A unique endoglucanase-encoding gene cloned from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. *Appl. Environmental Microbiol.* **61**, 2004–2006 (2004).
29. Sharmin, S. et al. Xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase genes from a susceptible and resistant jute species show opposite expression pattern following *Macrophomina phaseolina* infection. *Commun. Integr. Biol.* **5**, 598–606 (2012).
30. Fernandes, L. P., Ulhoa, C. J., Asquieri, E. R. & Monteiro, V. N. Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. *Rev. Eletrônica Farmácia.* **4**, 43–51 (2007).
31. Kakde, R. B. Extracellular lipase enzyme production by seed-borne fungi under the influence of physical factors. *J. Biol.* **3**, 94–100 (2011).
32. Roy, P. K., Roy, U. & Dube, D. K. Immobilised cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Macrophomina phaseolina*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **34**, 165–170 (1984).
33. Shier, W. T. Resistance to toxin-mediated fungal infection: role of lignins, isoflavones, other seed phenolics, sugars, and boron in the mechanism of resistance to charcoal rot disease in soybean. *Toxin Rev.* **31**, 16–26 (2012).
34. Shier, W. T., Abbas, H. K., Baird, R. E., Ramezani, M. & Sciumbato, G. L. (-)-Botryodiplodin, a unique ribose-analog toxin. *Toxin Reviews.* **26**, 343–386 (2007).

35. Bhattacharya, D., Dhar, T. K., Siddiqui, K. A. I. & Ali, E. Inhibition of seed germination by *Macrophomina phaseolina* is related to phaseolinone production. *J. Appl. Bacteriol.* **77**, 129–133 (1994).
36. Ramezani, M. et al. Soybean charcoal rot disease fungus *Macrophomina phaseolina* in Mississippi produces the phytotoxin (-)-botryodiplodin but no detectable phaseolinone. *J. Nat. Prod.* **70**, 128–129 (2007).
37. Monod, M., Misaghi, I. J., Mendelson, N. H. & Surana, U. C. Induction of frencing-like symptoms in tobacco by *Macrophomina phaseolina* and its metabolites. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **29**, 19–25 (1986).
38. Mayék-Pérez, N. et al. Variability of Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on pathogenesis and AFLP genotype. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **59**, 257–264 (2001).
39. Rajkumar FB, K. M. Genetic variability of sorghum charcoal rot pathogen (*Macrophomina phaseolina*) assessed by random DNA markers. *Plant Pathol J.* **23**, 45–50 (2007).
40. Almeida, Á. M. R. et al. Genotypic diversity among brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. *Fitopatol. Bras.* **28**, 279–285 (2003).
41. Jana, T., Sharma, T. R., Prasad, R. D. & Arora, D. K. Molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* species by a single primer RAPD technique. *Microbiol. Res.* **158**, 249–257 (2003).
42. Almeida, Á. M. R. et al. Effect of crop rotation on specialization and genetic diversity of *Macrophomina phaseolina*. *Reactions.* **33**, 257–264 (2008).
43. Fátima, R., Tonin, B. & Avozani, A. In vitro mycelial sensitivity of *Macrophomina phaseolina* to fungicides. *Agrociencia.* **43**, 460–466 (2013).

44. Kishore Babu, B., Saxena, A. K., Srivastava, A. K. & Arora, D. K. Identification and detection of *Macrophomina phaseolina* by using species-specific oligonucleotide primers and probe. *Mycologia*. **99**, 797–803 (2008).
45. Srinivasan, A. et al. Cutaneous infection caused by *Macrophomina phaseolina* in a child with acute myeloid leukemia. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 1969–1972 (2009).
46. Premamalini, T. et al. Fungal keratitis caused by *Macrophomina phaseolina* - A case report. *Med. Mycol. Case Rep.* **1**, 123–126 (2012).
47. Sanders, I. R. *Mycorrhizal* symbioses: How to be seen as a good fungus. *Curr. Biol.* **21**, 550–552 (2011).
48. Dean, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **13**, 414–430 (2012).
49. Chanclud, E. & Morel, J. Plant hormones: a fungal point of view. *Mol. Plant Pathol.* 1–9 (2016).
50. Peleg, Z. & Blumwald, E. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 290–295 (2011).
51. Hirsch, M., Fang, Y., Asad, S. & Kapulnik, Y. The role of phytohormones in plant-microbe symbioses. *Plant Soil.* **194**, 171–184 (1997).
52. Schwechheimer, C. Understanding gibberellic acid signaling-are we there yet? *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 9–15 (2008).
53. Nakamura, T., Mukai, C., Ozaki, Y., Saotome, M. & Murayama, T. Effects of auxin and gibberellin on conidial germination and elongation of young hyphae in a cyclic 3':5' adenosine monophosphate-dependent protein kinase mutant of *Neurospora crassa*. *Plant Growth Regul.* **7**, 201–207 (1988).

54. Blee, K. A. & Anderson, A. J. Regulation of arbuscule formation by carbon in the plant. *Plant J.* **16**, 523–530 (1998).
55. Zhao, Y. The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 16–22 (2008).
56. Dello Ioio, R., Linhares, F. S. & Sabatini, S. Emerging role of cytokinin as a regulator of cellular differentiation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 23–27 (2008).
57. Vogler, H. & Kuhlemeier, C. Simple hormones but complex signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 51–56 (2003).
58. Siemens, J. et al. Transcriptome analysis of *Arabidopsis clubroots* indicate a key role for cytokinins in disease development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**, 480–494 (2006).
59. Kamisaka, S., Yanagishima, N. & Masuda, Y. Effect of auxin and gibberellin on sporulation in yeast. *Physiol. Plant.* **20**, 90–97 (1967).
60. Sharaf, E. F. & Farrag, A. A. Induced resistance in tomato plants by IAA against *Fusarium oxysporum lycopersici*. *Pol. J. Microbiol.* **53**, 111–116 (2004).
61. Mah, K. M., Uppalapati, S. R., Tang, Y., Allen, S. & Shuai, B. Gene expression profiling of *Macrophomina phaseolina* infected *Medicago truncatula* roots reveals a role for auxin in plant tolerance against the charcoal rot pathogen. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **79**, 21–30 (2012).
62. Chang, C. How do plants respond to ethylene and what is its importance? *BMC Biol.* **14**, 7–14 (2016).
63. Iqbal, N. et al. Ethylene role in plant growth, development and senescence: Interaction with other phytohormones. *Front. Plant Sci.* **8**, 1–19 (2017).

64. Al-Masri, M. I., Elad, Y., Sharon, A. & Barakat, R. Ethylene production by *Sclerotinia sclerotiorum* and influence of exogenously applied hormone and its inhibitor aminoethoxyvinylglycine on white mold. *Crop Prot.* **25**, 356–361 (2006).
65. Flaishman, M. a & Kolattukudy, P. E. Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as a signal. *Plant Biol.* **91**, 6579–6583 (1994).
66. Gaige, A. R., Ayella, A. & Shuai, B. Methyl jasmonate and ethylene induce partial resistance in *Medicago truncatula* against the charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **74**, 412–418 (2010).
67. Wang, L. & Wu, J. The essential role of jasmonic acid in plant-herbivore interactions - Using the wild tobacco *Nicotiana attenuata* as a model. *J. Genet. Genomics.* **40**, 597–606 (2013).
68. Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z. & Fan, B. Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signal. Behav.* **4**, 493–496 (2009).
69. Rivas-San Vicente, M. & Plasencia, J. Salicylic acid beyond defence: Its role in plant growth and development. *J. Exp. Bot.* **62**, 3321–3338 (2011).
70. Chaves, F. C. & Gianfagna, T. J. Necrotrophic phase of *Moniliophthora perniciosa* causes salicylic acid accumulation in infected stems of cacao. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **69**, 104–108 (2006).
71. Panahirad, S., Zaare-Nahandi, F., Mohammadi, N., Alizadeh-Salteh, S. & Safaie, N. Effects of salicylic acid on *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin B1 accumulation in pistachio (*Pistacia vera* L.) fruit. *J. Sci. Food Agric.* **94**, 1758–1763 (2014).
72. Sah, S. K., Reddy, K. R. & Li, J. Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. *Front. Plant Sci.* **7**, 1–26 (2016).

73. Spence, C. & Bais, H. Role of plant growth regulators as chemical signals in plant-microbe interactions: A double edged sword. *Curr. Opin. Plant Biol.* **27**, 52–58 (2015).
74. Spence, C. A., Lakshmanan, V., Donofrio, N. & Bais, H. P. Crucial roles of abscisic acid biogenesis in virulence of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Front. Plant Sci.* **6**, 1–13 (2015).
75. Siewers, V., Kokkelink, L., Smedsgaard, J. & Tudzynski, P. Identification of an abscisic acid gene cluster in the grey mold *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 4619–4626 (2006).
76. F. C., Thompson, J. F. & Dent, C. E. γ -aminobutyric acid: a constituent of the potato tuber? *Science*. **110**, 439–440 (1949).
77. Bloch-Tardy, M., Rolland, B. & Pierre, G. Pig brain 4-aminobutyrate 2-ketoglutarate transaminase. Purification, kinetics and physical properties. *Biochimie*. **56**, 823–832 (1974).
78. Cho, Y. R., Chang, J. Y. & Chang, H. C. Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from Kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 104–109 (2007).
79. Manyam, B. V., Katz, L., Hare, T. A., Kaniefski, K. & Tremblay, R. D. Isoniazid-induced elevation of CSF GABA levels and effects on chorea in huntington's disease. *Ann. Neurol.* **10**, 35–37 (1981).
80. Shelp, B. J., Bown, A. W. & McLean, M. D. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci.* **4**, 446–452 (1999).
81. Kim, Y. B. et al. Accumulation of γ -aminobutyric acid and transcription of glutamate decarboxylase in *Brassica juncea* (L.) Czern. *Plant Omics*. **6**, 263–267 (2013).

82. Taylor, P., Kinnersley, A. M. & Turano, F. J. Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Crit. Rev. Plant Sci.* **19**, 479–509 (2000).
83. Bouché, N. & Fromm, H. GABA in plants: Just a metabolite? *Trends Plant Sci.* **9**, 110–115 (2004).
84. Ramputh, A. & Bown, A. W. Rapid γ -aminobutyric acid synthesis and the inhibition of the growth and development of oblique-banded leaf-roller Larvae. *Plant Physiol.* **111**, 1349–1352 (1996).
85. Vijayakumari, K. & Puthur, J. T. γ -Aminobutyric acid (GABA) priming enhances the osmotic stress tolerance in *Piper nigrum* Linn. plants subjected to PEG-induced stress. *Plant Growth Regul.* **78**, 57–67 (2016).
86. Micallef, B. J. & Shelp, B. J. Arginine metabolism in developing soybean cotyledons. *Plant Physiol.* **91**, 170–174 (1989).
87. Coleman, S. T., Fang, T. K., Rovinsky, S. A., Turano, F. J. & Moye-Rowley, W. S. Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**, 244–250 (2001).
88. Michaeli, S. & Fromm, H. Closing the loop on the GABA shunt in plants: are GABA metabolism and signaling entwined? *Front. Plant Sci.* **6**, 1–7 (2015).
89. Renault, H. et al. GABA accumulation causes cell elongation defects and a decrease in expression of genes encoding secreted and cell wall-related proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **52**, 894–908 (2011).
90. Ramesh, S. A., Tyerman, S. D., Gilliam, M. & Xu, B. γ -Aminobutyric acid (GABA) signalling in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 1577–1603 (2017).

91. Kathiresan, A., Tung, P., Chinnappa, C. C. & Reid, D. M. γ -Aminobutyric acid stimulates ethylene biosynthesis in sunflower. *Plant Physiol.* **115**, 129–135 (1997).
92. Yue, X. et al. Transcriptional evidence for inferred pattern of pollen tube-stigma metabolic coupling during pollination. *PLoS One.* **9**, 1–16 (2014).
93. Frietsch, S. et al. A cyclic nucleotide-gated channel is essential for polarized tip growth of pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 14531–14536 (2007).
94. Booz, M. R., Kerbauy, G. B., Guerra, M. P. & Pescador, R. The role of γ -aminobutyric acid (Gaba) in somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* Berg. (*Myrtaceae*). *Brazilian J. Plant Physiol.* **21**, 271–280 (2009).
95. Palanivelu, R., Brass, L., Edlund, A. F. & Preuss, D. Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an *Arabidopsis* gene that controls GABA levels. *Cell.* **114**, 47–59 (2003).
96. Ramesh, S. A. et al. GABA signalling modulates plant growth by directly regulating the activity of plant-specific anion transporters. *Nat. Commun.* **6**, 1–10 (2015).
97. Chevrot, R. et al. GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 7460–7464 (2006).
98. Reggiani, R., A., N., M. & M., and Bertani, A. ABA induces 4-aminobutyrate accumulation in wheat seedlings. *Phytochemistry.* **34**, 605–609 (1993).
99. Kishinami, I. Effect of auxins (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, indole-3-acetic acid and naphthaleneacetic acid) on the accumulation of γ -aminobutyric acid in excised rice root tips. *Plant Cell Physiol.* **29**, 581–585 (1998).

100. Ford, Y.-Y., Ratcliff, R. G. & Robins, R. J. Phytohormone-induced GABA production in transformed root cultures of *Datura stramonium*: an in vivo ¹⁵N NMR study. *J. Exp. Bot.* **47**, 811–818 (1996).
101. Diaz, C. Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in *Arabidopsis*. A metabolic profiling approach. *Plant Physiol.* **138**, 898–908 (2005).
102. Kumar, S. & Punekar, N. S. The metabolism of 4-aminobutyrate (GABA) in fungi. *Mycol. Res.* **101**, 403–409 (1997).
103. Oliver, R. P. & Solomon Peter S, P. S. New developments in pathogenicity and virulence of necrotrophs. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**, 415–419 (2010).
104. Reyes-García, M. G., Hernández-Hernández, F. & García-Tamayo, F. Gamma-aminobutyric acid (GABA) increases in vitro germ-tube formation and phospholipase B1 mRNA expression in *Candida albicans*. *Mycoscience.* **53**, 36–39 (2012).
105. Mead, O., Thynne, E., Winterberg, B. & Solomon, P. S. Characterising the role of GABA and its metabolism in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. *PLoS One.* **8**, (2013).
106. Solomon, P. S. & Oliver, R. P. Evidence that γ -aminobutyric acid is a major nitrogen source during *Cladosporium fulvum* infection of tomato. *Planta.* **214**, 414–420 (2002).
107. Takahashi, H., Matsumura, H., Kawai-Yamada, M. & Uchimiya, H. The cell death factor, cell wall elicitor of rice blast fungus (*Magnaporthe grisea*) causes metabolic alterations including GABA shunt in rice cultured cells. *Plant Signal. Behav.* **3**, 945–953 (2008).

108. Seifi, H. S. et al. Concurrent overactivation of the cytosolic glutamine synthetase and the GABA shunt in the ABA-deficient sitiens mutant of tomato leads to resistance against *Botrytis cinerea*. *New Phytol.* **199**, 490–504 (2013).
109. Kim, N. H., Kim, B. S. & Hwang, B. K. Pepper arginine decarboxylase is required for polyamine and aminobutyric acid signaling in cell death and defense response. *Plant Physiol.* **162**, 2067–2083 (2013).
110. Saraiva, M. Enzimas extracelulares de fungos da família *Botryosphaeriaceae*. (Universidade de Aveiro, 2009).
111. Kotogán, A., Németh, B., Vágvölgyi, C., Papp, T. & Takó, M. Screening for extracellular lipase enzymes with transesterification capacity in *Mucoromycotina* strains. *Food Technol. Biotechnol.* **52**, 73–82 (2014).
112. Smith, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85 (1985).
113. Gersten, D. M. Gel electrophoresis: Proteins. Essential techniques series. (1996).
114. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680–685 (1970).
115. Kunal A. Gaidhani, Mallinath Harwalkar, Deepak Bhambere, P. S. N. Lyophilization/freeze drying – A review. *World J. Pharm. Res.* **4**, 516–543 (2016).
116. Leber, T. M. & Balkwill, F. R. Zymography: A single-Step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal. Biochem.* **249**, 24–28 (1997).
117. Wilkesman, J. & Kurz, L. Protease analysis by zymography: a review on techniques and patents. *Recent Pat. Biotechnol.* **3**, 175–184 (2009).

118. Peterson, R., Grinyer, J. & Nevalainen, H. Extracellular hydrolase profiles of fungi isolated from koala faeces invite biotechnological interest. *Mycol. Prog.* **10**, 207–218 (2011).
119. Ammerman, N., Beier-Sexton, M. & Azad, A. Growth and maintenance of Vero cell lines. *Curr Protoc Microbiol.* **4**, 1–10 (2008).
120. DeWitte-Orr, S. J. & Bols, N. C. Gliotoxin-induced cytotoxicity in three salmonid cell lines: Cell death by apoptosis and necrosis. *Comp. Biochem. Physiol.* **141**, 157–167 (2005).
121. O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. & Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5421–5426 (2000).
122. Fernandes, I. Mecanismo de infecção de *Diplodia corticola*. (Universidade de Aveiro, 2015).
123. Ghatak, S., Agarwal, R. K. & Bhilegaonkar, K. N. Comparative study of cytotoxicity of *Aeromonas* spp. on four different cell lines. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **29**, 233–241 (2006).
124. Spiegel, Y. & Chet, I. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. *Integr. Pest. Manag. Rev.* **3**, 169–175 (1998).
125. Handelsman, J. & Stabb, E. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell.* **8**, 1855–1869 (1996).
126. Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C. & Codón, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* **7**, 249–260 (2004).

127. Vinale, F. *et al.* *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *Open Mycol. J.* **8**, 127–139 (2014).
128. Harman, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* **84**, 377–393 (2000).
129. Harman, G. E., Petzoldt, R., Comis, A. & Chen, J. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology.* **94**, 147–153 (2004).
130. Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 43–56 (2004).
131. Pieterse, C. M. J. *Rhizobacteria*-mediated induced systemic resistance: triggering, signaling and expression. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**, 51–61 (2001).
132. Weindling, R. & Fawcett, H. S. Experiments in the control of *Rhizoctonia* damping-off of citrus seedlings. *Calif. Agric.* **10**, 1–16 (1936).
133. Howell, C. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* **87**, 4–10 (2003).
134. Kexiang, G., Xiaoguang, L., Yonghong, L., Tianbo, Z. & Shuliang, W. Potential of *Trichoderma harzianum* and *T. atroviride* to control *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*, the cause of apple ring rot. *J. Phytopathol.* **150**, 271–276 (2002).
135. Kredics, L. *et al.* Clinical importance of the genus *Trichoderma*. A review. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **50**, 105–117 (2003).

136. L. Kredics, Zsuzsanna Antal, A. Szekeres, L. Manczinger, Ilona Dóczi, F. Kevei, E. N. Production of extracellular proteases by human pathogenic *Trichoderma longibrachiatum* strains. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **51**, 283–295 (2005).
137. Vicente, M. F. *et al.* Antimicrobial activity of ergokonin A from *Trichoderma longibrachiatum*. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 806–813 (2001).
138. Druzhinina, I. & Kubicek, C. P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *J. Zhejiang Univ. Sci.* **6**, 100–112 (2005).
139. Chaverri, P. & Samuels, G. J. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. *Stud. Mycol.* **48**, 1–36 (2004).
140. Druzhinina, I. S. *et al.* An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet. Biol.* **42**, 813–828 (2005).
141. Grondona, I. *et al.* Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Appl. Env. Microbiol.* **63**, 3189–3198 (1997).
142. Samuels, G. J. *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.* **100**, 923–935 (1996).
143. Leelavathi, M., Vani, L. & Reena, P. Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **3**, 96–103 (2014).
144. Kumar, K., Amaresan, N., Bhagat, S., Madhuri, K. & Srivastava, R. C. Isolation and characterization of *Trichoderma* spp. for antagonistic activity against root rot and foliar pathogens. *Indian J. Microbiol.* **52**, 137–144 (2012).

145. Fadel, H. H. M., Mahmoud, M. G., Asker, M. M. S. & Lotfy, S. N. Characterization and evaluation of coconut aroma produced by *Trichoderma viride* EMCC-107 in solid state fermentation on sugarcane bagasse. *Electron. J. Biotechnol.* **18**, 5–9 (2015).
146. Kannangara, S., Dharmarathna, R. M. G. C. S. & Jayarathna, D. L. Isolation, identification and characterization of *Trichoderma* species as a potential biocontrol agent against *Ceratocystis paradoxa*. *The J. Agricul. Scien.* **12**, 51–62 (2017).
147. Küçük, Ç. & Kivanç, M. Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. *Turkish J. Biol.* **27**, 247–253 (2003).
148. Hakim, L. & Aidawati, N. *Trichoderma* spp. as agent of biological control in local Rice diseases in tidal swamp lands in South Kalimantan, Indonesia. *J. Agricult. Vet. Sci.* **9**, 1–6 (2016).
149. Vinale, F. *et al.* *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* **40**, 1–10 (2008).
150. Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernández-Galán, R. & Collado, I. G. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem. Rev.* **7**, 89–123 (2008).
151. Baker, R. Improved *Trichoderma* spp. for promoting crop productivity. *Trends Biotechnol.* **7**, 34–38 (1989).
152. Sharma, P., Sharma, M., Raja, M. & Shanmugam, V. Status of *Trichoderma* research in India: A review. *Indian Phytopath.* **67**, 1–19 (2014).
153. Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R. & Mukherjee, P. K. Secondary metabolism in *Trichoderma* - Chemistry meets genomics. *Fungal Biol. Rev.* **30**, 74–90 (2016).

154. Morath, S. U., Hung, R. & Bennett, J. W. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biol. Rev.* **26**, 73–83 (2012).
155. Fiedler, K., Schütz, E. & Geh, S. Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCs) produced by moulds on various materials. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* **204**, 111–121 (2001).
156. Nemčovič, M., Jakubíková, L., Viden, I. & Farkaš, V. Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma* spp. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* **284**, 231–236 (2008).
157. Monteiro, V. N. *et al.* New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. *Curr. Microbiol.* **61**, 298–305 (2010).
158. Ramada, M. H. S., Steindorff, A. S., Bloch, C. & 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.* **16**, 477–490 (2016).
159. Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., Ashwini, P. & Chhatpar, H. S. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *African J. Biotechnol.* **5**, 54–72 (2006).
160. Haran, S., Schickler, H. & Chet, I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiol.* **142**, 2321–2331 (1996).
161. Chen, J. K., Shen, C. R. & Liu, C. L. N-acetylglucosamine: Production and applications. *Mar. Drugs.* **8**, 2493–2516 (2010).
162. Viterbo, A., Ramot, O., Chernin, L. & Chet, I. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **81**, 549–556 (2002).

163. De la Cruz, J., Pintor-Toro, J. A., Benitez, T., Llobell, A. & Romero, L. C. A novel endo- β -1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.* **177**, 6937–6945 (1995).
164. Adams, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology.* **150**, 2029–2035 (2004).
165. De la Cruz, J., Pintor-Toro, J. A., Benítez, T. & Llobell, A. Purification and characterization of an endo-beta-1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *J. Bacteriol.* **177**, 1864–1871 (1995).
166. Smitha, C., Finosh, G. T., Rajesh, R. & Abraham, P. K. Induction of hydrolytic enzymes of phytopathogenic fungi in response to *Trichoderma viride* influence biocontrol activity. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **3**, 1207–1217 (2014).
167. Da Mota, P. R. *et al.* Expression analysis of the α -1,2-mannosidase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Biol. Control.* **95**, 1–4 (2016).
168. Elad, Y. & Kapat, A. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* **105**, 177–189 (1999).
169. Saravanakumar, K. *et al.* Effect of *Trichoderma harzianum* on maize rhizosphere microbiome and biocontrol of *Fusarium Stalk rot*. *Sci. Rep.* **7**, 1771 (2017).
170. S Nosir, W. *Trichoderma harzianum* as a growth promoter and bio-control agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi*. *Adv. Crop Sci. Technol.* **4**, 2–8 (2016).
171. Vinale, F. *et al.* A novel fungal metabolite with beneficial properties for agricultural applications. *Molecules.* **19**, 9760–9772 (2014).
172. Papavizas, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* **23**, 23–54 (1985).

173. Brunner, K. *et al.* Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Am. Soc. Microbiol.* **71**, 3959–3965 (2005).
174. Kandula, D. R. W., Jones, E. E., Stewart, A., McLean, K. L. & Hampton, J. G. *Trichoderma* species for biocontrol of soil-borne plant pathogens of pasture species. *Biocontrol Sci. Technol.* **25**, 1052–1069 (2015).
175. Hermosa, R., L. Woo, S., Lorito, M. & Monte, E. Proteomic approaches to understand *Trichoderma* biocontrol mechanisms and plant interactions. *Curr. Proteomics.* **7**, 298–305 (2010).
176. Hölker, U., Dohse, J. & Höfer, M. Extracellular laccases in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*. *Folia Microbiol.* **47**, 423–7 (2002).
177. Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krska, R. & Schuhmacher, R. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *J. Microbiol. Methods.* **81**, 187–193 (2010).
178. Gacitúa A, S. *et al.* Identification and biological characterization of isolates with activity inhibitive against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Chil. J. Agric. Res.* **69**, 526–533 (2009).
179. Calvo, J., Calvente, V., de Orellano, M. E., Benuzzi, D. & Sanz de Tosetti, M. I. Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. *Int. J. Food Microbiol.* **113**, 251–257 (2007).
180. Adekunle, A. T., Cardwell, K. F., Florini, D. A. & Ikotun, T. Seed treatment with *Trichoderma* species for control of damping-off of cowpea caused by *Macrophomina phaseolina*. *Biocontrol Sci. Technol.* **11**, 449–457 (2001).

181. Singh, N., Pandey, P., Dubey, R. C. & Maheshwari, D. K. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 1669–1679 (2008).
182. Dennis, C. & Webster, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **57**, 363–369 (1971).
183. Bharat Rai, V. N. S. and D. B. S. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. *Plant Soil.* **57**, 131–135 (1980).
184. Lima Fernanda. Secretômica de *Trichoderma atroviride* e *Trichoderma harzianum* frente a *Guignardia citricarpa*, agente etiológico da pinta preta dos citros. (Universidade de Caxias do Sul, 2016).
185. Ramezani, H. Biological control of root-rot of eggplant caused by *Macrophomina phaseolina*. *Am. J Agric Env. Sci.* **4**, 218–220 (2008).
186. Aarti, T. & Meenu, S. Role of volatile metabolites from *T. citrinoviride* in biocontrol of phytopathogens. *Int. J. Res. Chem. Environ.* **5**, 86–95 (2015).