

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

**Análise da interação entre *Phaseolus vulgaris*, *Trichoderma harzianum* ALL 42 e os fungos fitopatogênicos *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani***

**JACKELINE LEITE PEREIRA**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor.**

**Análise da interação entre *Phaseolus vulgaris*, *Trichoderma harzianum* ALL 42 e os fungos fitopatogênicos *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani***

**JACKELINE LEITE PEREIRA**

**Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa**

**Co-Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Eliane Ferreira Noronha**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor.

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

## **BANCA EXAMINADORA**

- ✓ Prof<sup>o</sup> Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho – Departamento de Biologia Celular/  
Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília.
  
- ✓ Prof<sup>o</sup> Dr. Robert Neil Gerard Miller – Departamento de Biologia Celular/  
Laboratório de Microbiologia da Universidade de Brasília.
  
- ✓ Prof<sup>o</sup> Dr. Lúcio Flávio de Alencar Figueiredo - Departamento de Botânica/  
Laboratório de Botânica da Universidade de Brasília.
  
- ✓ Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Valdirene Neves Monteiro – Departamento de Ciências exatas e  
tecnológicas / Universidade Estadual de Goiás.

### **Suplente:**

- ✓ Prof<sup>o</sup> Dr. Carlos Roberto Félix - Departamento de Biologia Celular/ Laboratório de  
Enzimologia da Universidade de Brasília.

**Orientador:** Prof. Dr. Cirano José Ulhoa – Coordenador do Instituto de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de Goiás / Laboratório de Enzimologia.

**Co-Orientadora:** Profa. Dr<sup>a</sup>. Eliane Ferreira Noronha - Departamento de Biologia  
Celular/ Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília.

10 de Dezembro de 2012

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

*Ao meu amado Carlos Eduardo Pavin;*

*Aos meus filhos Caroline e Théo;*

*Aos meus pais Leilma e Vitor.*

*Amor incondicional, alicerce da minha força!*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais, Leilma e Vitor, pelo apoio em todas as minhas decisões;

Ao meu querido e sempre amado Carlos Eduardo Pavin pelo apoio, auxílio e compreensão em todos os momentos;

Aos meus filhos Caroline e Théo por serem o motivo dessa caminhada e me ensinarem o significado do amor incondicional.

À Suely Pavin (*in memoriam*) e Antônio José Pavin pelo grande apoio prestado e por me acolherem sempre;

A, Brenda Rabello, Karen Ofuji, Liana Blume, Leonora Rios, Paula Jaramillo e Priscila Lima, pelos momentos de descontração, apoio, amizade e companheirismo no laboratório.

A Dra. Eliane Noronha por todos os anos empenhados e paciência assumida.

Ao Dr. Cirano Ulhoa, por toda sabedoria, apoio e respeito;

Ao Prof<sup>o</sup> Ruy Caldas e prof<sup>o</sup> Roberto Félix, ícones de grandes exemplos de como ser pesquisador;

Ao Roberto e a Valdirene, pelo apoio prestado até para lavarem plantas de feijão;

Ao Andrei Stecca e Marcelo Ramada, pela ajuda em análises cruciais;

A Francilene Lopes e Cristina Dias pelo grande auxílio prestado;

Ao Rayner Myr, pelo auxílio em espectrometria;

Ao Dr. Marsollais, por gentilmente ceder o banco de dados de feijoeiro;

À Marisia e Margareth pelo apoio técnico;

Ao CNPq, pelo financiamento.

A todos que contribuíram de alguma forma para a execução desta pesquisa.

**JACKELINE LEITE PEREIRA**

---

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>O feijoeiro comum</b>	<b>12</b>
<b>O cultivo de feijoeiro</b>	<b>13</b>
<b>Doenças que afetam o cultivo de feijoeiro</b>	<b>14</b>
<b>Podridão radicular</b>	<b>16</b>
<b>Controle de doenças fúngicas</b>	<b>18</b>
Desenvolvimento de cultivares resistentes	20
Controle biológico	21
Interação microrganismos não patogênicos e plantas	25
Interação Trichoderma-plantas hospedeiras	27
Promoção de crescimento da planta	27
Indução de resposta de defesa nas plantas por Trichoderma spp.	28
Mecanismos de defesa em plantas	33
Resposta hipersensitiva (HR)	33
Resistência Sistêmica Induzida (RSI) e Resistência Sistêmica Adquirida (RSA)	34
Indutores de resistência	34
RSI e RSA	35
Proteínas de resposta de defesa (PR-proteínas)	37
Espécies reativas de oxigênio	40
<b>OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
Objetivo geral	43
Objetivos específicos	43
<b>METODOLOGIA</b>	<b>44</b>
Cultivo e manutenção dos microrganismos	44
Análises da promoção de crescimento por <i>T. harzianum</i> ALL 42	44
Preparo de <i>T. harzianum</i> para inóculo nas sementes de feijoeiro	44
Plantio das sementes de feijoeiro e coleta das plantas	45
Análise da produção de enzimas e expressão de genes de resposta de defesa na presença de <i>T. harzianum</i> ALL 42 e os fitopatógenos	<b>46</b>
<i>Preparo dos fungos fitopatogênicos para infestação do solo</i>	46
<i>Preparo do solo para infestação com os fitopatógenos</i>	47
<i>Processamento e extração de proteínas</i>	48
<i>Quantificação de proteínas totais para atividade enzimática</i>	48
<i>Quantificação da atividade de enzimas de defesa</i>	48

## JACKELINE LEITE PEREIRA

---

<i>Quitinases</i>	48
<i>Peroxidases</i>	49
<i><math>\beta</math>-1,3 glucanases</i>	49
Análise da expressão de genes de defesa de feijoeiro	49
Análises da expressão de proteínas de folhas e raízes de feijoeiro na presença/ausência de <i>T. harzianum</i> ALL 42, <i>F. solani</i> e <i>R. solani</i> .	<b>52</b>
Extração de proteínas e eletroforese bidimensional	52
Eletroforese bidimensional	53
Análise dos mapas proteicos	54
Identificação das proteínas selecionadas por espectrometria de massa	<b>55</b>
Digestão trípica dos “spots”	55
Espectrometria de massa em MALDI/ToF	55
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>57</b>
Análises da promoção de crescimento por <i>T. harzianum</i> ALL 42	57
Avaliação da produção de enzimas de defesa	60
Análise da expressão de genes de defesa de feijoeiro	64
Análise proteômica da interação Planta/ <i>Trichoderma</i> / Fitopatógenos	68
Proteínas identificadas a partir dos mapas de folhas de feijoeiro	75
<i>Metabolismo</i>	75
<i>Resposta de defesa</i>	79
<i>Metabolismo e síntese de ATP</i>	82
<i>Resposta de defesa, metabolismo secundário e estresse oxidativo</i>	84
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>103</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>105</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Podridão radicular causada por *R. solani* em feijoeiro após 14 dias de cultivo em solo infestado. Em A, planta saudável e em B a seta indicando os sintomas causados por *R. solani*. **17**
- Figura 2:** Podridão radicular seca causada por *F. solani* em feijoeiro após 14 dias de cultivo em solo infestado. Em A, planta saudável e em B a seta indicando os sintomas causados por *F. solani*. **18**
- Figura 3:** Esquema demonstrando a indução de resposta de defesa em feijoeiro por *Trichoderma* sp. (RSI). (P): patógeno; (T): *Trichoderma* sp, IAA: ácido indol acético, AJ: ácido jasmônico, AS: ácido salicílico, ET: etileno. (baseado em Harman *et al.*, 2004 e Hermosa *et al.*, 2012). **32**
- Figura 4:** Exemplo de resposta hipersensiva em folha de feijoeiro. **34**
- Figura 5:** Rotas de RSA e RSI ativadas por microrganismos patogênicos e não patogênicos em plantas, através das moléculas sinalizadoras AS (ácido salicílico), AJ (ácido jasmônico) e ET (etileno). **37**
- Figura 6:** Possíveis componentes envolvidos na geração de espécies ativas de oxigênio e seus efeitos sobre o patógeno ou sobre a ativação de mecanismos de defesa das plantas **42**
- Figura 7:** Esquema mostrando a etapa de análise de promoção de crescimento das plantas de feijoeiro e ALL 42. **46**
- Figura 8:** Esquema mostrando o delineamento do experimento para análise da produção de enzimas de defesa quando *T. harzianum* ALL 42, *F. solani* e *R. solani* presentes. **47**
- Figura 9:** Esquema mostrando as etapas de análise da expressão de genes feitas para raízes de feijoeiro nas 6 condições descritas. TT: controle, 42T, planta + ALL 42, 42FS: Planta+ALL42+*F. solani*, 42RS: Planta+ALL42+*R. solani*, RS: Planta + *R. solani*, FS: Planta ++ *F. solani*. **50**
- Figura 10:** Esquema mostrando o delineamento do experimento para análise da expressão de proteínas por eletroforese 2DE na presença/ausência de *T. harzianum* ALL 42, *F. solani* e *R. solani*. **52**
- Figura 11:** Plantas de feijoeiro cultivadas na ausência (TT) e na presença do isolado de *T. harzianum* ALL 42 (42T) em A e registro dos volumes das raízes em B. **58**
- Figura 12:** Atividades de Quitinases (A),  $\beta$  1,3 glucanases (B) e Peroxidases (C) em folha de feijoeiro nas condições TT (controle); 42T (Planta+ ALL 42); 42FS (Planta + ALL 42+ *F. solani*); 42RS (Planta + ALL 42 + *R. solani*); FS (Planta + *F. solani*) e RS (planta + *R. solani*) **62**
- Figura 13:** Atividades de Quitinases (A),  $\beta$  1,3 glucanases (B) e Peroxidases (C) em raiz de feijoeiro nas condições TT (controle); 42T (Planta+ ALL 42); 42FS (Planta + ALL 42+ *F. solani*); 42RS (Planta + ALL 42 + *R. solani*); FS (Planta + *F. solani*) e RS (Planta + *R. solani*) **63**
- Figura 14:** Análises da expressão dos genes CHT1, GLUC, PRX e LOX1 utilizando RT-qPCR em amostras de raízes de feijoeiro comum cultivado por 7, 14 e 21 dias na ausência ou presença do isolado de *Trichoderma* e dos fungos fitopatogênicos *R. solani* e *F. solani* nas condições TT: planta; 42T: planta + ALL42; 42FS: planta+ALL42+ *F. solani*; 42RS: planta+ ALL42 + *R. solani*; FS: Planta+ *F. solani* e RS: Planta + *R. solani*. **67**
- Figura 15:** Mapas de referência de folhas de feijoeiro, após 21 dias de infecção, utilizados para as análises de expressão diferencial. Em A, planta controle; B: planta na presença de ALL-42; C: Planta+ ALL 42 + *F. solani* e D: Planta + ALL-42+ *R. solani*. **70**
- Figura 16:** Mapas de referência de raiz de feijoeiro, após 21 dias de infecção, utilizados para as análises de expressão diferencial. Em A, planta controle; B: planta na presença de ALL-42; C: Planta+ ALL 42 + *F. solani* e D: Planta + ALL-42+ *R. solani*. **71**
- Figura 17:** Diagrama de Venn mostrando o número total de "spots" detectados em (A) folha e (B) raiz de feijoeiro nas condições TT, 42T, 42FS e 42RS, bem como os "spots" em comum, mas com expressão diferencial entre as condições e validadas por ANOVA, considerando  $p \leq 0,05$ . **72**
- Figura 18:** Diagrama de Venn mostrando o de "spots" exclusivos de (A) folha e (B) raiz, entre as condições TT, 42T, 42FS e 42RS e validadas por ANOVA, considerando  $p \leq 0,05$ . **72**
- Figura 19:** Categorização funcional das proteínas identificadas em folhas (A) e raiz (B) de feijoeiro **74**



## JACKELINE LEITE PEREIRA

---

<b>Figura 20:</b> Proteínas identificadas em folha de feijoeiro nas condições TT, 42T, 42FS e 42RS, relacionadas ao metabolismo.	<b>78</b>
<b>Figura 21:</b> Proteínas identificadas em folha de feijoeiro nas condições TT, 42T, 42FS e 42RS, relacionadas à resposta de defesa.	<b>81</b>
<b>Figura 22:</b> Proteínas identificadas na raiz de feijoeiro nas condições TT, 42T, 42FS e 42RS relacionadas ao metabolismo. R27: frutoquinase; R31: gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase.	<b>82</b>
<b>Figura 23:</b> Proteínas identificadas na raiz de feijoeiro nas condições TT, 42T, 42FS e 42RS, relacionadas à síntese de ATP. Spot R11: Proteína-like kinase SG5-3b.	<b>83</b>
<b>Figura 24:</b> Proteínas identificadas na raiz de feijoeiro nas condições TT, 42T, 42FS e 42RS. R20 e R21: 14-3-3 like proteína, relacionadas à defesa de plantas.	<b>85</b>
<b>Figura 25:</b> Proteínas identificadas na raiz de feijoeiro nas condições TT, 42T, 42FS e 42RS. R10: chalcona isomerase e R12: isoflavona redutase, envolvidas no metabolismo secundário e resposta de defesa.	<b>85</b>
<b>Figura 26:</b> Proteínas identificadas na raiz de feijoeiro nas condições TT, 42T, 42FS e 42RS. R40 e R41: PR1 like proteína, relacionadas à resposta de defesa.	<b>88</b>
<b>Figura 27:</b> Proteínas identificadas na raiz de feijoeiro nas condições TT, 42T, 42FS e 42RS. Spots R8 e R22: isoformas de Glutathione S-Transferase, relacionadas a explosão oxidativa e resposta de defesa.	<b>90</b>
<b>Figura 28:</b> Spots identificados na raiz de feijoeiro, analisados nas 4 condições de trabalho (TT, 42T, 42FS e 42RS) que atuam na resposta oxidativa. Spot R17: peroxirredoxina, spot R28: monodehidroascorbato redutase e spot R36: nucleoredoxina.	<b>91</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Alguns microrganismos indutores de resposta de defesa em plantas e responsáveis pela resistência a diferentes patógenos. Modificado de Van Loon <i>et al.</i> , 2008; Harman <i>et al.</i> , 2008.	<b>26</b>
<b>Tabela 2:</b> Lista de nucleotídeos utilizados para RT-qPCR.	<b>51</b>
<b>Tabela 3:</b> Avaliação do tamanho, área foliar e volume de raízes de feijoeiro comum após crescimento por 21 dias na presença ou ausência do isolado de <i>T. harzianum</i> ALL-42.	<b>57</b>
<b>Tabela 4:</b> Proteínas identificadas de folha de feijoeiro.	<b>94</b>
<b>Tabela 5:</b> Proteínas identificadas de raiz de feijoeiro.	<b>98</b>

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo analisar a interação entre o fungo *Trichoderma harzianum* ALL-42 isolado de solo do Cerrado e *Phaseolus vulgaris*, na presença ou ausência dos fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani*. Foram avaliadas as capacidades de *T. harzianum* de promover o crescimento, bem como de modular a resposta de defesa e alterar o padrão de expressão de proteínas na planta hospedeira, *P. vulgaris*. Os feijoeiros cultivados na presença deste isolado mostraram um aumento significativo de 14,29% no tamanho, 17,72% na área foliar e 36,31% no volume radicular, quando comparados às plantas controle. Análises da produção de enzimas relacionadas à resposta de defesa vegetal em folhas e raízes das plantas mostraram que os valores mais significativos de atividade de quitinases em folhas e raízes de feijoeiro, foram detectadas para as plantas cuja interação envolvia o fungo micoparasita *T. harzianum* e um dos fungos fitopatogênicos, *R. solani* ou *F. solani*. Para  $\beta$  1,3 glucanases, os valores de atividade mais significativos foram detectados em folhas, após 7 dias de cultivo na presença do fungo fitopatogênico *R. solani* e em raízes, após 14 dias, nesta mesma condição. Valores aumentados da atividade de peroxidases foram detectados nas folhas de plantas cultivadas por 14 dias na presença do isolado de *Trichoderma* e do fungo fitopatogênico *R. solani*. Em raízes o aumento nesta atividade foi detectado nas plantas cultivadas apenas na presença do isolado de *Trichoderma*. A presença do isolado de *Trichoderma* e dos fungos fitopatogênicos alterou o padrão de expressão dos genes CHT1, GLU, POD6 e LOX1 codificadores de proteínas de defesa, principalmente após 14 e 21 dias de crescimento. Além disto, a presença destes fungos alterou o padrão de expressão de proteínas em folhas e raízes de feijoeiro. Dos “spots” diferencialmente expressos, 80 foram selecionados para identificação por espectrometria de massas utilizando “Peptide Mass Fingerprint”, sendo que 29 dos identificados foram retirados de mapas proteômicos de raízes, e 19 de mapas proteômicos de folhas. As proteínas identificadas em sua maioria tem papel na resposta de defesa de plantas, a exemplo da glutathione S – transferase, Cinamoil CoA redutase, serina-treonina quinase, chalcona isomerase, peroxirredoxina, proteínas da família PR-1, e no metabolismo de carboidratos, como, subunidades da Rubisco, anidrase carbônica e gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase. Estes resultados sugerem que o isolado de *T. harzianum* ALL-42 é capaz de promover mudanças no metabolismo da planta, e desencadear ou potencializar a resposta de defesa em feijoeiro comum, quando *R. solani* e *F. solani* estão presentes.

## ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the interaction between the fungus *Trichoderma harzianum* ALL-42, which was isolated from the soil of the “Cerrado” biome, and *Phaseolus vulgaris* in the presence or absence of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. The growth-promoting capacities of *T. harzianum* were evaluated, as well as its ability to modulate the defense response and alter the protein expression pattern in the host plant *P. vulgaris*. Bean plants cultivated in the presence of this isolate showed a significant increase of 14.29% in size, 17.72% in leaf area, and 36.31% in root volume when compared with control plants. Analysis of enzyme production related to the plant defense response in the leaves and roots of the plants showed that the most significant values for kinase activity in the leaves and roots of bean plants were detected for those in which there was an interaction between the microparasitic fungus *T. harzianum* and one of the phytopathogenic fungi *R. solani* or *F. solani*. The most significant values for  $\beta$ -1,3-glucanase activity were detected in the leaves after 7 days of cultivation in the presence of the phytopathogenic fungus *R. solani* and in the roots after 14 days under the same conditions. Increased values were detected for peroxidase activity in the leaves of plants cultivated for 14 days in the presence of the isolate of *Trichoderma* and the phytopathogenic fungus *R. solani*. In the roots, an increase in this activity was detected in plants cultivated only in the presence of the isolate of *Trichoderma*. The presence of the isolate of *Trichoderma* and the phytopathogenic fungi altered the expression pattern of the genes CHT1, GLU, POD6, and LOX1 that code for defense proteins, particularly after 14 and 21 days of growth. Furthermore, the presence of these fungi altered the protein expression pattern in the roots and leaves of bean plants. Of the differentially expressed spots, 80 were selected for identification by mass spectrometry using peptide mass fingerprinting. Of those identified, 29 were taken from proteomic maps of the roots and 19 from proteomic maps of the leaves. The majority of the identified proteins play a role in the defense response of the plants, e.g., glutathione S-transferase, cinnamoyl-CoA-reductase, serine-threonine kinase, chalcone isomerase, peroxiredoxin, and proteins of the PR-1 family, and in the metabolism of carbohydrates, such as subunits of Rubisco, carbonic anhydrase, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. These results suggest that the ALL-42 isolate of *T. harzianum* is capable of promoting changes in the metabolism of the plant and triggering or potentiating the defense response in the common bean plant when *R. solani* and *F. solani* are present.

## INTRODUÇÃO

### O feijoeiro comum

O gênero *Phaseolus* inclui cerca de 55 espécies, das quais cinco são cultivadas, *Phaseolus vulgaris* - o feijoeiro comum, *Phaseolus lunatus* - o feijão de Lima, *Phaseolus coccineus* - o feijão Ayocote, *Phaseolus acutifolius* - o feijão Tepari e *Phaseolus polyanthus* (BROUGHTON *et al.*, 2003).

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L., Fabacea) é originário do continente americano, no entanto este é um assunto ainda controverso entre pesquisadores. Existem diferentes hipóteses que tentam explicar não somente a origem desta planta, como também o início de sua utilização como uma cultura doméstica. Algumas evidências reforçam a hipótese de que o centro de origem da planta e sua domesticação como cultura teriam ocorrido na região da Mesoamérica, por volta de 7000 anos a.C., uma vez que cultivares selvagens, similares à variedades crioulas, foram encontrados nessa região, mais especificamente no México. Supõe-se que a partir dessa região, a cultura teria, posteriormente sido disseminada para toda a América do Sul (CFI- Centro de Inteligência do Feijão, 2008).

O feijoeiro comum é uma espécie diplóide ( $2n = 22$ ) com um genoma relativamente pequeno, contendo 0,66 picogramas de DNA por genoma haploide, o que equivale a  $6,33 \times 10^8$  pares de nucleotídeos (ARUMUGANATHAN e EARLE, 1991). Seu desenvolvimento compreende duas fases distintas, denominadas de fases vegetativa e reprodutiva. A fase vegetativa compreende o desenvolvimento da planta desde germinação até o aparecimento dos primeiros botões florais. A fase reprodutiva compreende desde a emissão dos botões florais até o pleno enchimento de vagens e a maturação das sementes. A germinação ocorre após a absorção de água pela semente, aproximadamente no 5º dia de plantio, sendo caracterizada pelo aparecimento da radícula (geralmente pelo lado do hilo). Esta é seguida pela etapa de desenvolvimento denominada emergência que ocorre aproximadamente no 8º dia de cultivo e é caracterizada pelo desdobramento da alça do hipocótilo e sua presença acima da superfície do solo. Em seguida, o epicótilo alonga-se, as folhas

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

primárias se expandem (aproximadamente no 12º dia), seguidas pela expansão das folhas trifoliadas (aproximadamente no 19º dia), nesta fase, os cotilédones encontram-se em fase final de exaustão das reservas estocadas, ou seja, sofre senescência causada pela queda na taxa de respiração, resultando no processo de abscisão. A partir desta etapa de desenvolvimento a planta passa a depender dos nutrientes do solo (aproximadamente no 25º - 30º dias) (FERNANDEZ & LOPES, 1986). Seu estágio reprodutivo é caracterizado pelas fases de florescimento (aprox. 34º dia), formação (aprox. 39º dia), enchimento (aprox. 48º dia), e maturação das vagens (aprox. 60º dia) (FERNANDEZ & LOPES, 1986).

### **O cultivo de feijoeiro**

Esta leguminosa representa uma das mais importantes fontes de proteínas, especialmente para a população de baixa renda na América Latina, no Sul e Oeste da África (TORRES *et al.*, 2009). Desta forma, é um produto agrícola de grande importância sócio-econômica no Brasil. Sua importância decorre da área efetivamente cultivada, volume e valor de produção, geração de mão-de-obra, e principalmente, pelo fato de ser uma das fontes primárias de proteína e energia na alimentação da população brasileira (MAPA, 2011). O grão do feijoeiro comum é consumido em praticamente todo o país, e por isto representa 52% da área nacional cultivada para sua produção (MAPA, 2011).

No cenário mundial, o feijoeiro comum, também é a espécie mais cultivada entre as demais do gênero *Phaseolus*. Considerando somente este gênero, os seis principais países produtores de feijões secos, que juntos são responsáveis por cerca de 61% da produção mundial, são: Brasil, Índia, Mianmar, China, EUA e México.

Desde 2010, o Brasil é considerado o maior produtor mundial de feijão (FAO, 2012). Em nível nacional, os estados do Paraná, Minas Gerais, Bahia, São Paulo e Goiás são os maiores produtores. No ano de 2009, o estado de Minas Gerais, produziu um volume aproximado de 577,7 mil toneladas de feijão, ficando apenas atrás do Paraná, com 664,3 mil toneladas (SEAPA, 2010).

O feijão tem uma taxa anual de aumento projetado em 1,3% e consumo ao redor de 1,1% ao ano para o período 2011/2012 a 2021/2022. Neste último ano da

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

projeção, a produção esperada para o país é de quatro milhões de toneladas (MAPA, 2012).

É uma planta exigente em nutrientes, muito sensível a fatores climáticos extremos como umidade alta ou baixa do solo, bem como altas ou baixas temperaturas. Desta forma, a viabilidade econômica da produção de feijão depende da utilização de alta tecnologia, de cultivares melhoradas, do preparo adequado do solo, do controle efetivo de pragas e doenças, bem como de técnicas avançadas de irrigação (PORTES, 1996).

### **Doenças que afetam o cultivo de feijoeiro**

O feijoeiro é suscetível a diferentes tipos de patógenos que levam ao desenvolvimento de doenças, podendo depreciar a qualidade do produto final e por fim diminuindo sua produtividade. Desta forma, a ocorrência de doenças em lavouras de feijão no Brasil gera uma queda na lucratividade dos produtores e redução na produção, impactando no atendimento da demanda dos mercados interno e externo. Já foram notificadas nesta cultura doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides (NAKAHARA *et al.*, 2011; HAGGAG & EL-GAMAL, 2012; TRAPIELLO & GONZÁLEZ, 2012; WESEMAEL & MOENS, 2012).

No Brasil, doenças do sistema radicular são relatadas em praticamente todas as regiões de cultivo, com intensidade variando em função do inóculo presente na área, da suscetibilidade da cultivar, das condições climáticas e de práticas de manejo do solo (ZAMBOLIM *et al.*, 1997). Os fungos *Fusarium solani* (Mart.) Appel & Wollenv. f.sp. *phaseoli* (Burk.) Snyder & Hans, *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *phaseoli* (Kendrick & Snyder), *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., e *Rhizoctonia solani* (Kuhn) são relatados como principais patógenos radiculares em feijoeiro comum (ZAMBOLIM *et al.*, 1997; BIANCHINI *et al.*, 2005). No Rio Grande do Sul, a rizoctoniose, causada por *R. solani* tem sido relatada como doença predominante (CASA *et al.*, 2011).

Entre as doenças bacterianas, merecem destaque, por sua importância, o crestamento bacteriano comum e a murcha-de-curtobacterium identificada em

JACKELINE LEITE PEREIRA

culturas de feijão no Estado de São Paulo. As viroses mais comumente observadas são o mosaico comum (BCMV) e o mosaico dourado (BGMV) (SARTORATO, 1996; TRAPIELLO & GONZÁLEZ, 2012). Este grupo de patógenos se caracteriza por causar doença no sistema radicular ou até mesmo na parte aérea das plantas. No Quadro 1, são sistematizadas as principais doenças de feijoeiro e seus agentes causais.

**Quadro 1:** Principais doenças do feijoeiro comum que ocorrem no Brasil central e seus agentes causais. Fonte: Sartorato, 1996.

DOENÇA	AGENTE CAUSAL
<b>DOENÇAS INCITADAS POR FUNGOS QUE SOBREVIVEM NA PARTE AÉREA</b>	
Antracnose	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>
Ferrugem	<i>Uromyces appendiculatus</i>
Mancha angular	<i>Phaeoisariopsis griseola</i>
Mancha de alternária	<i>Alternaria</i> spp.
Mancha de ascoquita	<i>Ascochita</i> spp.
Oídio	<i>Erysiphe polygoni</i>
Sarna	<i>Colletotrichum dematium</i> f. <i>truncata</i>
<b>DOENÇAS INCITADAS POR FUNGOS QUE SOBREVIVEM NO SOLO</b>	
Mela ou Murcha da teia micélica	<i>Rhizoctonia solani</i> ( <i>Thanatephorus cucumeris</i> )
Mofa branco	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Murcha de fusário	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>
Podridão cinzenta do caule	<i>Macrophomina phaseolina</i>
Podridão do colo	<i>Sclerotium rolfsii</i>
Podridão radicular de rizoctonia	<i>Rhizoctonia solani</i>
Podridão radicular seca	<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>phaseoli</i>
<b>DOENÇAS INCITADAS POR BACTÉRIA</b>	
Crestamento bacteriano comum	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>
Murcha de curtobacterium	<i>Curtobacterium</i> <i>laccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>
<b>DOENÇAS INCITADAS POR VÍRUS</b>	
Mosaico comum	<i>Bean common mosaic virus</i>
Mosaico dourado	<i>Bean golden mosaic virus</i>
<b>DOENÇAS INCITADAS POR NEMATÓIDES</b>	
Nematóide das galhas	<i>Meloidogyne javanica</i>
	<i>Meloidogyne incognita</i>
Nematóides das lesões	<i>Pratylenchus brachyurus</i>
<b>OUTRAS DOENÇAS</b>	
Carvão	<i>Microbotryum phaseoli</i> n. sp.
Ferrugem asiática	<i>Phakopsora pachyrhizi</i>
Fogo selvagem	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>

### ***Podridão radicular***

As podridões radiculares do feijoeiro causadas por diferentes espécies de fungos presentes no solo brasileiro são as principais doenças desta cultura, causando redução na produção de grãos e perda de vigor das plântulas. Atualmente as maiores perdas na produtividade de grãos nas áreas irrigadas do Sudeste e Centro-Oeste brasileiros, são atribuídas às infecções causadas por *R. solani* e *F. solani* f. sp. *phaseoli*, sendo que a sua incidência tem aumentado de forma considerável em função de técnicas de manejo inadequadas, como o uso de sementes de má-qualidade, irrigação excessiva e com água de má qualidade e a não realização de rotação de culturas (MARINO *et al.*, 2008).

#### Podridão radicular causada por *Rhizoctonia solani*

O fungo *R. solani* Kuhn, é frequentemente encontrado em quase todas as regiões de cultivo de feijão no Brasil e facilmente disseminado via sementes (RODRIGUES *et al.*, 2002).

Dentre os sintomas da doença causada por *R. solani*, destacam-se: atraso no desenvolvimento da planta hospedeira, deformação e descoloração dos caules, necrose do tecido vascular (Figura 1) e pigmentações púrpuras nas folhas. O sintoma característico de infestação por *R. solani* é o aparecimento de lesões pardo avermelhadas ou necróticas, com bordas bem delimitadas nas raízes pivotantes (Figura 1). O tombamento da planta ocorre após a 3ª semana de plantio (TOLEDO-SOUZA, *et al.*, 2009). O desenvolvimento da doença causada por *R. solani*, é favorecido pela combinação de temperatura (> 35 °C) e umidade relativa do ar elevadas (> 80%) bem como pela alta frequência e quantidade de chuvas. As principais características deste patógeno que permitem sua permanência no solo de áreas de cultivo por longos períodos são a capacidade de sobreviver no solo, através de estruturas de resistência (microescleródios), saprofitismo e ampla gama



JACKELINE LEITE PEREIRA

de hospedeiros cultiváveis ou não. O controle desta doença é difícil, de alto custo e inviabiliza o cultivo de feijoeiro, principalmente em áreas irrigadas pelo sistema do pivô central (TOLEDO-SOUZA, *et al.*, 2009).



**Figura 1:** Podridão radicular causada por *R. solani* em feijoeiro após 14 dias de cultivo em solo infestado. Em **A**, planta saudável e em **B** a seta indicando os sintomas causados por *R. solani*.

#### Podridão radicular causada por *Fusarium solani*

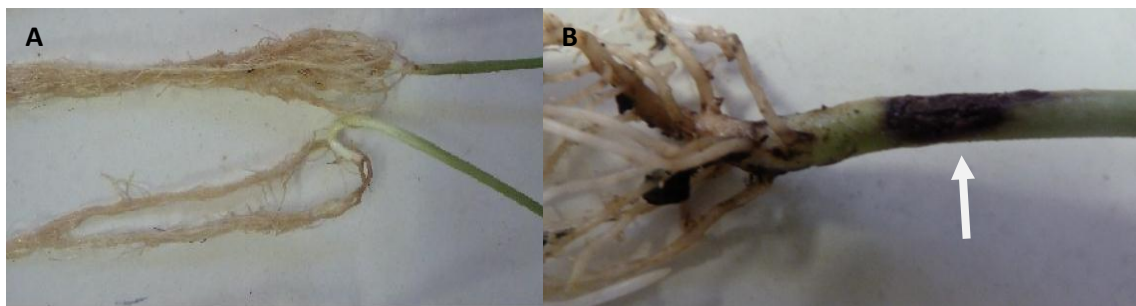
O fungo fitopatogênico *F. solani*, é um fungo de solo que apresenta variação em sua morfologia, fisiologia e patogenicidade, além de possuir um grande número de hospedeiros. Esse fungo é encontrado em quase todas as regiões produtoras do Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Esta espécie sobrevive no solo infestado na forma de clamidósporos por vários anos, e sua principal via de dispersão são os macronídios e micronídios produzidos em grande quantidade nas superfícies das plantas infectadas (BERNI *et al.*, 2002). A sua disseminação se dá por meio de sementes e solo contaminados, assim como pela enxurrada.

Dentre os sintomas da doença causada pelo fungo *F. solani*, destacam-se: o aparecimento de estrias longitudinais de coloração avermelhada no hipocótilo e raiz primária de plântulas jovens. Assim como, lesões avermelhadas, de formato irregular, que podem coalescer com o desenvolvimento da doença, tornando-se marrons, sem margens definidas e estendendo-se até a superfície do solo (Figura 2). Na raiz primária são observadas fissuras longitudinais que se tornam necróticas e

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

afetam as células do córtex. As raízes secundárias são geralmente destruídas, podendo haver o desenvolvimento de raízes adventícias acima da área lesionada. Quando a planta hospedeira consegue desenvolver novas raízes, a produtividade é pouco afetada. No entanto, quando o crescimento das raízes é limitado, o patógeno pode destruir todo o sistema radicular (MIRANDA *et al.*, 2007). O resultado é um estande irregular, formado por plantas subdesenvolvidas, com as folhas prematuramente senescentes (NECHET & VIEIRA, 2006). O desenvolvimento da doença é favorecido por temperaturas em torno de 22°C e em solos compactados (ABREU, 2005).



**Figura 2:** Podridão radicular seca causada por *F. solani* em feijoeiro após 14 dias de cultivo em solo infestado. Em **A**, planta saudável e em **B** a seta indicando os sintomas causados por *F. solani*.

### Controle de doenças fúngicas

As medidas de controle de fungos fitopatogênicos mundialmente utilizadas ainda são as práticas agrícolas tradicionais como as queimadas (eliminação do excesso de resíduos pós-colheita), drenagem do solo, rotação de culturas, plantio de cultivares resistentes, e aplicação de fungicidas (ABREU, 2005). Essas medidas nem sempre são totalmente eficientes, principalmente em relação à taxa de sobrevivência de formas resistentes dos patógenos de solo em condições ambientais adversas, além da sua permanência em outras plantas hospedeiras, funcionando como reservatório (PUNJA E UTKHEDE, 2003).

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

Além disto, visando a prevenção de sua ocorrência, tem-se feito o uso de sementes sadias e tratadas com fungicidas. Em áreas infectadas, a rotação com gramíneas, no mínimo por cinco anos, propicia a redução do inóculo do patógeno. O controle da doença é também favorecido pelo plantio em áreas bem drenadas e a utilização de menor densidade de semeadura. Atenção especial deve ser dada ao plantio realizado em áreas onde foi cultivado *Zea mays* para silagem, pois normalmente ocorre a compactação do solo (ABREU, 2005; CARVALHO *et al.*, 2011).

A partir da década de 50, quando se iniciou a chamada “Revolução Verde”, foi possível observar profundas mudanças no processo tradicional de produção agrícola, bem como os impactos dessa atividade sobre o ambiente e a saúde humana (RIBAS & MATSUMURA, 2009). A perda de produtividade causada pela ocorrência de pragas e patógenos foi, portanto compensada através da utilização de agrotóxicos. Deste modo, o agrotóxico dentro do sistema de produção rural atual pode ser considerado como questão de sobrevivência para o produtor (VEIGA, 2007). Anualmente são utilizados no mundo aproximadamente 2,5 milhões de toneladas de agrotóxicos. No Brasil, o consumo anual tem sido superior a 300 mil toneladas, (SPADOTTO & GOMES, 2011) tornando o país, o maior mercado mundial destes compostos no ano de 2010.

Os agrotóxicos da classe dos fungicidas são substâncias químicas, de origem natural ou sintética que, aplicadas às plantas, protegem-nas da penetração e/ou do posterior desenvolvimento de fungos patogênicos em seus tecidos ao atrasar, inibir ou eliminar o seu crescimento. O controle químico de doenças fúngicas, apesar de ser eficiente, é um processo oneroso, e favorece o surgimento de patógenos resistentes e de pragas secundárias (PUNJA & UKHEDE, 2003). Estas características estão relacionadas à dosagem necessária para eliminar os patógenos e evitar a sua reincidência e por sua inespecificidade. Ainda nesse contexto, os produtos químicos utilizados (agrotóxicos) são extremamente tóxicos e poluentes, impactando negativamente sobre ambiente e saúde humana.

Em função de sua constante aplicação, têm também contribuído para a seleção de mutantes resistentes, resultantes da forte pressão seletiva. Além disso, seu tempo de degradação no ambiente é da ordem de décadas, o que provoca uma

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

concentração elevada dessas substâncias na cadeia alimentar, através da bioacumulação e biomagnificação (PUNJA & UKHEDE, 2003).

### **Desenvolvimento de cultivares resistentes**

O melhoramento genético surgiu da necessidade de obtenção de novos cultivares com características de interesse comercial como maior produtividade, resistência à seca e menor suscetibilidade a pragas e patógenos. No melhoramento genético, utiliza-se o desenvolvimento de cultivares resistentes através do melhoramento clássico, o qual espécies com características como a resistência a seca, ou resistência a uma praga / patógeno específicos, são intercruzadas para a produção de novas linhagens cujo conjunto de genes tenham estas características (ARAGÃO E CORRÊA, 2005), e a transgenia, o qual genes de interesse (a exemplo, genes de resistência a determinado patógeno) de plantas da mesma espécie, outras espécies ou outros organismos são transferidos através de técnicas de engenharia genética para a planta de interesse, produzindo linhagens resistentes.

O desenvolvimento de cultivares resistentes compreende 3 etapas básicas: a identificação da fonte de resistência, a incorporação do gene de interesse no cultivar comercial e o desenvolvimento de estratégia para que a resistência seja durável face à natureza dinâmica das populações patogênicas (MICHEREFF, 2001). A melhor fonte de genes para desenvolvimento de novos cultivares são as variedades adaptadas com alto potencial produtivo ou variedades crioulas, assim como o germoplasma selvagem da espécie. Apesar do potencial de utilização do melhoramento genético para explorar a variabilidade genética de diferentes cultivares, ainda existem problemas que limitam a sua utilização como a ausência da característica de interesse dentro da espécie e a incompatibilidade sexual.

Para que a resistência seja durável e haja o sucesso do desenvolvimento de uma cultivar resistente a uma ou mais doenças, várias etapas são necessárias, como o monitoramento e isolamento das raças dos microrganismos patogênicos que prevalecem em uma determinada região, a inoculação dessas raças em diferentes linhagens e cultivares das plantas, visando à identificação de fontes de resistência o intercruzamento de linhagens e cultivares promissoras para o aumento do espectro

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

de resistência, ou seja, a concentração de genes que conferem resistência às diferentes raças em uma mesma cultivar da planta estudada, e por fim, a realização de testes em campo com as cultivares resultantes dos cruzamentos para verificar, na prática, o resultado do trabalho de melhoramento.

Para feijoeiro, grande parte da variabilidade das espécies destes no mundo tem sido mantida e conservada em bancos de germoplasma. O armazenamento da variabilidade em grandes coleções é fundamental para apoio e desenvolvimento dos programas de melhoramento. O Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa de Feijão do CNPAF, desde 1975, introduz e conserva germoplasma de feijão cultivado, mantendo uma coleção ativa com cerca de 14.350 registros, entre acessos nacionais e do exterior e tem a responsabilidade de introduzir genótipos provenientes de instituições de pesquisa e de expedições de coleta, armazenar o germoplasma em condições controladas (*ex situ*), multiplicar, avaliar e caracterizar os acessos. Os dados de passaporte de acessos de coletas e de introduções com seus respectivos números de registros são inseridos rotineiramente na Base de dados do Sistema Brasileiro de Informação de Recursos Genéticos - SIBRARGEN, coordenado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (GUSMÃO *et al.*, 2008).

### **Controle biológico**

Nos últimos anos, especialmente após a Conferência das Nações Unidas para o Meio Ambiente e Desenvolvimento (ECO-92), e recentemente, a Rio +20 em 2012, autoridades e cidadãos comuns tem se mostrado de forma crescente, mais preocupados com problemas associados à conservação e qualidade do meio ambiente. Essa preocupação tem resultado na busca pelo setor agropecuário de tecnologias para a implantação de sistemas de produção de enfoque ecológico, rentáveis e socialmente justos. Como resposta a essa demanda, a pesquisa científica tem avançado no desenvolvimento de soluções tecnológicas para uma agricultura sustentável (FERERES *et al.*, 2011). A agricultura sustentável, produtiva e ambientalmente equilibrada, apoia-se em práticas agropecuárias que promovem a agrobiodiversidade e os processos biológicos naturais, que se baseiam no baixo uso de insumos externos. Diante dessa perspectiva, o uso de microrganismos

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

biocontroladores, que atuam em seu próprio *habitat*, na defesa de plantas ao ataque de fitopatógenos, é uma alternativa promissora para o manejo de pragas em sistemas agrícolas sustentáveis (FERERES *et al.*, 2011). A complexidade das interações entre os microrganismos, o envolvimento de numerosos mecanismos de supressão da doença por um único organismo, e a adaptação da maioria dos agentes de biocontrole ao ambiente em que são utilizados contribuem para a perspectiva de que o controle biológico será mais durável que os químicos sintéticos (PATERNIANI, 2001).

No Brasil, embora o uso do controle biológico não seja uma prática comum entre os agricultores, há avanços significativos em alguns cultivos, e novos estudos estão sendo desenvolvidos para esta prática. O controle biológico consiste no emprego de um organismo (antagonista) que inibe o crescimento ou o desenvolvimento do fitopatógeno que esteja causando danos econômicos às lavouras (DEBACH, 1964). Este tratamento tem como objetivo a criação de um ambiente favorável ao antagonista, visando manter um equilíbrio no agroecossistema, de modo que a planta na presença do patógeno, não sofra danos significativos, em função da ação controladora dos antagonistas (BIZI, 2006).

A introdução de antagonistas adaptados ao microhabitat do patógeno é um aspecto relevante para muitos sistemas planta-patógeno. Antagonistas podem ser introduzidos em outro ambiente diferente daquele onde foi isolado, estabelecer e parasitar o patógeno. O sucesso do biocontrole, no entanto, dependerá da natureza das propriedades antagonistas e dos mecanismos de ação do agente empregado (MELO E AZEVEDO, 1998). Os microrganismos representam um importante grupo de organismos com potencial de aplicação em controle biológico, destacando-se dentre estes os fungos filamentosos. Quando comparados a outros sistemas utilizados em controle biológico, como bactérias produtoras de toxinas, protozoários e vírus, os fungos apresentam como vantagem um mecanismo especializado de infecção, que ocorre pela sua penetração ativa nos hospedeiros, não dependendo, assim, da sua ingestão para que se inicie o processo de infecção (FRANCESCHINI *et al.*, 2001). Os princípios dos mecanismos de controle biológico baseiam-se em relações antagônicas como: competição, predação, amensalismo, parasitismo ou pela produção de metabólitos que inibem o desenvolvimento do hospedeiro. As

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

atividades de controle biológico são realizadas ou diretamente, dificultando o crescimento e desenvolvimento de patógenos presentes no solo através de competição por nutrientes, secreção de antibióticos na rizosfera, antagonismo direto, ou indiretamente, provocando uma resposta de resistência sistêmica nas plantas (KLOEPPER *et al.*, 2004; BAKKER *et al.*, 2007; DE BRUIJN *et al.*, 2007; DEBODE *et al.*, 2007; POZO E AZCON-AGUILAR, 2007; KAMILOVA *et al.*, 2008).

Nesse contexto, alguns microrganismos são empregados como principais atuantes no controle biológico, dentre esses, os mais utilizados, são fungos do gênero *Trichoderma*.

O potencial das espécies do gênero *Trichoderma* como agentes de controle biológico foi reconhecido primeiramente por Weindling, 1932, que descreveu a atividade micoparásita de *Trichoderma lignorum* contra *Rhizoctonia* spp. Desde então, diversas pesquisas nessa área, vêm sendo desenvolvidas, culminando com o desenvolvimento de formulados comerciais à base de espécies de *Trichoderma*, como *Trichoderma harzianum*, no controle biológico de fungos fitopatogênicos de interesse na agricultura (WOO *et al.*, 2006). Espécies do fungo saprófita *Trichoderma* tem sido utilizadas com sucesso como agentes de controle biológico de doenças causadas por fungos fitopatogênicos, como *Rhizoctonia* spp., *Sclerotium* spp., *Fusarium* spp. (YEDIDIA *et al.*, 2003; PANDOLFO, 2007; JEGATHAMBIGAI *et al.*, 2010) . Sendo que biofungicidas formulados com linhagens de *Trichoderma*, como a ATCC 20476, estão sendo comercializadas há mais de 20 anos no norte da Europa, principalmente para o controle de doenças causadas por *Botrytis cinerea* em morangueiros (RICARD & RICARD, 1997). Espécies de *Trichoderma* representam em torno de 90% dos antagonistas já utilizados no controle de doenças fúngicas (BENITEZ, 2004).

Os fungos do gênero *Trichoderma* (Ascomycetes, Hypocreales) são de grande importância econômica para a agricultura, uma vez que são capazes de atuar como agentes de controle de doenças em lavouras, além de serem promotores de crescimento e indutores de resposta de defesa e resistência a doenças de plantas hospedeiras (MOHAMED & HAGGAG 2006, FORTES *et al.*, 2007).

Bons agentes antagonistas são normalmente capazes de superar o efeito fungistático do solo, o qual resulta da presença de metabólitos produzidos por outras

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

espécies, incluindo plantas, além de sobreviverem em condições de grande competitividade. Os fungos do gênero *Trichoderma* crescem rapidamente quando inoculados no solo, por serem naturalmente resistentes a muitos compostos tóxicos, incluindo herbicidas, fungicidas, inseticidas e compostos fenólicos (CHET, 1993). Estudos recentes mostraram que o ambiente em que o fungo está presente tem um importante papel no crescimento e diferenciação de *Trichoderma* spp, que respondem a estímulos externos durante o crescimento, produção de conídios e micoparasitismo. Esses três fatores são importantes atributos que contribuem para o desenvolvimento desses organismos como biofungicidas (CARRERAS-VILLASEÑOR *et al.*, 2012). *Trichoderma* spp., são geralmente considerados competidores agressivos, apresentando rápido crescimento e colonização, excluindo muitos patógenos, e possuem uma capacidade superior de mobilizar e obter nutrientes do solo quando comparados a outros fungos (HARMAN *et al.*, 2004). O uso eficiente de nutrientes disponíveis é baseado na habilidade deste fungo em obter ATP do metabolismo de diferentes açúcares, tais como celulose, glucanos, quitina entre outros (CHET, 1993). A eficiência da inibição do fitopatógeno pelo *Trichoderma* parece estar também relacionada a altas taxas e acumulação de CO<sub>2</sub> realizadas pelo antagonista (MARCHETTI *et al.*, 1992).

Trichodermil (*T.harzianum* ESALQ-1306) é um exemplo de produto comercial à base de *Trichoderma* eficiente no controle de *R. solani* em lavouras de feijão. A sua aplicação no sulco de plantio, reduz em até 83% o número de propágulos de *R. solani* no solo após 30 dias, em comparação com um aumento de mais de 2 vezes em áreas não tratadas. Além disto, a sua aplicação reduz a densidade de *F. solani* no solo em até 67% no pré-florescimento, estágio no qual as podridões radiculares causam os maiores danos às raízes, definindo perdas irreversíveis na produção (BUZZERIO, 2001). O tratamento com este formulado levou a um desenvolvimento mais vigoroso das plantas e o incremento de produtividade da cultura. Nas áreas sem tratamento ou com o tratamento químico de sementes padrão observou-se um aumento na população dos fitopatógenos. Já as análises do solo tratado com Trichodermil, indicaram um aumento das populações de *Trichoderma*, evidenciando um estabelecimento e multiplicação desta espécie no solo, aos 30 dias após a aplicação (BUZZERIO, 2001).



JACKELINE LEITE PEREIRA

---

O uso de *Trichoderma* tem sido efetivo contra patógenos radiculares como: nematóide da raiz *Meloidogine javanica*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora* e patógenos da parte aérea, como *Venturia* spp., *Botrytis* sp, *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura-de-bruxa do cacau, dentre outros (NASEBY *et al*, 2000; NIELSEN *et al*, 2000; SHARON *et al*, 2001; HJELJORD *et al*, 2001). Podem também serem utilizados no controle de fitopatógenos de produtos de pós-colheita, como tubérculos, frutos e na proteção de sementes (SHORESH E HARMAN, 2010).

### **Interação microrganismos não patogênicos e plantas**

Alguns microrganismos antagonistas são capazes de induzir a resposta de defesa e resistência em plantas hospedeiras. Para alguns microrganismos, estes mecanismos são bem descritos, como para as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, designadas PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) ou YIB (*Yield Increasing Bacteria*) (KLOEPPER *et al*. 1997). Estas também podem aumentar a taxa de germinação das sementes e o crescimento radicular, melhorando o desenvolvimento da parte aérea e, conseqüentemente, proporcionando maior rendimento e resistência das culturas (MARIANO & KLOEPPER 2000). Essas promoções devem-se à habilidade de das rizobactérias, em solubilizar e aumentar a absorção de fósforo, fixar o nitrogênio, produzir sideróforos que sequestram e disponibilizam íons férricos, produzir compostos análogos a hormônios vegetais, como ácido-indol-acético (AIA), giberelinas, citocininas e 1-aminociclopropano -1- carboxilato (ACC) (ALVES *et al.*, 2011). Estudos envolvendo bactérias não patogênicas do gênero *Pseudomonas* mostraram a redução na severidade dos sintomas provocados por *Phyitium aphanidermatum* em cultura hidropônica de alface (BERNARDES *et al.*, 2010).

Fungos micorrízicos e *Rhizobium* spp., são os mais bem estudados microrganismos benéficos do solo. Os fungos micorrízicos fornecem à planta hospedeira o aumento da superfície de suas raízes para absorverem água e sais minerais como o fosfato, importante para o seu desenvolvimento (HARRISON, 2005), enquanto *Rhizobium* spp fixam nitrogênio da atmosfera em amônia, que

JACKELINE LEITE PEREIRA

podem ser utilizadas para a síntese de aminoácidos pelas plantas hospedeiras (SPAINK, 2000).

As bactérias antagonistas de maior prevalência na rizosfera, são as do gênero *Pseudomonas* (*P. putida* e *P. fluorescens*), *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., e representantes da família Enterobacteriaceae (CAMPOS SILVA *et al.*, 2008). Na Tabela 1, são listadas algumas bactérias e fungos atuantes na proteção de diversas espécies vegetais.

**Tabela 1:** Alguns microrganismos indutores de resposta de defesa em plantas e responsáveis pela resistência a diferentes patógenos. Modificado de Van Loon *et al.*, 2008; Harman *et al.*, 2008.

Espécie vegetal	Microrganismo Indutor de RSI	Microrganismo fitopatígeno	Doença
Arabidopsis	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>raphani</i>	Murcha vascular
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Mancha bacteriana
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417	<i>Peronospora parasitica</i>	Míldio
	<i>Pseudomonas putida</i> WCS358	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>raphani</i>	Murcha vascular
	<i>Pseudomonas putida</i> WCS358	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Mancha bacteriana
Feijão	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 7NSK2	<i>Botrytis cinerea</i>	Mofo cinzento
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 7NSK2	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Antracnose
	<i>T. harzianum</i> T-22	<i>Botrytis cinerea</i>	Mofo cinzento
	<i>T. harzianum</i> T-39	<i>Botrytis cinerea</i>	Mofo cinzento
	<i>T. atroviride</i> P1	<i>Xanthomonas campestris</i>	Cancro bacteriano
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> S97	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Praga de halo
Cravo	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i>	Murcha vascular
Pepino	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> 25-33	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	Antracnose
	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> 28-9	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	Antracnose
	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> 36-5	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	Antracnose
	<i>Pseudomonas corrugata</i> 13	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Crown rot
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> C15	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Crown rot
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> G8-4	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	Antracnose
	<i>Pseudomonas putida</i> 34-13	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	Antracnose
	<i>Pseudomonas putida</i> 89B-27	<i>Acalymna vittatum</i>	Herbivoria
	<i>Pseudomonas putida</i> 89B-27	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	Antracnose
	<i>Pseudomonas putida</i> 89B-27	<i>Cucumber mosaic virus</i>	Mosaico sistêmico
	<i>Pseudomonas putida</i> 89B-27	<i>Diabrotica undecimpunctata</i>	Herbivoria
	<i>Pseudomonas putida</i> 89B-27	<i>Erwinia tracheiphila</i>	Murcha bacteriana
	<i>Pseudomonas putida</i> 89B-27	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lachrymans</i>	Mancha angular
	<i>Pseudomonas putida</i> 89B-27	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i>	Murcha vascular
	<i>Serratia marcescens</i> 90-166	<i>Acalymna vittatum</i>	Herbivoria
	<i>Serratia marcescens</i> 90-166	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	Antracnose
	<i>Serratia marcescens</i> 90-166	<i>Cucumber mosaic virus</i>	Mosaico sistêmico
	<i>Serratia marcescens</i> 90-166	<i>Diabrotica undecimpunctata</i>	Herbivoria
	<i>Serratia marcescens</i> 90-166	<i>Erwinia tracheiphila</i>	Podridão bacteriana
	<i>Serratia marcescens</i> 90-166	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lachrymans</i>	Mancha angular
<i>Serratia marcescens</i> 90-166	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i>	Murcha vascular	
<i>Serratia plymuthica</i> 2-67	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	Antracnose	
<i>T. asperellum</i> T 203	<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	Mancha angular	
<i>T. harzianum</i> T1	<i>Green mottle mosaic virus</i>	Mancha GMMV	
<i>Trichoderma</i> GT3-2	<i>C. orbiculare</i>	Antracnose	
<i>Trichoderma</i> GT3-2	<i>P. syringae</i> pv. <i>Lachrymans</i>	Mancha angular	
<i>T. harzianum</i> T-39	<i>Botrytis cinerea</i>	Mofo cinzento	
Rabanete	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS374	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>raphani</i>	Murcha vascular
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417	<i>Alternaria brassicicola</i>	Lesões necróticas
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417	<i>Fusarium oxysporum</i>	Lesões necróticas
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>raphani</i>	Murcha vascular
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Lesões necróticas
Tabaco	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 7NSK2	<i>Tobacco mosaic virus</i>	Lesões necróticas
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHAO	<i>Thielaviopsis basicola</i>	Podridão radicular negra
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHAO	<i>Tobacco necrosis virus</i>	Lesões necróticas
	<i>Serratia marcescens</i> 90-166	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	erisipela
	<i>T. harzianum</i> T-39	<i>Botrytis cinerea</i>	Mofo cinzento
Tomate	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	Murcha vascular
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 89B-27	<i>Cucumber mosaic virus</i>	Mosaico sistêmico
	<i>Serratia marcescens</i> 90-166	<i>Cucumber mosaic virus</i>	Mosaico sistêmico
	<i>T. harzianum</i> T-39	<i>Botrytis cinerea</i>	Mofo cinzento
	<i>T. harzianum</i> T 22	<i>Alternaria solani</i>	Mancha de alternaria
Algodão	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Podridão radicular
Milho	<i>T. harzianum</i> T 23	<i>Colletotrichum graminicola</i>	Antracnose foliar e Podridão do colmo do milho

## Interação *Trichoderma*-plantas hospedeiras

### Promoção de crescimento da planta

A atividade de promoção de crescimento, bem como a modulação da resposta de defesa de plantas hospedeiras por espécies de *Trichoderma* está relacionada com a sua capacidade de colonizar as raízes destas. Esta habilidade já foi descrita para *T. asperelloides* e *T. harzianum* (HARMAN *et al.*, 2010), demonimadas de espécies rizocompetentes, ou seja, são capazes de colonizar regiões específicas das raízes (WILSON, 2002). Enquanto outras, nomeadas “rizosfera-competentes”, colonizam toda a superfície radicular, penetram no espaço intercelular das primeiras camadas da epiderme e permanecem em associação com as raízes das plantas hospedeiras por longos períodos (YEDIDIA *et al.*, 1999; HARMAN, 2000). A relação endofítica entre espécies de *Trichoderma* e plantas hospedeiras ainda é pouco estudada, no entanto já foi descrita para *Trichoderma stromaticum* em associação com cotilédones de cacau e feijão, bem como para espécies de *T. harzianum*, *T. hamatum* e *T. asperellum* encontradas colonizando todas as partes da planta de cacau, desde raízes até as folhas (BAILEY *et al.*, 2006).

A promoção de crescimento das plantas mediada pelo micoparasita está diretamente relacionada com as alterações no padrão de expressão de proteínas do metabolismo energético durante a interação *Trichoderma* e planta hospedeira. Análises do proteoma da interação pepino e *T. asperellum*, mostraram que genes e proteínas envolvidas no metabolismo energético e fotossíntese tiveram expressão aumentada, bem como produtos de resposta de defesa, sugerindo que T22 promove o aumento do crescimento da planta, pelo menos em parte por que os sistemas respiratórios são superexpressos e assim aumentam a energia para o crescimento da planta (SHORESH & HARMAN, 2008). Outros estudos que avaliaram o papel da auxina na regulação do crescimento e desenvolvimento de plântulas de *Arabidopsis thaliana* em resposta à inoculação com *T. virens* e *T. atroviride*, mostraram a capacidade desses dois isolados em alterar a arquitetura do sistema das raízes em plântulas com 9 dias, aumentando também a quantidade de raízes laterais (CONTRERAS-CORNEJO *et al.*, 2009). Quando analisada a interação entre *T.*

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

*asperellum* T203, e plantas de pepino em sistemas axênicos, Yedidia e colaboradores, em 2001, demonstraram o aumento da raiz dessas plantas. Ambos os estudos concluíram que essa interação planta-*Trichoderma*, gera a promoção de absorção aumentada de nutrientes, visto que conseqüentemente gera um aumento na quantidade de raízes laterais, promovendo elevação nas taxas de fotossíntese em suas folhas, fazendo com que a planta eleve sua taxa de crescimento. Além disso, foi demonstrado que este gênero participa na decomposição e mineralização dos resíduos vegetais, contribuindo para a disponibilização de nutrientes para as plantas (SHORESH & HARMAN, 2008).

### **Indução de resposta de defesa nas plantas por *Trichoderma* spp.**

As espécies do gênero *Trichoderma* podem inibir o crescimento dos patógenos ou o seu estabelecimento na planta hospedeira tanto por confronto direto contra o hospedeiro, como por indução de resposta de defesa e resistência nas plantas hospedeiras (PAPAVIZAS, 1985, HOWELL, 1998, HOWELL, 2003 E VERMA *et al.*, 2007). Sabe-se que *Trichoderma* spp colonizam e penetram tecidos da raiz da planta, iniciando nestas, uma série de alterações morfológicas e bioquímicas consideradas como parte de defesa vegetal e que, no final, a leva a induzir uma resistência sistêmica adquirida (BAILEY & LUMSDEN, 1998). A ativação do sistema de defesa da planta na associação da raiz tratada com *T. harzianum* foi sugerida por YEDIDIA *et al* (1999), estudando a interação com este agente de biocontrole e pepino.

As linhagens de *Trichoderma* mais eficientes no controle biológico de fungos fitopatogênicos e na promoção de crescimento de plantas hospedeiras são as capazes de estabelecer interações duradouras com a planta, como as rizosfera-competentes e endofíticas, pois os efeitos benéficos perduram por todo ou grande parte do ciclo de vida da planta (HARMAN, 2000). A penetração do tecido radicular por *Trichoderma* nas camadas mais externas de células faz com que seja criada uma zona de interação química na qual a planta e o fungo se comunicam por troca de moléculas bioativas (HARMAN *et al.*, 2004). Essas moléculas incluem elicitores

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

de resposta de defesa, como genes homólogos aos de avirulência – *Avr* produzidos pelo fitopatógeno, proteínas com ou sem funções enzimáticas, oligossacarídeos e outros compostos de baixa massa molecular (HARMAN *et al.*, 2004). Também atuam na indução da resposta de defesa e protegem a planta contra uma subsequente infecção por fitopatógenos.

Estudos realizados em pepino por Yedidia e colaboradores mostraram que estes fungos, quando em íntimo contato com a raiz, podem desencadear uma série de alterações bioquímicas e estruturais nas plantas hospedeiras, induzindo sua resposta de defesa e aumentando sua resistência a doenças fúngicas (YEDIDIA *et al.*, 1999). Estas mudanças incluem a deposição aumentada de parede celular (Ex. calose) no sítio de infecção, bem como o aumento da atividade de enzimas (ex. peroxidases e quitinases) e outras proteínas de defesa, mediadas pela produção de ácido salicílico (YEDIDIA *et al.*, 1999). A análise do proteoma da interação de *T. harzianum* T22 e raiz de *Zea mays* mostrou a alteração no padrão de expressão de uma série de proteínas relacionadas à resposta de defesa da planta, assim como de metabolismo (SHORESH & HARMAN, 2008).

Durante essa interação fungo-planta, mais de 300 proteínas da planta têm a expressão alterada, sendo que muitas apresentam aumento de expressão. Nesse grupo incluem-se especialmente enzimas do metabolismo de carboidrato e proteínas que estão associadas com a resistência contra patógenos e outros tipos de estresses. Múltiplas formas de quitinases,  $\beta$ -glucanases, peroxidases, proteínas com sítios de ligação e motivos ricos em leucina associados com resistência a doença, sucrose sintetase e metionina sintetase foram mais expressas durante a interação (SHORESH & HARMAN, 2008). Estas mudanças no metabolismo geralmente beneficiam a planta, pois podem envolver, entre outras, a ativação de vias que levam a indução de resistência localizada e/ou sistêmica (YEDIDIA *et al.*, 2003).

Estudos da interação entre espécies de *Trichoderma* spp, planta hospedeira e patógeno, em nível de expressão de proteínas ainda são pouco relatados na literatura. Mais comuns são os trabalhos que descrevem o mapeamento de proteínas secretadas por *Trichoderma* ou com expressão intracelular aumentada em condições que simulam o micoparasitismo, como descrito por HOWELL (2003) e

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

HARMAN *et al.*, (2004). No entanto já existem relatos de análises do proteoma da interação *T. atroviride*/*P. vulgaris*/*B. cinerea* e *R. solani*, onde os autores identificaram proteínas relacionadas à patogênese, bem como, outros possíveis genes de resistência na interação com um destes fungos fitopatogênicos e/ou *T. atroviride* (MARRA *et al.*, 1999). Assim como, o trabalho de SEGARRA *et al.*, (2007) que analisaram por abordagem proteômica a alteração no padrão de expressão de proteínas em pepino, quando cultivado na presença do fungo *Trichoderma asperellum* T34. Neste estudo, os autores detectaram aumento nos níveis de ácido salicílico e jasmônico nas primeiras 72 horas desta interação, e identificaram 28 proteínas, das quais 17 estavam subexpressas e 11 superexpressas, quando comparadas à planta controle.

A interação entre *Trichoderma* – planta, não só ocasiona mudanças no padrão de expressão de proteínas, como também pode promover mudanças nos níveis de síntese e transporte de hormônios na mesma. Quando em associação com fungos arbusculares micorrízicos *Glomus intraradices* e *Glomus mosseae* em raízes de meloeiro, *T. harzianum* foi capaz de promover o aumento dos níveis de zeatina, ácido índole-3-acético (IAA), 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC), ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e ácido absísico (ABA). Sendo que estes compostos estão relacionados à sinalização de resposta de defesa, promoção de crescimento e atuam como mediadores para resposta de resistência de defesa sistêmica e adquirida. Além destas alterações promovem também o maior crescimento da parte aérea destas plantas, indicando, alterações nos padrões dos níveis de auxina (MARTINEZ-MEDINA *et al.*, 2011). Neste mesmo estudo, os autores sugeriram que estas alterações foram desencadeadas em função da presença de *T. harzianum*, já que na presença de *G. intraradices* e *G. mosseae*, estas alterações não foram observadas. E que a ativação das vias de JA e AS podem ser responsáveis por aumentar a resistência das plantas de meloeiro à infecção pelo fungo *F. oxysporum* (MARTINEZ-MEDINA *et al.*, 2011).

Para promover o crescimento da planta, bem como induzir resposta de defesa, *Trichoderma* deve ser capaz de colonizar sua raiz. A colonização envolve uma habilidade de reconhecer e se aderir a estas raízes, penetrar na planta, e

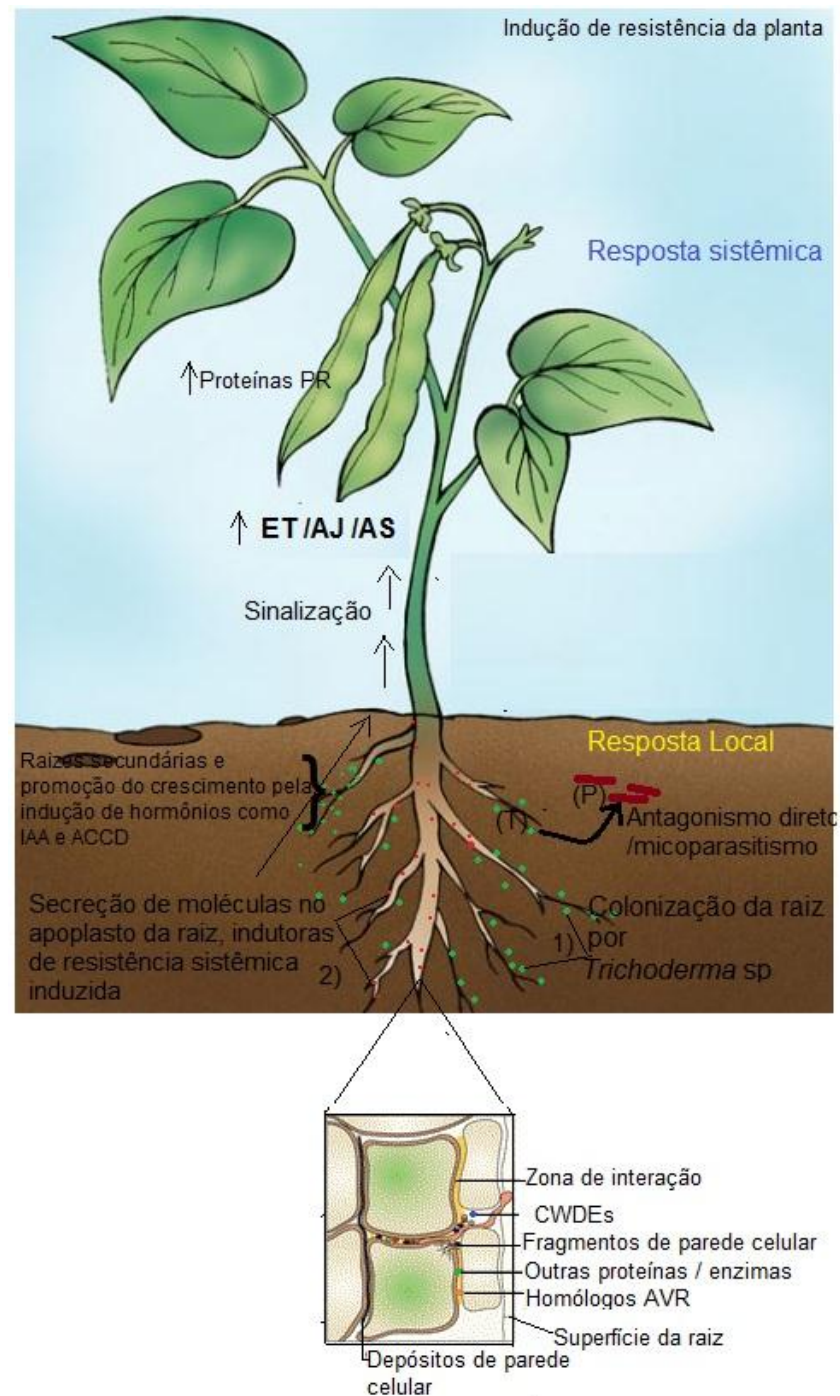
JACKELINE LEITE PEREIRA

---

resistir aos metabólitos tóxicos produzidos por ela em resposta a invasão. Esta aderência à superfície da raiz pode ser mediada por hidrofobinas, que são pequenas proteínas hidrofóbicas da camada mais externa da parede celular, e proteínas expansina, que estão relacionadas ao desenvolvimento da parede celular. Em estudos utilizando *Trichoderma asperellum*, foi demonstrado que este produz uma hidrofobina TasHyd1 envolvida na colonização da raiz de plantas, possivelmente aumentando a aderência do fungo à superfície radicular e protegendo as extremidades das hifas dos compostos de defesa produzidos pelas plantas (VITERBO E CHET, 2006). Outros estudos de uma expansina TasSwo, com um domínio de ligação a celulose capaz de reconhecer e modificar a arquitetura da parede celular vegetal, facilitando a colonização da raiz (BROTMAN *et al.*, 2008). As enzimas que degradam a parede celular (sigla em inglês CWDEs), também estão envolvidas na colonização das raízes, como ocorre com a endopoligalacturonase de *T. harzianum* (MORAN-DIEZ *et al.*, 2009).

Após a colonização da planta pelo fungo benéfico, uma série de cascatas de eventos acontece para a promoção de resistência da planta, como a ativação de cascatas que envolvem AS, AJ e etileno, e o aumento de expressão de proteínas relacionadas à patogênese (Figura 3).

JACKELINE LEITE PEREIRA



**Figura 3:** Esquema demonstrando a indução de resposta de defesa em feijoeiro por *Trichoderma* sp. (RSI). (P): patógeno; (T): *Trichoderma* sp, IAA: ácido indol acético, AJ: ácido jasmônico, AS: ácido salicílico, ET: etileno. (baseado em Harman *et al.*, 2004 e Hermosa *et al.*, 2012.



## **Mecanismos de defesa em plantas**

A resposta de defesa e a resistência local e sistêmica ocorrem em todas as plantas superiores em resposta à colonização por microrganismos patogênicos, danos físicos causados por insetos herbívoros, bem como pela aplicação de compostos químicos e presença de organismos não patogênicos (HARMAN *et al.*, 2004).

A ativação dos mecanismos de defesa de plantas ocorre por meio de sucessivos eventos e sinais que iniciam no reconhecimento pela planta do agente do estresse biótico ou abiótico e culmina com a formação de barreiras físicas e químicas para evitar a ação destes agentes. A resposta de defesa de plantas inclui três mecanismos principais: a resposta hipersensitiva (HR) cuja resposta de defesa se dá no sítio de infecção, a resistência sistêmica adquirida (RSA) e a resistência sistêmica induzida (RSI). Estas, por sua vez, podem induzir a produção de proteínas associadas à patogênese (PR-Proteínas) em cadeias de sinalização mediadas por ácido salicílico e ácido jasmônico envolvendo as moléculas sinalizadoras peróxido de hidrogênio e etileno, respectivamente (VIEIRA *et al.*, 1992; HARMAN *et al.*, 2004; DRUZHININA *et al.*, 2011, HERMOSA *et al.*, 2012).

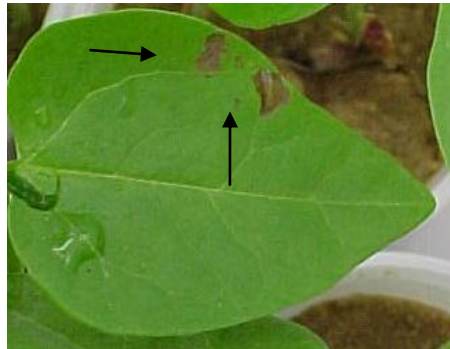
### **Resposta hipersensitiva (HR)**

A HR é definida como uma resposta local rápida desencadeada na planta hospedeira após a interação incompatível com um patógeno, isto é, patógeno virulento e planta susceptível. Esta resposta envolve sucessivos eventos e sinais que compreendem desde o reconhecimento entre o patógeno e o hospedeiro até o colapso celular vegetal localizado, correspondendo à primeira etapa de resposta de defesa da planta (Figura 4). As alterações são inicialmente desencadeadas no sítio de infecção se estendendo posteriormente a toda a planta. Estas alterações podem significar o estabelecimento de interações compatíveis (patógeno virulento – planta susceptível) ou incompatíveis (patógeno avirulento-planta susceptível) entre o patógeno e o hospedeiro. Dentre as principais alterações decorrentes da HR está a indução da produção de proteínas solúveis, que são conhecidas como proteínas

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

relacionadas à patogênese, as PR-proteínas, como por exemplo as peroxidases, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases. Outras respostas paralelas à infecção são o aumento da expressão de fenilalanina amônia liase (PAL) e deposição de lignina (VERBENE *et al.*, 2000).



**Figura 4:** Exemplo de resposta hipersensiva em folha de feijoeiro. Necrose do tecido mostrada na seta (Fernandes *et al.*, 2009).

### **Resistência Sistêmica Induzida (RSI) e Resistência Sistêmica Adquirida (RSA)**

#### Indutores de resistência

No fenômeno da indução de resistência da planta, ocorre a ativação de seus mecanismos de defesa, por meio de uma cascata de eventos e sinais que se inicia no reconhecimento do agente elicitador, culminando com a ativação das barreiras estruturais e bioquímicas envolvidas no processo. Como o agente de indução da resposta está em um local da planta, e os mecanismos de defesa são ativados em outras partes distantes, pressupõe-se que deva existir algum tipo de sinal químico, bioquímico, energético ou de natureza ainda desconhecida que deve ter sua origem no sítio de indução e seja enviado a locais mais distantes numa espécie de reação em cadeia. Os candidatos a sinalizador intracelular são o ácido salicílico, ácido jasmônico e seus derivados, etileno, sisteminas e sinais elétricos (ROMEIRO, 2008).

O ácido salicílico (AS) é um mensageiro secundário endógeno que induz a expressão de genes relacionados à RSA, ou seja, expressão de proteínas PR,

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

peroxidases e fitoalexinas (BONALDO *et al.*, 2005; CAVALCANTI *et al.*, 2005). O ácido jasmônico (AJ) e seus derivados jasmonatos são reguladores vegetais endógenos que atuam no mecanismo de defesa das plantas e agem como sinalizador de estresse (CORTÊS 2000). O etileno é um hormônio vegetal volátil com múltiplas funções fisiológicas, inclusive na comunicação entre plantas, o que o aponta como um sinalizador. Sabe-se que é produzido em resposta a ferimentos ou infecção por patógenos e a exposição à elicitores de mecanismos de defesa (PIETERSE *et al.*, 2001).

### RSI e RSA

A maioria das respostas bioquímicas de defesa das plantas está inativa até que esta entra em contato com os agentes desencadeadores desta resposta, como por exemplo, o tratamento com compostos químicos, conhecidos como indutores de resistência (fatores abióticos), ou pelo contato e interação com um patógeno ou um agente não patógeno, como os simbioses (fator biótico).

A Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) e a Resistência Sistêmica Induzida (RSI) são consideradas como mecanismos de respostas de defesa distintos, mas fenotipicamente semelhantes em que as plantas, após a exposição a um agente indutor, têm seus mecanismos de defesa ativados não apenas no sítio de indução, mas também em sítios distantes do ponto de infecção, de forma sistêmica na planta hospedeira (BARROS *et al.*, 2010). O termo “adquirido” é utilizado quando o elicitador é um agente patogênico ou um parasita, já o termo “induzido” é empregado quando esse agente é benéfico, simbiote ou abiótico (BARROS *et al.*, 2010). É reconhecido pela comunidade acadêmica especialista no estudo da resposta de defesa em plantas que RSA e RSI são fenômenos distintos quanto à forma através da qual são induzidos, desencadeados e mediados por mecanismos bioquímicos diferentes (Figura 5), mas bastante semelhantes no resultado fenotípico final que se expressa sob forma de indução de resistência com caráter sistêmico (BARROS *et al.*, 2010).

A RSA envolve o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas PR) como mecanismos induzidos de defesa da planta, e sua indução é salicilato-

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

dependente, podendo resultar em alterações visuais como necroses na planta, e geralmente é induzida por patógenos ou ativadores químicos. Esta proteção sistêmica tem sido considerada de longa duração e amplo espectro, sendo efetiva contra doenças causadas por diferentes agentes bióticos, tais como vírus, bactérias e fungos (CARR *et al.*, 2010), pela restrição do crescimento desses fitopatógenos e, conseqüentemente, na supressão ou diminuição dos sintomas de doenças.

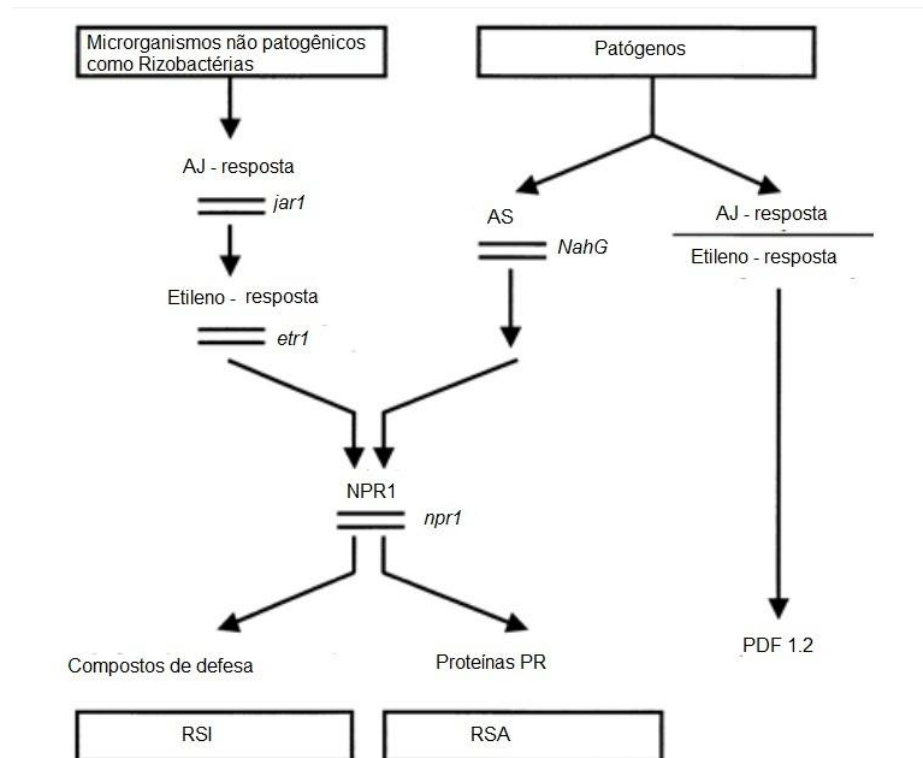
No caso da RSI, foi demonstrado que não há acúmulo de proteínas PR, que a planta que responde à infecção através deste mecanismo, não exibe alterações, e que o agente indutor é usualmente um microrganismo não patogênico. Estudos pioneiros de RSI em plantas de rabanete descreveram a resistência aumentada destas plantas após tratamento com a rizobactéria *Pseudomonas* sp., WCS417r, contra a infecção de *Fusarium* sp., sendo demonstrado também que esta característica não correlaciona com o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese. Desta forma, foi demonstrado que este tipo indução de resposta de defesa e resistência à infecção não é salicilato dependente, sugerindo haver outra rota de sinalização associada à jasmonatos e etileno (BARROS *et al.*, 2010).

O etileno e o ácido jasmônico também são dois reguladores de crescimento vegetal relacionados com funções de desenvolvimento, crescimento, senescência da planta e indução de resistência sistêmica. Já foi demonstrado, que o etileno é capaz de induzir a síntese de proteínas tais como, as quitinases, as  $\beta$  1-3 glucanases e a chalcona sintase (ECKER, 1995). O ácido jasmônico induz a expressão de tioninas e inibidores de proteinases. As tioninas são proteínas de baixo peso molecular (PM 5kDa), inclusas na família das PR-13 e são tóxicas a bactérias, fungos, leveduras. Análises da expressão aumentada de um gene que codifica uma tionina de cevada em tabaco mostraram significativo aumento de resistência aos sintomas causados pela bactéria fitopatogênica *Pseudomonas syringae* (CARMONA *et al.*, 1993), mostrando sua atuação na resistência sistêmica induzida.

Tanto a rota da RSA, quanto a rota da RSI são reguladas pela proteína NPR1 (Proteína relacionada a resposta de defesa em plantas), que funciona como um modulador da comunicação entre as rotas de sinalização do ácido salicílico e do ácido jasmônico (Figura 5) (PIETERSE *et al.*, 2005). A proteína reguladora NPR1

JACKELINE LEITE PEREIRA

tem um importante papel como transdutor da sinalização por ácido salicílico. Além de ser ativada por esse hormônio, NPR1 atua como um co-ativador transcricional da expressão de genes PR.



**Figura 5:** Rotas de RSA e RSI ativadas por microrganismos patogênicos e não patogênicos em plantas, através das moléculas sinalizadoras AS (ácido salicílico), AJ (ácido jasmônico) e ET (etileno). Modificado de PIETERSE *et al.*, 1998.

### Proteínas de resposta de defesa (PR-proteínas)

O termo PR-Proteínas foi primeiramente utilizado para descrever proteínas extracelulares que se acumulavam em *Nicotiana tabacum* após infecção com o vírus do mosaico do fumo (TMV) (VAN LOON & VAN KAMMEN, 1970). BOWLES (1990) ampliou esta definição incluindo proteínas intra e extracelulares acumuladas em tecidos vegetais intactos ou em cultura de células após o tratamento com elicitores ou ataque de patógenos.

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

As PR-proteínas são classificadas dentro de 17 famílias (Quadro 2), sendo enumeradas na ordem em que foram descobertas e apresentando diferentes atividades. Esta classificação é realizada agrupando em famílias proteínas com propriedades bioquímicas e biológicas comuns (VAN LOON *et al.*, 2006). A família PR-2 é constituída por endo- $\beta$ -1,3-glucanases subdivididas em três classes distintas denominadas I, II e III. As glucanases da classe I são proteínas básicas, localizadas no vacúolo, especialmente na epiderme das folhas inferiores e nas raízes de plantas, enquanto que as classes II e III incluem principalmente as proteínas ácidas extracelulares. Estas enzimas catalisam a hidrólise do polímero de  $\beta$ -1,3-glicana, componente estrutural da parede celular de fungos hospedeiros, particularmente na extremidade de hifas em que a glicana está mais exposta, causando um enfraquecimento da parede, resultando na morte celular dos fitopatógenos (STICHER *et al.*, 1997).

A estrutura das proteínas da família PR-1 é fortemente conservada em várias plantas chegando a 35% de homologia. Tais proteínas possuem homologia inclusive com proteínas de fungos, insetos e vertebrados (o homem inclusive) (VAN LOON *et al.*, 2006).

A família PR-2 compreende as glucanases, e as famílias PR-3, PR-4, PR-8, PR-11 as quitinases, todas possuindo atividade contra fungos. As proteínas dessas famílias possuem um mecanismo de ação hidrolítico sobre a parede celular de fungos e bactérias (YOSHIKAWA *et al.*, 1993). A família PR-3 é constituída por endoquitinases que são agrupadas em seis classes distintas (I, II, IV, V, VI e VII), atuando diretamente nas paredes celulares de fungos, catalisando a hidrólise do polímero de quitina, enfraquecendo-as e tornando as células osmoticamente sensíveis (GUZZO, 2003). Os oligômeros provenientes desta hidrólise também podem atuar como elicitores de resposta de defesa na planta hospedeira (Misawa e Kuninaga, 2010). Além das  $\beta$ -1,3-glucanases (PR-2) e quitinases (PR3, PR4, PR8) proteínas das famílias PR-1 e PR-5 também possuem atividades antimicrobianas (STICHER *et al.*, 1997).

JACKELINE LEITE PEREIRA

A família PR-6 compreende inibidores de proteinases as quais atuam contra nematóides e insetos. As PR-7 são endoproteinases que atuam na dissolução da parede celular de vários microrganismos (GARCIA-OLMEDO *et al.*, 1989).

As PR-9, ou peroxidases, participam de vários processos fisiológicos, capazes de catalisar um grande número de reações como, produção ou catálise  $H_2O_2$ , produção ou catálise da formação de lignina, um importante mecanismo físico de defesa vegetal, que pode aumentar a resistência de diversas espécies vegetais contra fitopatógenos, dificultando seu ingresso e proliferação na célula, através da oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico na presença de peróxido de hidrogênio, além da suberização, catabolismo de auxinas e cicatrização de ferimentos (TAHERI E TARIGHI, 2012). Estudos que demonstram a atuação de peroxidases na defesa de plantas foram descritos para as interações: tomateiro e *Botrytis cinerea*, arroz e *Colletotrichum leganeorum*, pepino e *F. oxysporum* e tomate e *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* (PEREIRA *et al.*, 2008; HOUTERMAN *et al.*, 2007).

**Quadro 2:** Famílias reconhecidas de proteínas relacionadas à patogênese.

Famílias	Membro padrão	Propriedades
<b>PR-1</b>	Tabaco PR-1 <sup>a</sup>	Desconhecido
<b>PR-2</b>	Tabaco PR-2	B-1,3-glucanase
<b>PR-3</b>	Tabaco P,Q	Quitinase tipo , I, V, V, VI, VII
<b>PR-4</b>	Tabaco 'R'	Quitinase tipo I, II
<b>PR-5</b>	Tabaco S	Taumatina – like
<b>PR-6</b>	Tomate inibidor I	Proteinase – inibidor
<b>PR-7</b>	Tomate P <sub>69</sub>	Endoproteinase
<b>PR-8</b>	Pepino quitinase	Quitinase tipo III
<b>PR-9</b>	Tabaco "lignin-forming peroxidase"	Peroxidase
<b>PR-10</b>	Salsa "PR1"	Ribonuclease – like
<b>PR-11</b>	Tabaco "classe V" quitinase	Quitinase, tipo I
<b>PR-12</b>	Rabanete Rs-AFP3	Defensina
<b>PR-13</b>	Arabidopsis THI2.1	Tionina
<b>PR-14</b>	Cevada LTP4	Proteína de transferência de lipídeo
<b>PR-15</b>	Cevada OxOa (germin)	Oxalato oxidase
<b>PR-16</b>	Cevada OxOLP	Oxalato oxidase
<b>PR-17</b>	Tabaco PRp27	Desconhecido

VAN LOON *et al.*, 2006

## Espécies reativas de oxigênio

Espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion peróxido e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), são produtos constantemente produzidos durante os processos metabólicos normais, como a fotossíntese ou a glicólise. EROs, produzidas em altos níveis já foram descritas como letais para a integridade celular. No entanto, o aumento na produção de EROs, também tem função na defesa de plantas contra a invasão por patógenos levando à necrose das células no ponto de infecção e podendo atuar também como um sinalizador (explosão oxidativa e necrose) (NANDA *et al.*, 2010).

No início da interação com determinado patógeno, as plantas podem produzir uma série de respostas de defesa, incluindo geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e a hidroxila livre ( $OH^-$ ) (MUR *et al.*, 2008).

Como estes compostos são tóxicos e participam como sinalizadores em uma série de processos que afetam a fisiologia das plantas a sua produção e consumo são finamente controlados por um conjunto de genes organizados em uma rede denominada “rede gênica EROs”. Em *Arabidopsis*, esta rede é composta por 150 genes (MITTLER *et al.*, 2004), que codificam para catalases, catalases-peroxidases, NADPH oxidases, glutathione peroxidases, peroxirredoxinas e tioredoxinas (MARGIS *et al.* 2008; ROUHIER E JACQUOT 2002; ALKHALFIOUI *et al.* 2008). Uma classe específica de peroxidases em plantas (peroxidases classe III), também são membros desta rede e possuem uma capacidade interessante tanto de sequestrar EROS, quanto de produzi-las (PASSARDI *et al.* 2004).

No começo do processo infeccioso, as EROs podem se acumular rapidamente em um fenômeno conhecido como explosão oxidativa (LAMB E DIXON *et al.*, 1997). Essas moléculas podem agir causando danos diretos aos patógenos, através de seu efeito tóxico ou inibindo seu desenvolvimento, ou agindo como moléculas sinalizadoras que ativam múltiplas respostas de defesa (GADJEV *et al.* 2006). Sabe-se também que o acúmulo de EROs está associado ao fortalecimento da parede celular por favorecer a formação de ligações cruzadas entre proteínas estruturais (glicoproteínas ricas em prolina ou hidroxiprolina) à matriz de



JACKELINE LEITE PEREIRA

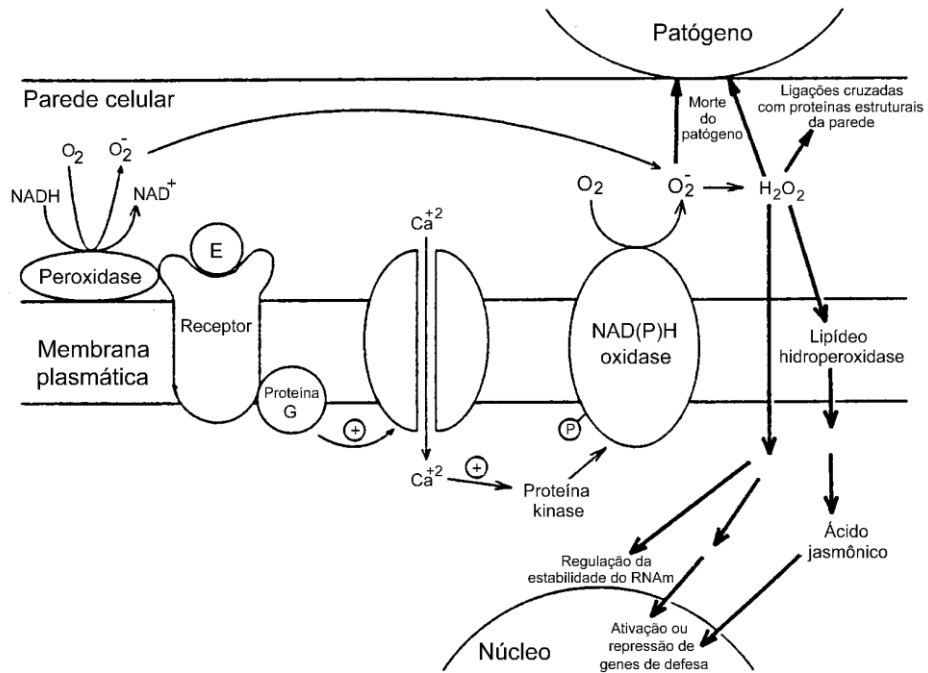
---

polissacarídeos (HAMMOND-KOSACK & JONES, 2003); ativação de resposta de hipersensibilidade (HR) associada à morte celular (GECHEV & HILLE, 2005); aumento na taxa de formação de polímeros de lignina, uma vez que o peróxido de hidrogênio participa da última reação da rota de síntese desta macromolécula (o substrato fenólico é oxidado a lignina, ao mesmo tempo em que o peróxido de hidrogênio é reduzido à água); além de o peróxido de hidrogênio também ser necessário para a biossíntese de ácido salicílico, potente sinalizador para a ocorrência de RSA, uma vez que este aumenta a atividade da enzima ácido benzóico-2-hidrolase (BA-2H), responsável pela conversão do ácido benzóico em AS (HAMMOND-KOSACK & JONES, 2003).

Durante as repostas de defesa ao ataque de um patógeno, a planta produz EROs e simultaneamente diminui sua capacidade de limpá-las, ocorrendo seu acúmulo e ativação da morte celular programada (MCP). Dessa forma, a supressão dos mecanismos detoxificadores é um fator crucial para o início da MCP (APEL & HIRT, 2004). Uma vez que em altas concentrações o peróxido de hidrogênio está implicado na indução de MCP e em pequenas quantidades pode funcionar como molécula sinalizadora, a habilidade do sistema de limpeza das células em detoxificar o excesso de ROS é um processo crucial para o início da sinalização através do peróxido de hidrogênio.

As EROs podem atuar de diferentes maneiras durante a resposta de resistência da planta. Atuam diretamente sobre o patógeno, inibindo seu desenvolvimento; fortalecem a parede celular por favorecer a formação de ligações cruzadas com proteínas estruturais; estimulam a peroxidação de lipídeos da membrana plasmática, fortalecendo sua integridade devido à redução da sua fluidez; o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), a espécie reativa de oxigênio mais estável e prontamente transportada através da membrana, pode regular a expressão de genes requeridos para a ativação da resistência ou pode formar ácido jasmônico, um mensageiro secundário, a partir da atividade da enzima lipídio hidroxidase presente na membrana plasmática (STANGARLIN, 2007) (Figura 6).

JACKELINE LEITE PEREIRA



**Figura 6:** Possíveis componentes envolvidos na geração de espécies ativas de oxigênio e seus efeitos sobre o patógeno ou sobre a ativação de mecanismos de defesa das plantas (adaptado de MEHDY, 1994)

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi analisar a interação entre o fungo micoparasita *T. harzianum* ALL 42, e feijoeiro comum na ausência ou presença dos fungos fitopatogênicos *F. solani* e *R. solani*, avaliando suas alterações fisiológicas e no padrão de expressão de proteínas em folhas e raízes.

### Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento de feijoeiro comum quando cultivado em solo inoculado e não inoculado com o isolado de *T. harzianum* ALL-42, analisando a altura das plantas, área das raízes e área foliar;
- Avaliar a produção de enzimas de defesa e expressão de genes correlatos em folhas e raízes de feijoeiro, cultivados na presença e ausência do isolado *T. harzianum* ALL-42;
- Construir mapas proteômicos de raízes e folhas de feijoeiro comum cultivado na presença ou ausência de *T. harzianum* ALL42 e dos fungos fitopatogênicos *F. solani* e *R. solani*, bem como identificar por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF os “spots” diferencialmente expressos.

## METODOLOGIA

### **Cultivo e manutenção dos microrganismos**

Os fungos fitopatogênicos *Fusarium solani* sp. *phaseoli* e *Rhizoctonia solani* sp. *phaseoli*, isolados de áreas de plantio de feijão, foram cedidos pelo pesquisador Murillo Lobo Júnior, da Embrapa Arroz-Feijão (CNPAF). O isolado de *T. harzianum* ALL 42 foi cedido pelo Professor Dr. Cirano José Ulhoa, e é mantido na coleção de Fungos da Universidade Federal de Goiás, Laboratório de Enzimologia. Para os fitopatógenos e *T. harzianum* ALL 42, foram feitos estoques a  $-80^{\circ}\text{C}$  das culturas iniciais em glicerol 20% (v/v), bem como mantidos com repiques periódicos em meio MYG (“malt yeast glucose”) e estocados a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **Análises da promoção de crescimento por *T. harzianum* ALL 42**

De forma a avaliar a capacidade de *T. harzianum* ALL 42 em colonizar as raízes das plantas de feijoeiro e conseqüentemente atuar como promotor de crescimento, 30 plantas das condições controle (TT) e crescidas com ALL 42 (42T), crescidas por 21 dias foram avaliadas quanto aos parâmetros altura, área radicular e área foliar. Este experimento foi realizado em triplicata, totalizando 90 plantas avaliadas. Para validar os dados obtidos, foi realizado o teste de *t-student*, com  $p \leq 0,05$ .

### **Preparo de *T. harzianum* para inóculo nas sementes de feijoeiro**

Os conídios de *T. harzianum* ALL-42 foram produzidos em arroz parboilizado. Em frascos cônicos de 250 mL, 100 g de arroz, foram umedecidos com 25 mL de água destilada e autoclavados por 20 minutos a  $120^{\circ}\text{C}$ . Após resfriamento, nestes foram adicionados 3 discos de micélio de 5 mm do isolado ALL-42. Os frascos foram mantidos a  $28^{\circ}\text{C}$  por sete dias com fotoperíodo de 12 horas luz/escuro. Para a contagem e coleta dos conídios, 100 mL de água destilada esterilizada foram

JACKELINE LEITE PEREIRA

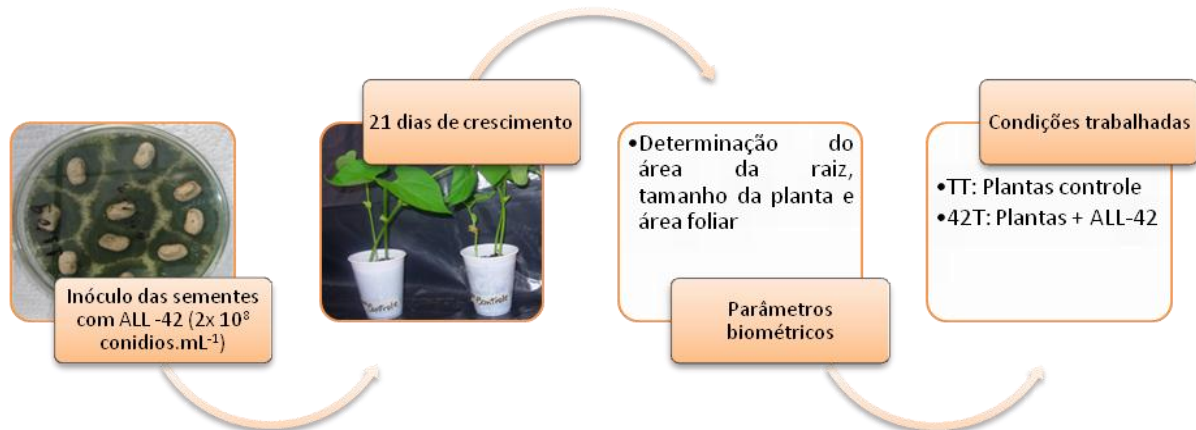
---

adicionados aos grãos, agitando-os bem para a completa soltura dos conídios. Uma alíquota foi retirada deste preparo para a contagem de conídios em um hemancitômetro, para uma contagem final de  $2,4 \times 10^{-9}$  conídios. mL<sup>-1</sup>.

### **Plantio das sementes de feijoeiro e coleta das plantas**

Sementes de feijão comum da variedade susceptível Pérola, foram previamente esterilizadas submergindo-as por 1 minuto em hipoclorito de sódio 1% (v/v) e lavando-as com água destilada autoclavada por duas vezes. O substrato para cultivo Plantmax<sup>®</sup>, foi previamente esterilizado por 30 minutos em autoclave. Após 24 hs, foi acondicionado em copos de plástico de 500 mL em câmara de fluxo laminar. Para cada copo de 500 mL contendo solo estéril, duas sementes foram plantadas de 2-3 cm de profundidade no solo, e em seguida, pipetados  $2,4 \times 10^8$  conídios. mL<sup>-1</sup>, de *T. harzianum* sobre estas sementes. Após o inóculo das sementes em solo contendo ou não *T. harzianum*, os copos foram mantidos na casa de vegetação da Universidade de Brasília, em temperatura e umidade ambientes, por 21 dias. Este experimento foi repetido por três vezes, cada um com 30 plantas, totalizando 90 plantas analisadas para os parâmetros de altura, área foliar e área radicular.

Após 21 dias de crescimento, as plantas foram retiradas dos copos plásticos, e suas raízes lavadas com água corrente até a completa retirada do substrato. Após o procedimento de medida das plantas e digitalização das folhas feita no Image scanner III (GE healthcare), para determinação da área foliar, as mesmas foram lavadas com água destilada autoclavada. O tamanho das plantas foi medido utilizando-se régua milimetrada, a área das raízes foram determinadas utilizando-se o software WhinRHIZO<sup>®</sup> e a determinação da área foliar em cm<sup>2</sup> foi realizada utilizando-se o software gratuito Image J a partir das imagens digitalizadas. Estas medidas foram realizadas com um número total de 30 plantas para cada experimento, que foi realizado em triplicata. Este experimento está esquematizado na Figura 7.



**Figura 7:**Esquema mostrando a etapa de análise de promoção de crescimento das plantas de feijoeiro e ALL 42.

### **Análise da produção de enzimas e expressão de genes de resposta de defesa na presença de *T. harzianum* ALL 42 e os fitopatógenos**

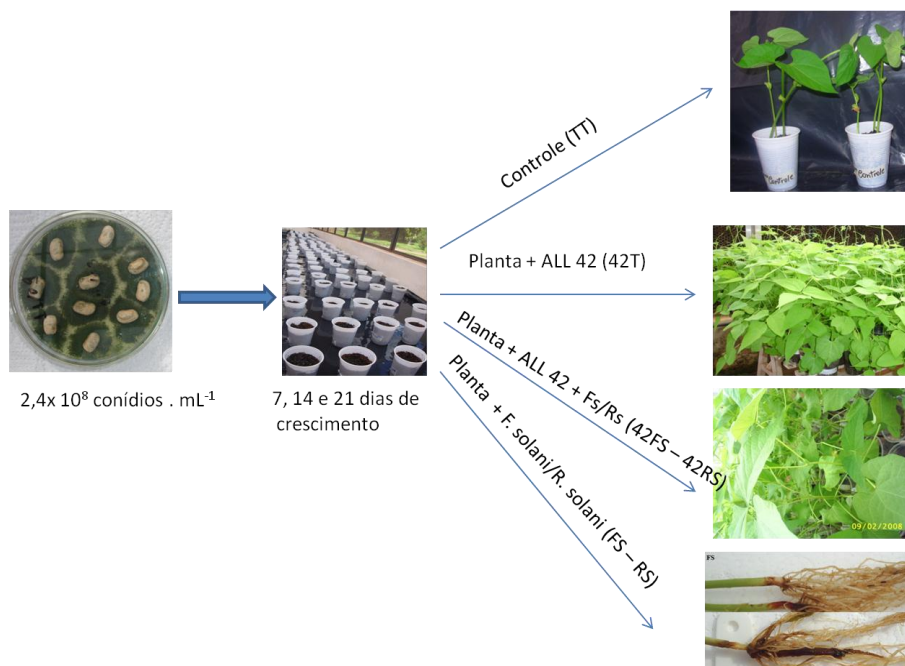
#### *Preparo dos fungos fitopatogênicos para infestação do solo*

Grãos de sorgo e água destilada, na relação 2:1 (m/v), foram colocados em 2 frascos cônicos de 500 mL, posteriormente cobertos com papel alumínio, e autoclavados a 120°C por trinta minutos por duas vezes. Em câmara de fluxo laminar, dez discos de micélio de cada um dos fungos fitopatogênicos (5 mm de diâmetro) foram transferidos para os frascos contendo o sorgo esterilizado e, em seguida, foram incubados a 24°C, durante doze dias, até a completa colonização do substrato. A massa de sorgo colonizada foi desagregada com o auxílio de uma espátula estéril, e os grãos distribuídos em bandejas estéreis de alumínio e secos ao ar livre. Depois de seco, cada inóculo (*R. solani* e *F. solani*) foi triturado em liquidificador e passado por uma peneira de 0,84 mm de abertura (20 mesh).

JACKELINE LEITE PEREIRA

*Preparo do solo para infestação com os fitopatógenos*

Sacos plásticos resistentes a altas temperaturas contendo 1,4 kg cada de substrato para plantio Plantmax<sup>®</sup>, foram previamente esterilizados em autoclave, por 30 minutos. Após 24 horas, o solo contido em cada saco, foi transferido para novos sacos plásticos para a infecção com os fitopatógenos *R. solani* ou *F. solani*. Para cada 1,4 kg de solo, foram adicionados, respectivamente, 0,5 g do preparo de *R. solani*, e 0,8 g do preparo de *F. solani*, de acordo com a metodologia descrita por TOLEDO-SOUZA *et al.*, 2009. O solo infestado foi acondicionado em copos plásticos de 500 mL em câmara de fluxo laminar, para o plantio de sementes tratadas ou não com *T. harzianum* ALL 42. Para este experimento, 15 plantas foram coletadas aos sete dias de crescimento, 15 plantas coletadas aos quatorze dias de crescimento e 15 plantas coletadas aos 21 dias de crescimento, totalizando em 45 plantas, que foram lavadas com água destilada e deionizada estéril até a completa remoção de resíduos, e por fim estocadas inteiras a -80°C até a utilização para a dosagem de quitinases, peroxidases e  $\beta$  1,3 glucanases e extração de RNA. O delineamento deste experimento está esquematizado na Figura 8.



**Figura 8:** Esquema mostrando o delineamento do experimento para análise da produção de enzimas de defesa quando *T. harzianum* ALL 42, *F. solani* e *R. solani* presentes.

### *Processamento e extração de proteínas*

Raízes e folhas das plantas correspondentes a cada um dos tratamentos foram trituradas com nitrogênio líquido, em um triturador industrial de alimentos, até a obtenção de um fino pó, transferidas para tubos Falcon de 25 e 50 mL e estocadas a -80°C.

### *Quantificação de proteínas totais para atividade enzimática*

Para a determinação da concentração de proteínas e quantificação da atividade enzimática das plantas crescidas em 7, 14 e 21 dias, 2 gramas do macerado de raízes e folhas foram homogeneizados em 1 mL de água destilada estéril contendo 2mM de PMSF. A suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante utilizado como fonte de proteínas. A concentração de proteínas foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão.

### *Quantificação da atividade de enzimas de defesa*

#### *Quitinases*

A atividade quitinolítica foi determinada, baseada na quantificação colorimétrica de *p*-nitrofenol liberado a partir do substrato sintético *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-N,N9-diacetilquitobiose, como descrito por Yedidia e colaboradores, 1999. Para tanto, 250  $\mu$ L do extrato das amostras foi incubado com 10 $\mu$ L de uma solução estoque do substrato sintético (2 mg. mL<sup>-1</sup>) e 250  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5.0 por 2 horas em banho-maria a 37°C. A reação foi interrompida com 0,5 mL de carbonato de sódio 0,2M, e a absorbância determinada a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de PNP por minuto de reação por grama de tecido.



JACKELINE LEITE PEREIRA

---

### *Peroxidases*

A atividade de peroxidases foi determinada de acordo com Yedidia e colaboradores, 1999. A reação contendo 20 $\mu$ L das amostras, 50 $\mu$ L de vermelho de fenol (0,2%) (m/v), e 300 $\mu$ L de tampão citrato de sódio 50mM, pH 4.2, foi pré-incubada a 37°C. As reações foram iniciadas com 40  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio 1mM e interrompidas após 3 minutos pela adição de 40  $\mu$ L de hidróxido de sódio 2M. A absorbância foi determinada a 610nm. A atividade de peroxidases foi expressa em milimoles de vermelho de fenol oxidado por grama de tecido por minuto.

### *$\beta$ -1,3 glucanases*

A atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases foi determinada conforme descrito por Noronha & Ulhoa (2000), com algumas modificações. Para tanto, foram utilizados 250 $\mu$ L do substrato laminarina a 0,5% (m/v) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e 125 $\mu$ L do extrato de cada amostra. Os tubos foram incubados a 45°C por 2 horas e a reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL do reagente de dinitrossalicilato (DNS). Em seguida, os tubos foram incubados por 5 minutos em banho fervente, e a absorbância determinada a 550nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de glicose por minuto de reação.

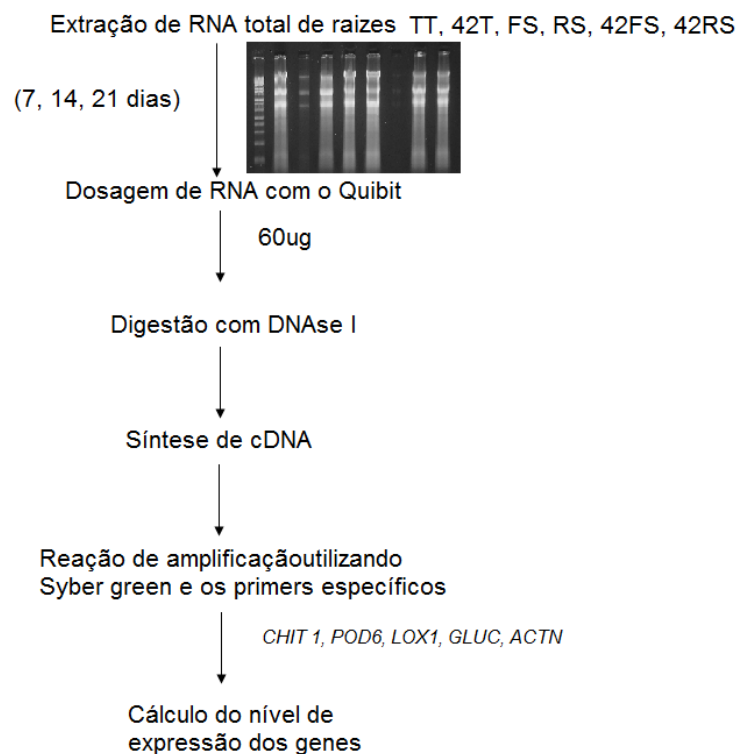
## **Análise da expressão de genes de defesa de feijoeiro**

O padrão de expressão de genes de defesa de raiz de feijoeiro comum foi avaliado utilizando análise em RT – qPCR. As sequências de oligonucleotídeos para amplificar genes PR foram desenhados com base nas sequencias de feijoeiro disponíveis no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). A expressão de quatro genes foi analisada utilizando os oligonucleotídeos para amplificação dos genes: Chitinase Classe 1 CHT (AY357300.2),  $\beta$  1, 3 glucanase

JACKELINE LEITE PEREIRA

GLU (DQ093563.1), peroxidase POD (AF 485265.1) e Lipoxigenase LOX1 (U76687.2.) (Tabela 2)

O RNA total das raízes de feijoeiro foi extraído utilizando o kit Invisorb® RNA kit II partindo de 100mg de tecido macerado e seguindo procedimento recomendado pelo fabricante. Foram extraídos RNAs de seis amostras em três diferentes tempos de crescimento (7, 14 e 21 dias) nos tratamentos TT, 42T, 42FS, 42RS, FS e RS (Figura 9).



**Figura 9:** Esquema mostrando as etapas de análise da expressão de genes feitas para raízes de feijoeiro nas 6 condições descritas. TT: controle, 42T, planta + ALL 42, 42FS: Planta+ALL42+*F. solani*, 42RS: Planta+ALL42+*R. solani*, RS: Planta + *R. solani*, FS: Planta ++ *F. solani*.

JACKELINE LEITE PEREIRA

**Tabela 2:** Lista de nucleotídeos utilizados para RT-qPCR.

Oligonucleotídeos qPCR (5' → 3')				
Gene	Nº Acesso	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	Tamanho amplicon (bp)
CHIT 1	AY357300.2	CGGCACTGTGACGAACATCATCAA	AAGAATCCGATGCGGTCTTGAACC	84
GLU	DQ093563.1	AATCAAGCAGCTCTGCAAGCACTC	AAGTTCAGCACGTTCTTTGCACC	134
POD	AF485265.1	TTGTTATTCTTGGAGGGCCCGACT	TGGCTAAGATTGGCACTACCCAGT	118
LOX1	U76687.2	TGCTTGCTGGTGTTAATCCTTGCC	AATGCCTCTTCCACAGTGAGTCCA	154
ACTIN	EU581898.1	AAATCCTGACCGAGCGTGGTTACT	TTGGCAGTTTCCAATTCCTGCTCG	121

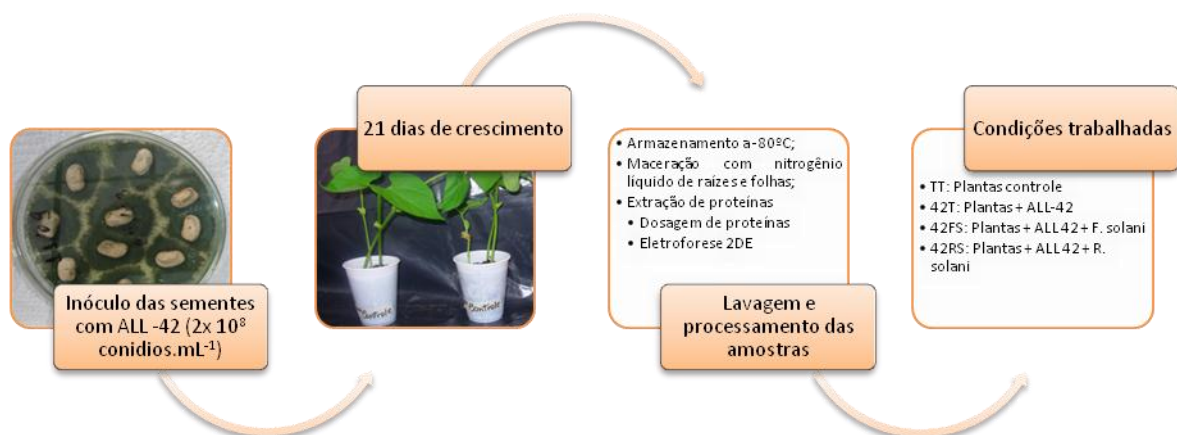
Antes de sua utilização na síntese de cDNA o RNA total extraído foi digerido com DNase I (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante (Figura 9). Para a síntese de cDNA, foi utilizado o kit *Revertaid™ First Strand cDNA synthesis kit* (Fermentas) de acordo com instruções do fabricante. As reações foram da qPCR foram realizadas utilizando o sistema iQ5 real time PCR (BioRad). Para cada reação com volume final de 20 µl foram utilizados 10 µl de MAXIMA® SYBR-green PCR Master mix (Fermentas), 500 nM de oligonucleotídeos *forward* e *reverse*, e o cDNA sintetizado como descrito acima. A reação de amplificação foi realizado seguindo o protocolo: 10 minutos a 95°C (1 ciclo), 15 segundos a 95°C seguido de 1 minuto a 60°C (40 ciclos), uma curva de *melting* de 1 minuto a 95°C (1 ciclo), seguido de 30 s a 55 °C e uma rampa final de 95°C (1 ciclo) foi feita para teste de especificidade de *primers*. O transcrito de β-actina (EU581898) foi utilizado como referencia para normalizar a quantidade de RNA total presente em cada reação. O nível de expressão dos genes foi calculado de acordo com o método de LIVAK E SCHMITTGEN, 2001.

Os experimentos foram feitos em triplicata com 3 repetições para cada amostra e os resultados comparados por ANOVA (one way), seguido do teste de Dunnett's (α = 5 %), para analisar as diferenças entre as condições, relacionadas ao controle, utilizando GraphPad Prism v 5.00 para Windows. RT-qPCR foi feito para as raízes das seis condições descritas acima, nos três diferentes tempos de crescimento.

JACKELINE LEITE PEREIRA

### Análises da expressão de proteínas de folhas e raízes de feijoeiro na presença/ausência de *T. harzianum* ALL 42, *F. solani* e *R. solani*.

A avaliação do padrão de expressão de proteínas em gel bidimensional foi feita com plantas de feijoeiro na presença/ausência de *Trichoderma* e os fitopatógenos, nas condições TT, 42T, 42FS e 42RS, aos 21 dias de crescimento, das plantas cujos plantio e coleta foram realizados de acordo com o item 3.3. Neste experimento para extração de proteínas, foram utilizadas raízes e folhas de 10 plantas para cada triplicata realizada, totalizando 30 plantas. O delineamento deste experimento está esquematizado na Figura 10.



**Figura 10:** Esquema mostrando o delineamento do experimento para análise da expressão de proteínas por eletroforese 2DE na presença/ausência de *T. harzianum* ALL 42, *F. solani* e *R. solani*.

### Extração de proteínas e eletroforese bidimensional

A extração de proteínas de folhas e raiz de feijoeiro foi realizada de acordo com NATARAJAN *et al.*, 2005. Um grama de tecido pulverizado foi ressuspensão em 25 mL de TCA a 10% (m/v) em acetona e contendo 0,007% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol. As amostras foram incubadas a 4°C por 3 horas. Em seguida, foram centrifugadas a 10.000 x g por 20 minutos, e o sobrenadante descartado. Foram realizadas mais 2 a 3 lavagens com 25 mL de TCA 10% em acetona até que todo o

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

pigmento fosse removido dos tecidos, seguida de mais uma lavagem com 25 mL de TCA 10% (m/v) em água destilada e lavagem com acetona gelada contendo 1mM do inibidor de proteases PMSF (“phenylmethylsulfonyl fluoride”). As condições de centrifugação para as lavagens foram as mesmas do procedimento de precipitação.

Ao final do processo de precipitação e lavagem das amostras estas foram ressuspendidas em 5 mL de tampão de re-hidratação sem azul de bromofenol ( p/v: 8M de uréia, 2M de tiouréia, 0,5% (m/v) de CHAPS e 0,002% (v/v) de anfólitos). A concentração de proteínas foi determinada utilizando-se o 2DE *quant kit Amershan biosciences*, conforme instruções do fabricante.

### **Eletroforese bidimensional**

Alíquotas das amostras contendo 500µg de proteínas foram transferidas para um novo tubo, completadas para 500 µL, com o reagente “De-streak” (GE healthcare) e aplicadas em tiras de gradiente de pH 3-10 de 18 cm (amostras de raiz) e 24 cm (amostras de folha). As tiras embedidas com as amostras foram mantidas por 16 horas a temperatura ambiente. Após este período, foram então utilizadas na focalização isoeletrica utilizando o aparelho “IPGphor III” (GE healthcare) e seguindo o protocolo: 500 V por 1h, 1000 V por 1h, 3000 V por 3 hs e 8000V até 70.000Vh, totalizando em torno de 18 horas de focalização tanto para amostras de raiz, quanto para amostras de folha. Após sua focalização, foram imediatamente estocadas a -80°C até a realização da segunda dimensão.

Para focalização, foram adicionados 2,5 ml de tampão de equilíbrio [Tampão Tris- HCl pH 8,8 50 mM, Uréia 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 30% (m/v) e traços de azul de bromofenol] contendo 0,1 g de ditiotretitol, às tiras, e estas incubadas sob agitação por 15 minutos. Em seguida, a solução foi descartada e 2,5 ml de tampão de equilíbrio contendo 0,25 g de iodoacetamida foram adicionados, e novamente foram colocadas sob agitação por 15 minutos.

Após este período, a solução foi descartada, e as tiras dispostas sobre o gel de poliacrilamida a 12,5% (m/v), cobertas com uma solução de agarose (agarose

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

0,5% (m/v), tampão de corrida 1X [Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 % (m/v)] e traços de azul de bromofenol). Após a solidificação da agarose, a segunda dimensão foi realizada utilizando dois passos: corrente de 10 mA/gel por 1 h e corrente de 40 mA/gel. A temperatura do sistema foi mantida em 15 °C. A eletroforese foi realizada em géis de 25,5 cm x 20,5 cm x 0,15 cm utilizando a cuba “ETTAN DALT SIX” acoplada ao sistema de circulação termostática MultiTemp III para controle da temperatura (GE Healthcare). Os géis resultantes foram corados com azul de Comassie G-250 de acordo com a metodologia descrita por Candiano e colaboradores (2004).

### **Análise dos mapas proteicos**

As triplicadas dos géis obtidos em todas as condições: TT, 42T, 42FS e 42RS, foram digitalizadas utilizando o “ImageScanner III” previamente calibrado de acordo com manual do fabricante (GE Healthcare). A análise destas imagens foram realizadas utilizando o software “ImageMaster™ 2D Platinum v 7.0” (GE Healthcare) com os seguintes parâmetros para detecção dos “spots” suavidade de 10 (*smooth*), saliência: 40 e área mínima de 70. Os “spots” foram marcados inicialmente em modo automático, seguido de marcação manual. Os falsos “spots”, como manchas no gel, foram excluídos da análise. A análise das réplicas correspondentes ao mesmo tratamento e diferentes tratamentos foi realizada utilizando-se um “spot” como ponto de referência, e denominado “landmark”, bem como os marcadores de massa molecular. Os “spots” comuns entre as 4 condições, com valor de diferença de expressão maior que 1,5, e os “spots” exclusivos para cada condição foram escolhidos para a etapa de identificação por espectrometria de massa. Para validação dos volumes dos “spots”, foi utilizado do teste de ANOVA, através do “software Image master”.

## Identificação das proteínas selecionadas por espectrometria de massa

### Digestão triptica dos “spots”

Os “spots” selecionados para a identificação, foram recortados do gel, transferidos para microtubos de 1,5 mL e submetidos à digestão triptica de acordo com Paba *et al.*, 2004. Brevemente, os “spots” foram lavados 3x com 200  $\mu$ L de água ultrapura e 200  $\mu$ L de acetonitrila a 50% (v/v). Em seguida, foram realizados mais 2 ciclos de lavagem com 200  $\mu$ L de bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) 50 mM, e acetonitrila 100%. Na última lavagem com acetonitrila, o gel foi cuidadosamente macerado com um pistilo estéril. A acetonitrila excedente foi retirada e as amostras secas à vácuo por 20 minutos. Após este tempo, os pedaços de gel foram reidratados por 45 minutos no gelo, com 5-10  $\mu$ L de solução contendo tripsina ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25mM,  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM contendo 12.5 ng/ $\mu$ L de tripsina “gold” para espectrometria de massa da Promega). O excedente da solução com tripsina foi retirado, os pedaços de gel foram recobertos com 5-8  $\mu$ L de solução contendo  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25mM e  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM, e incubados a 37°C por aproximadamente 16 horas. A reação foi interrompida pela adição de 1 $\mu$ L de TFA 1% (v/v) em cada tubo de digestão.

### Espectrometria de massa em MALDI/ToF

Para a obtenção dos espectros de *Peptide mass fingerprinting* (PMF) em espectrômetro de massa (Autoflex II, Bruker Daltonics, Alemanha), 1 $\mu$ L do produto de cada digestão, foi pipetado em um dos poços de uma placa AnchorChip™ (600 nm, Bruker). Em seguida à aplicação da amostra foram adicionados 0,5  $\mu$ L da matriz (DHB-2,5-“dihydroxybenzoic acid” na concentração de 5  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) preparada em acetonitrila a 30% (v/v) e TFA a 0,1% (v/v). A calibração externa foi feita utilizando padrões de peptídeos de massa conhecida (angiotensina, ACTH 1-17 e ACTH 18-39) e como modo de calibração interna, foram utilizados picos de autólise da tripsina (842,50 Da e 2211,10 Da), quando presentes. Após a calibração interna, os picos de

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

matriz e de queratina, foram excluídos manualmente, utilizando o programa FlexAnalysis 2.2 para a obtenção das listas de peptídeos. Estas foram então utilizadas na identificação das proteínas utilizando o software MASCOT ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), com o auxílio da ferramenta Biotoools 2.2, utilizando banco de dados não redundante de proteínas do NCBI (nrNCBI), dentro do táxon *Viridiplantae*, acurácia de massa monoisotópica de 100 ppm, modificações variáveis: acetilação N-terminal de proteínas e oxidação de metionina, e modificação fixa, a carboximetilação.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análises da promoção de crescimento por *T. harzianum* ALL 42

As plantas cultivadas na presença do isolado ALL 42 apresentaram aumento no crescimento de 14,29% quando comparadas com as plantas controle (Tabela 3). Para área foliar, a diferença entre plantas controle, e plantas tratadas com ALL-42 foi de 16 cm<sup>2</sup> (17,72%), na comparação entre os volumes das raízes estas diferenças foram as mais significativas com uma diferença de 222,67cm<sup>3</sup> (36,31%) entre plantas controle e tratadas com ALL42 (Tabela 3 e Figura 11).

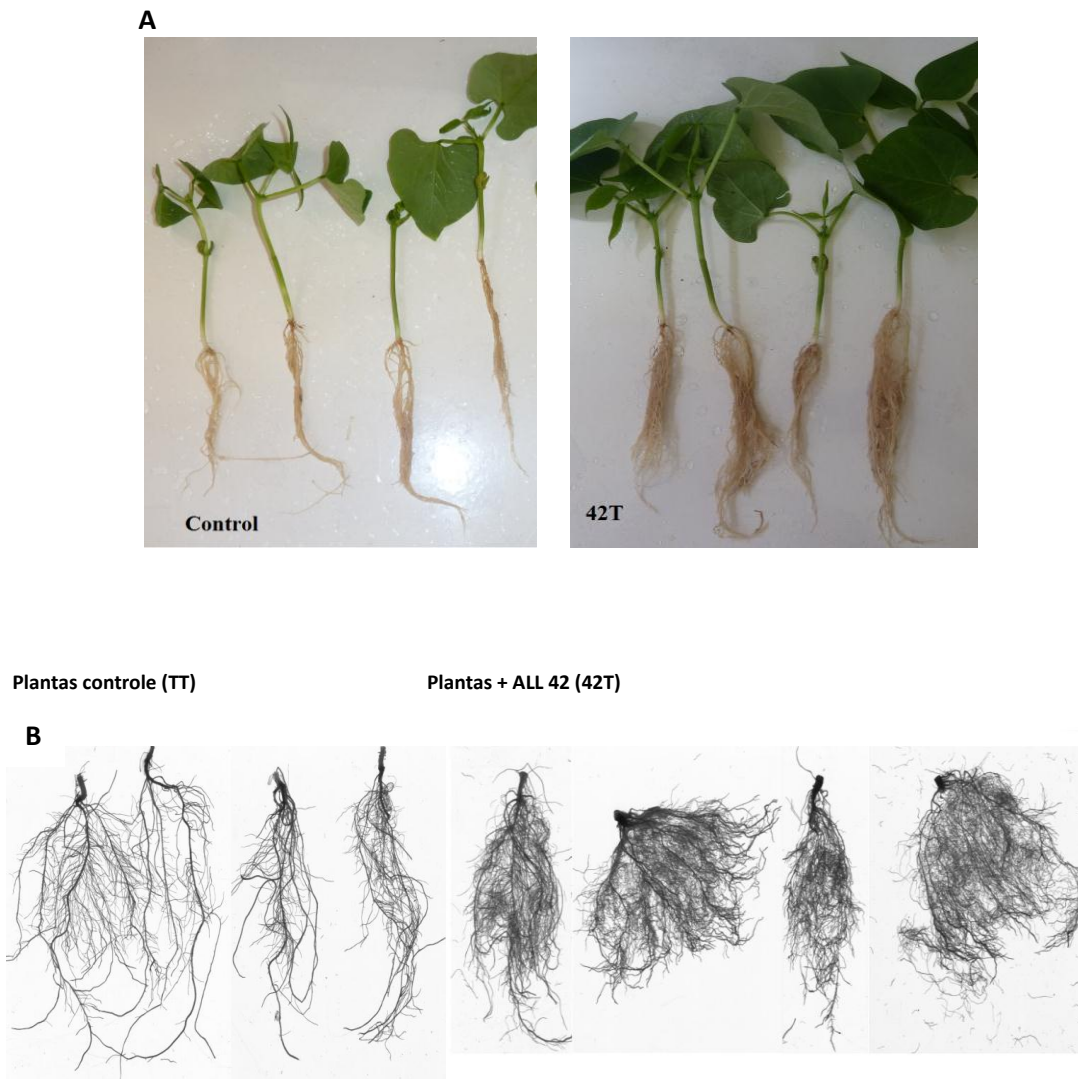
A promoção de crescimento de raízes, assim como o aumento de sua área com a formação de raízes secundárias, tem sido descritos como fatores críticos para o aumento da capacidade de obtenção de nutrientes e água, bem como na fixação da planta hospedeira no solo. Em experimentos com *T. harzianum* T-22, Harman e colaboradores demonstraram que essa cascata de eventos que acontece na planta após a colonização de *Trichoderma*, também favorece a capacidade fotossintética da mesma, já que, o estímulo de crescimento da planta é acompanhado pelo crescimento e desenvolvimento das folhas e raízes (HARMAN *et al.*, 2004).

**Tabela 3:** Avaliação do tamanho, área foliar e volume de raízes de feijoeiro comum após crescimento por 21 dias na presença ou ausência do isolado de *T. harzianum* ALL-42.

Parâmetros analisados	TT Controle	42T Planta + ALL 42	p value (teste t-student)
Tamanho da planta (cm)	28.733± 3.45	33.167±2.29	0.002
Área foliar (cm <sup>2</sup> )	74.156± 15.44	90.275± 17.05	0.019
Área das raízes (cm <sup>2</sup> )	391.189± 69.88	613.859± 115.80	0.003

Valores expressos por média ± desvio padrão

JACKELINE LEITE PEREIRA



**Figura 11:** Plantas de feijoeiro cultivadas na ausência (TT) e na presença do isolado de *T. harzianum* ALL 42 (42T) em A e registro dos volumes das raízes em B.

Espécies de *Trichoderma* já foram descritas como promotoras do crescimento de plantas podendo levar ao aumento da área foliar e do peso fresco da planta (CHÁCON *et al.*, 2007). Filho e colaboradores, em 2008 analisaram a promoção de crescimento em mudas de *Eucalyptus urophylla* e clones híbridos G-100 (*E. grandis* x *E. urophylla*) utilizando isolados de *Trichoderma* spp. Para as plantas cultivadas na presença dos isolados CEN 162 (*T. asperellum*) e CEN 262 (*T. harzianum*) foram observados aumentos nas massas secas de raízes e parte aérea, com incrementos médios de até 136% do peso seco da raiz e parte aérea, quando comparados ao controle (FILHO *et al.*, 2008).

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

Alterações no padrão de crescimento de plantas hospedeiras em função da presença de fungos do gênero *Trichoderma*, já foram descritas também para plântulas de *Zea mays* cultivadas na presença de *Trichoderma* sp. As plantas analisadas apresentaram aumento na área e tamanho das raízes, e este foi acompanhado pelo aumento na produção de grãos (BJORKMAN *et al.*, 1998). Resultados semelhantes também já foram descritos na interação, *Arabidopsis/T. virens* sendo verificado o aumento de biomassa da raiz (CONTRERAS-CORNEJO *et al.*, 2009), estando de acordo com os resultados obtidos neste estudo entre ALL-42 e feijoeiro comum. Ainda no trabalho de Contreras-Cornejo e colaboradores, sugere-se que a auxina tem um forte papel na promoção do crescimento em plantas, através do desenvolvimento de raízes laterais e desenvolvimento de pêlos radiculares. Foi observado o papel da auxina no crescimento de *Arabidopsis* através da utilização de marcadores deste hormônio em plantas inoculadas e não inoculadas com estas duas espécies de *Trichoderma*. Mostraram também, que *T. virens* é capaz de estimular a produção de compostos indólicos como o ácido indol 3 acético (IAA), ácido indol-3- acetaldéido (IAALD) e indol-3-etanol (TRI), que desempenham papéis na mediação de promoção de crescimento da planta, feita por *T. virens* (CONTRERAS-CORNEJO *et al.*, 2009).

A promoção de crescimento de plantas hospedeiras por espécies de *Trichoderma* já é conhecida, no entanto o mecanismo pela qual ocorre ainda é pouco estudado. Neste trabalho, a interação com o isolado de *T. harzianum* ALL 42 foi testada, e os resultados obtidos demonstraram a capacidade de ALL42 em colonizar a raiz das plantas de feijoeiro, promovendo aumento em seu tamanho, área foliar e volume radicular, demonstrando sua capacidade de ser uma agente capaz de induzir promoção de crescimento e de ser rizosfera-competente em *P. vulgaris*.

### **Avaliação da produção de enzimas de defesa**

A capacidade do isolado *T. harzianum* ALL 42 de induzir resposta de defesa local e sistêmica em feijoeiro foi monitorada pela quantificação da atividade das enzimas de defesa, ou proteínas PR:  $\beta$ -1,3 glucanases, peroxidases e quitinases em folhas (Figura 12) e raízes (Figura 13) de feijoeiros cultivados na presença ou ausência do fungo micoparasita, bem como na presença dos fungos fitopatogênicos *F. solani* e *R. solani* em 7, 14 e 21 dias de crescimento (Figuras 12 e 13).

Apenas na presença do isolado de *Trichoderma* não foram observados aumentos significativos nas atividades das enzimas de defesa, quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases e peroxidases em folhas. Este aumento só foi significativo na presença dos fungos fitopatogênicos como observado para a atividade quitinolítica para as folhas de plantas cultivadas por 14 dias na presença do fungo fitopatogênico *R. solani* (Figura 12A). Assim como, para a atividade de  $\beta$ -1,3 glucanases nesta mesma condição, mas após 7 dias de crescimento (Figura 12B). Para a atividade de peroxidase também foi observado um aumento para plantas cultivadas por 21 dias na presença de *R. solani*, mas neste caso observa-se também um incremento desta atividade para o tratamento duplo, *Trichoderma/R. solani*, inclusive para o tempo de cultivo de 14 dias (Figura 12A). Estes resultados sugerem que a presença do isolado ALL42 pode atuar, na potencialização da resposta de defesa contra o fitopatógeno, através do aumento da atividade de peroxidase, quando o fitopatógeno está presente.

Para as análises das atividades de amostras de raízes observou-se aumento de todas as atividades na presença do isolado de *Trichoderma*, além disto, o aumento foi mais significativo nos duplos tratamentos *Trichoderma*/fungos fitopatogênicos em comparação com as atividades obtidas apenas na presença dos fitopatógenos (Figura 13). Sugerindo que o isolado de *Trichoderma* é capaz de induzir a resposta de defesa da planta, no entanto esta resposta é localizada. Além disto, novamente é observada ação do micoparasita como um potencializador da resposta de defesa da planta hospedeira.

Os valores de atividade enzimática foram mais significativos para os tratamentos com o fungo fitopatogênico *R. solani* em comparação com a espécie *F. solani*. Toledo-Souza, 2009 afirma que os sintomas causados por *R. solani* pode ser

## JACKELINE LEITE PEREIRA

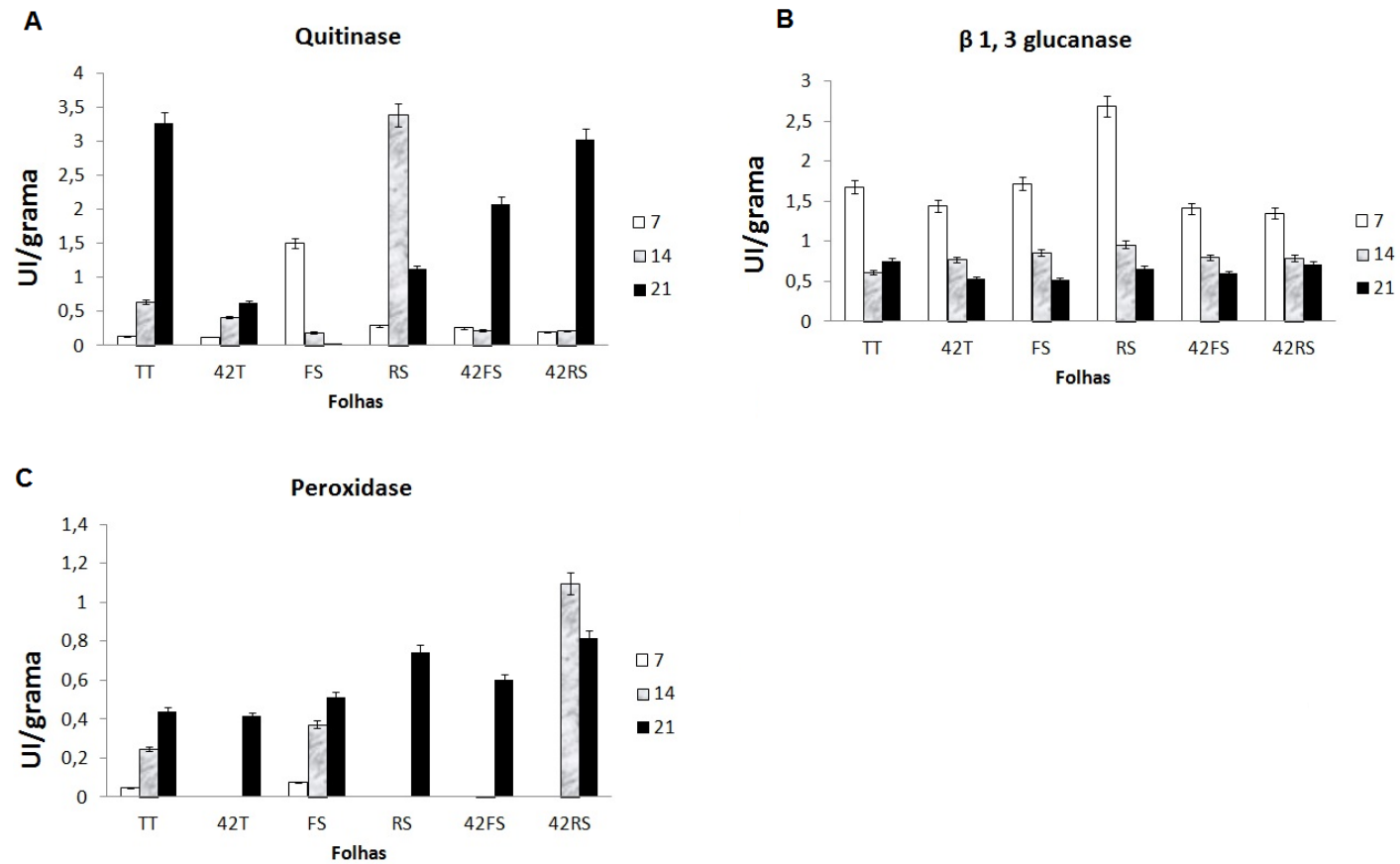
---

mais severo do que os sintomas causados por *F. solani*, entretanto, quando os dois são testados juntos, um potencializa a atuação do outro. O aumento na produção destas enzimas de defesa em função da presença destes fungos fitopatogênicos já foi anteriormente descrita como no trabalho de Vieira e colaboradores, em 2010, que avaliaram a atividade de peroxidases, quitinases e glucanases em mudas de *Vigna unguiculata* (feijão de corda), na presença do fungo fitopatogênico *F. oxysporum*, em suas primeiras horas de infecção (24 a 96 hs).

Ao investigar a habilidade de *Bacillus thuringiensis* em induzir resistência a *R. solani* em pepino, foi detectada alta atividade de quitinases e  $\beta$  1,3 glucanases em plântulas com *R. solani* após 4 e 5 dias de infecção, respectivamente (SEO *et al.*, 2012).

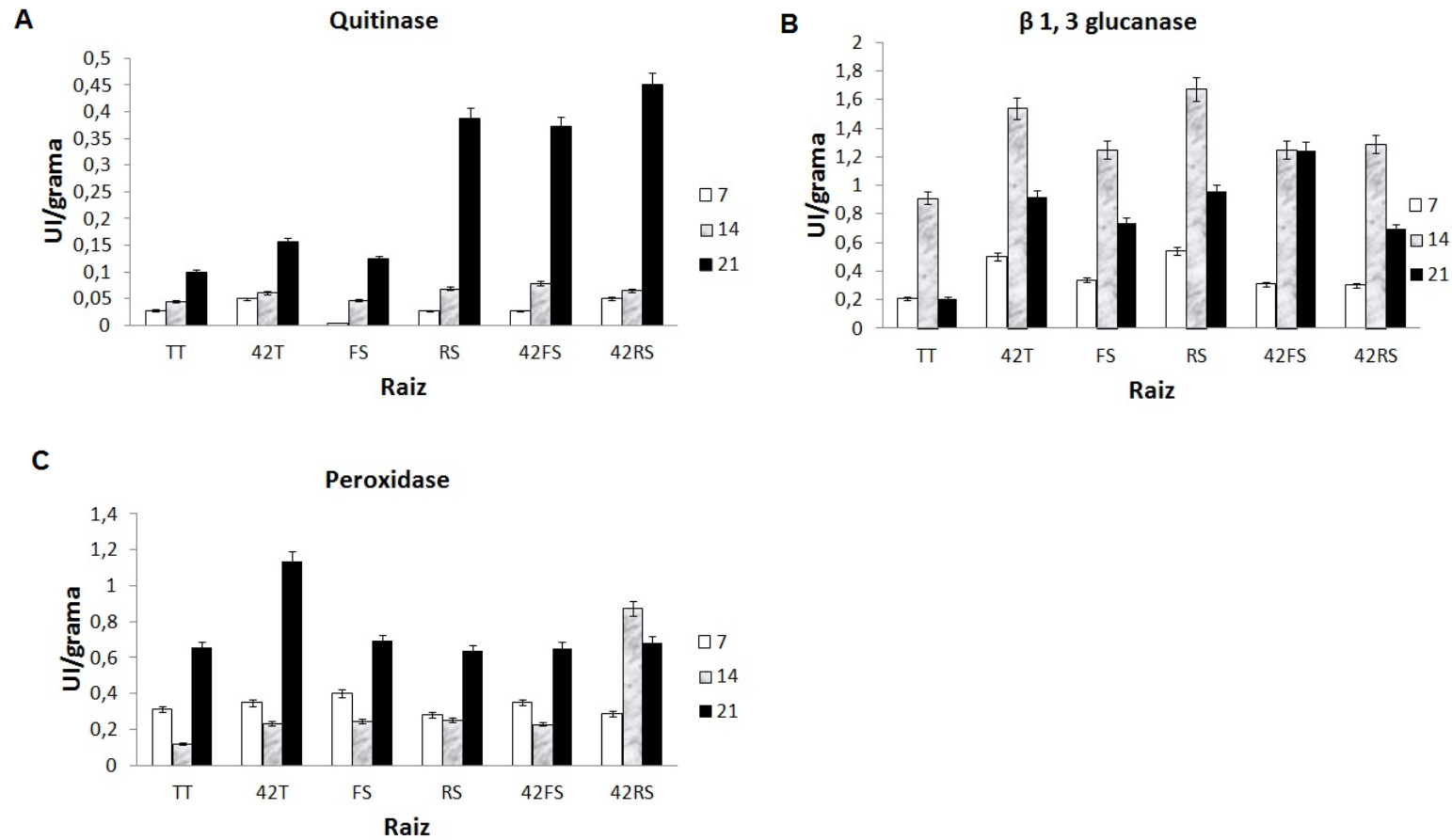
Recentemente, estudos com *Phoenix dactylifera* na interação com as bactérias, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Burkholderia cepacia*, utilizadas para controle biológico de *F. oxysporum*, mostraram aumento de até 180% na atividade de peroxidases em raízes infiltradas com as bactérias e *F. oxysporum*. Este aumento na atividade também foi observado e raízes infiltradas com apenas as bactérias (DIHAZI, *et al.*, 2012), corroborando com os resultados encontrados neste estudo. Resultados similares foram encontrados anteriormente na resposta de tomateiro infestado com o vírus da necrose do tabaco e pepino na interação com rhizobactéria (ANFOKA, *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 2000).

JACKELINE LEITE PEREIRA



**Figura 12:** Atividades de Quitinasas (A),  $\beta$  1,3 glucanases (B) e Peroxidases (C) em folha de feijoeiro nas condições TT (controle); 42T (Planta+ ALL 42); 42FS (Planta + ALL 42+ *F. solani*); 42RS (Planta + ALL 42 + *R. solani*); FS (Planta + *F. solani*) e RS (planta + *R. solani*)

JACKELINE LEITE PEREIRA



**Figura 13:** Atividades de Quitinases (A),  $\beta$  1,3 glucanases (B) e Peroxidases (C) em raiz de feijoeiro nas condições TT (controle); 42T (Planta+ ALL 42); 42FS (Planta + ALL 42+ *F. solani*); 42RS (Planta + ALL 42 + *R. solani*); FS (Planta + *F. solani*) e RS (Planta + *R. solani*)

O mecanismo de modulação de resposta de defesa por *Trichoderma* parece depender desse isolado, bem como da espécie de planta hospedeira, pois outros autores já demonstraram a resposta sistêmica de produção de enzimas de defesa desencadeada em função da associação com estes fungos. Como por exemplo, para a interação com *V. unguiculata* e pepino, nas quais atividades significativas de  $\beta$ -1,3 glucanases e peroxidases foram encontradas em raízes, folhas e hipocótilos após 96 horas de indução, atuando em uma resposta primária de defesa (YEDIDIA *et al.*, 1999; VIEIRA *et al.*, 2010).

### **Análise da expressão de genes de defesa de feijoeiro**

A análise do padrão de expressão de genes relacionados à resposta de defesa em raízes de feijoeiro foi realizada utilizando-se a técnica de (RT)-qPCR. Foram selecionados 4 genes relacionados a resposta de defesa vegetal, de acordo com a literatura: GLU e CHT (PR proteínas); POD6 e LOX1 (resposta oxidativa e reações de hipersensibilidade) (CHEN *et al.* 2005; DELANNOY *et al.* 2003). A expressão desses genes foi analisada apenas no sítio de infecção (raiz) de *T. harzianum* e fitopatógenos em 3 diferentes tempos (7, 14 e 21 dias).

O gene *CHT 1* foi diferencialmente expresso entre as condições de cultivo de feijoeiro comum, sendo sua expressão aumentada para as plantas cultivadas na presença do fungo fitopatogênico *R. solani* e nos duplos tratamentos ALL 42/*R. solani*/ ALL42/ *F. solani* após 14 dias. Sendo que na presença de *R. solani* este aumento na expressão é mantido até 21 dias de crescimento (Figura 14). Além disto, o maior valor de expressão foi detectado na interação entre Feijoeiro/ ALL-42/ *R. solani* ou *F. solani*, sugerindo novamente que o isolado ALL-42 pode potencializar a expressão de *CHT 1* na presença dos fungos fitopatogênicos (Figura 14). Com relação à expressão do gene *GLUC*, foi observado o aumento de sua expressão para as plantas cultivadas na presença de *Trichoderma* e dos fungos fitopatogênicos. No entanto, os maiores valores foram detectados para as plantas cultivadas por 14



dias na presença do isolado de *Trichoderma* (42T) e do fungo fitopatogênico *R. solani* (Figura 14).

A expressão de quitinases em tecidos vegetais durante a infecção por fungos ou bactérias tem sido associada à capacidade da planta hospedeira em reduzir de forma significativa os sintomas de doenças fúngicas, levando inclusive, a uma resistência completa em plantas transformadas geneticamente. Alguns trabalhos comprovam a capacidade antifúngica desta classe de enzimas, conferindo resistência a tabaco, couve, tomate, arroz e amendoim contra os fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum/ Botrytis cinerea*; *Phoma lingan*; *Verticillium dahliae*; *R. solani* e *Cercospora arachidicola* respectivamente (TERAKAWA *et al.*, 1997; GRISON *et al.*, 1996; TABAEIZADEH *et al.*, 1999; ROHINI & RAO, 2001).

O controle da expressão destes genes também já foi descrito para a interação *Trichoderma virens* e algodoeiro neste caso utilizando um elicitor produzido pelo fungo micoparásita, a proteína elicitora de defesa denominada SM1. Neste trabalho Djonovic e colaboradores detectaram a expressão aumentada dos transcritos de CHT e GLUC após 24 horas após o tratamento das raízes com esta proteína em um sistema hidropônico (DJONOVIC *et al.*, 2007). Como a expressão de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases já foi descrita como um evento desencadeado pelo mecanismo de resistência sistêmica adquirida (RSA) sugere-se que este possa ser o mecanismo de ação do isolado ALL-42. No entanto, esta resposta é bem mais intensa quando o feijoeiro comum é cultivado na presença do isolado *T. harzianum* e dos fungos fitopatogênicos, em comparação com os tratamentos individuais com estes fungos.

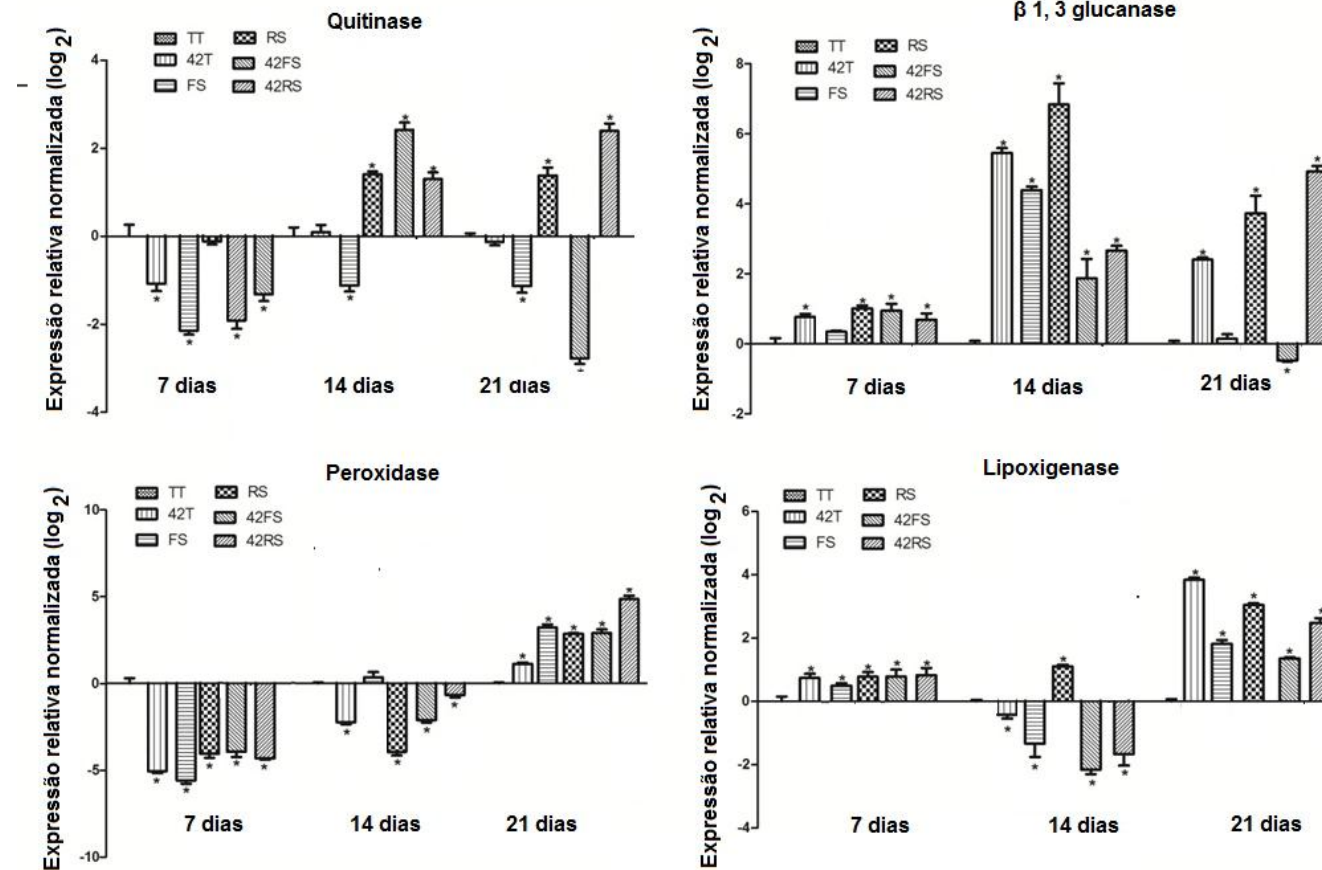
Para a expressão do gene de peroxidase foi observado o aumento de sua expressão na presença do isolado de *Trichoderma* e dos fungos fitopatogênicos para as plantas cultivadas por 21 dias. Novamente foi observada uma maior expressão para os tratamentos duplos *Trichoderma*-fungos fitopatogênicos (Figura 14). As peroxidases estão relacionadas à resposta de defesa de plantas com papel na suberização, lignificação, na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e na síntese de fitoalexinas.

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

Como observado para a expressão do gene de peroxidase o gene LOX1 também teve sua expressão aumentada para plantas cultivadas por 21 dias na presença de *T. harzianum* ALL 42, bem como na presença fitopatógenos. (Figura 14). O aumento da expressão de LOX1 pela presença de uma espécie de *Trichoderma* já foi descrita para algodoeiro, sendo que sua expressão foi aumentada após tratamento da planta hospedeira com a proteína elicitora de defesa SM1 e conferindo à planta hospedeira resistência a uma segunda infecção por fungos fitopatogênicos. (DJONOVIC *et al.*, 2007).

JACKELINE LEITE PEREIRA



**Figura 14:** Análises da expressão dos genes CHT1, GLUC, PRX e LOX1 utilizando RT-qPCR em amostras de raízes de feijoeiro comum cultivado por 7, 14 e 21 dias na ausência ou presença do isolado de *Trichoderma* e dos fungos fitopatogênicos *R. solani* e *F. solani* nas condições TT: planta; 42T: planta + ALL42; 42FS: planta+ALL42+ *F. solani*; 42RS: planta+ ALL42 + *R. solani*; FS: Planta+ *F. solani* e RS: Planta + *R. solani*. As barras com (\*) indicam a diferença estatística significativa quando comparadas às plantas controle, a partir do teste de Dunnet com p-value  $\leq 0.05$ .

### **Análise proteômica da interação Planta/ *Trichoderma*/ Fitopatógenos**

Os mapas protéicos de cada um dos tratamentos da planta hospedeira (ausência e/ou presença de *Trichoderma* e fungos fitopatogênicos) foram realizados em triplicata e analisados utilizando o “software *Image master 2D Platinum 7*”. As réplicas foram comparadas obtendo-se coeficientes de correlação com valores entre 0,98 e 0,99, considerados como aceitáveis para as análises seguintes de sobreposição dos géis para identificação de “spots” diferencialmente expressos. A correlação entre as repetições garante que as diferenças nas análises entre as condições não sejam atribuídas a limitações da técnica de extração, e sim, a variações no mapa proteico dentre as 4 condições testadas (TT, 42T, 42FS e 42RS).

Os mapas de folhas de feijoeiro apresentaram “spots” com massas moleculares variando entre 60 e 14 KDa, bem definidos e com boa separação das proteínas abundantes neste tecido (Figura 15). A interferência de proteínas abundantes em folhas já foi descrita como uma das limitações para a obtenção de mapas proteicos bem definidos (WILSON *et al.*, 2002). O número de “spots” detectados automaticamente nos mapas proteômicos de folha foi diferente entre as condições de cultivo das plantas hospedeiras, um total de 335 “spots” para o tratamento TT, 293 “spots” para 42T, 380 para 42FS e 354 para 42RS (Figura 17A). Para os mapas de raízes de feijoeiro, foram detectados “spots” com massas moleculares variando de 10 a 70 KDa, bem definidos, e com boa separação de proteínas (Figura 16). O número de spots detectados automaticamente para os mapas de raiz foram 335 para TT, 293 para 42T, 380 para 42FS e 354 para 42RS (Figura 17B).

Foram feitas também análises para detecção de “spots” comuns entre os diferentes tratamentos (Figura 17)., mas com expressão diferencial utilizando-se o valor de volume relativo para as análises de variância e para detecção de “spots” presentes em apenas uma condição, denominados de “spots” exclusivos (Figura 18).

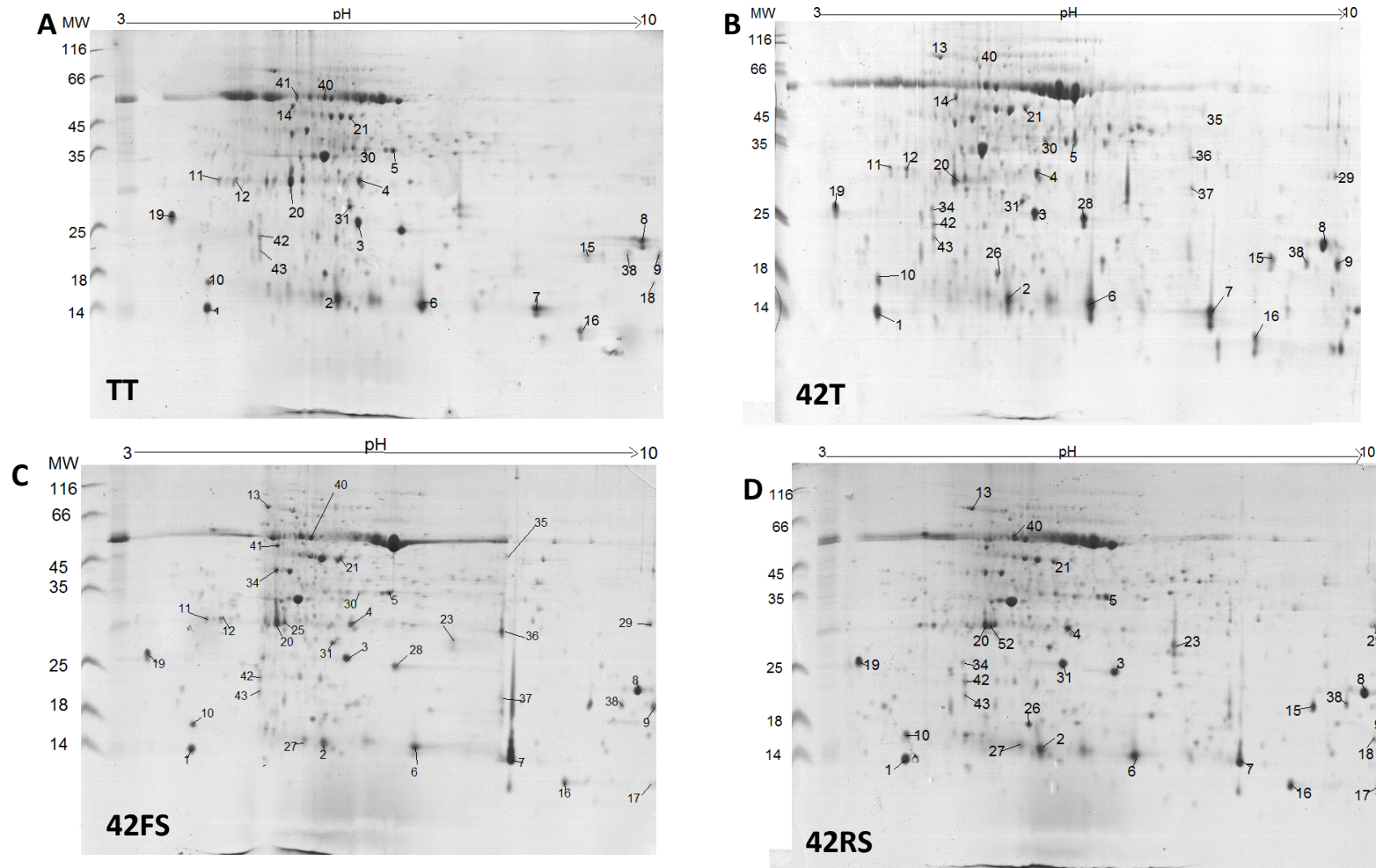
Os spots em comum que apresentaram padrões de expressão diferenciados foram descritos para cada condição de crescimento, em comparação ao tratamento controle, bem como entre os tratamentos. Para folhas, foram observados 18, 15 e 40 spots em comum entre os mapas das plantas controle (Figura 17A), e os mapas das condições 42T, 42FS e 42RS, respectivamente. Para as análises dos mapas de raízes, foram identificados 22, 16 e 54 spots em comum, na comparação de plantas não tratadas e os mapas 42T, 42FS e 42RS, respectivamente (Figura 17B).

Os spots exclusivos também foram detectados para condição de crescimento em comparação às plantas controle (TT) (Figura 18). Para folhas, foram observados 42, 19 e 45 spots nas condições 42T, 42FS e 42RS, respectivamente (Figura 18A). Na comparação entre os mapas de raiz, foram detectados 28, 52 e 136 spots exclusivos nas condições 42T, 42FS e 42RS, respectivamente (Figura 18B).

Comparações entre os mapas proteômicos obtidos para folhas e raízes de plantas tratadas também foram feitas. Para folhas, foram obtidos 14 spots diferencialmente expressos entre os tratamentos 42T e 42RS, 4 para 42T e 42FS, 17 para 42FS e 42RS (Figura 18A). Para os mapas de raízes, foram observados 10 spots diferencialmente expressos entre os tratamentos 42T e 42RS, 8 para 42T e 42FS, 24 para 42FS e 42RS (Figura 18B). As alterações fisiológicas desencadeadas em plantas de feijoeiro na presença de fungos, desenvolveram 2 mecanismos de produção principal e expressão diferencial de proreínas. O padrão de expressão também foi dependente do tipo de fungos que interagem com a planta hospedeira.

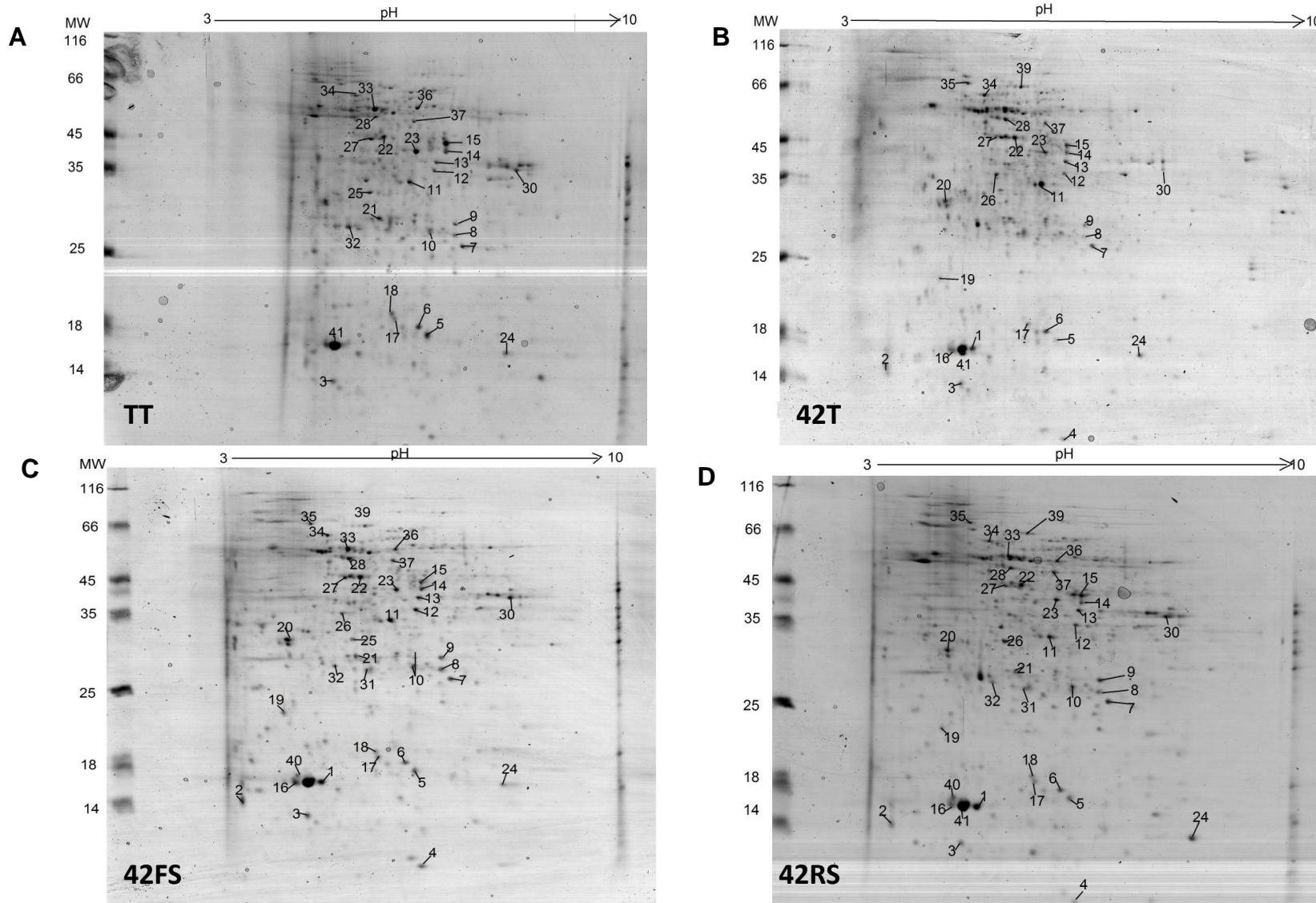
Estes resultados sugerem que a presença dos fungos modulou significativamente o padrão de expressão de proteínas das plantas de feijão, e para o isolado de *Trichoderma*, esta alteração foi mais significativa em folhas, sugerindo sua habilidade de induzir resposta sistêmica. Em contraste, para as plantas tratadas com os fungos patogênicos, foi observada uma variação maior no número de spots de raiz sugerindo neste caso resposta local intensa em função de sua presença.

JACKELINE LEITE PEREIRA



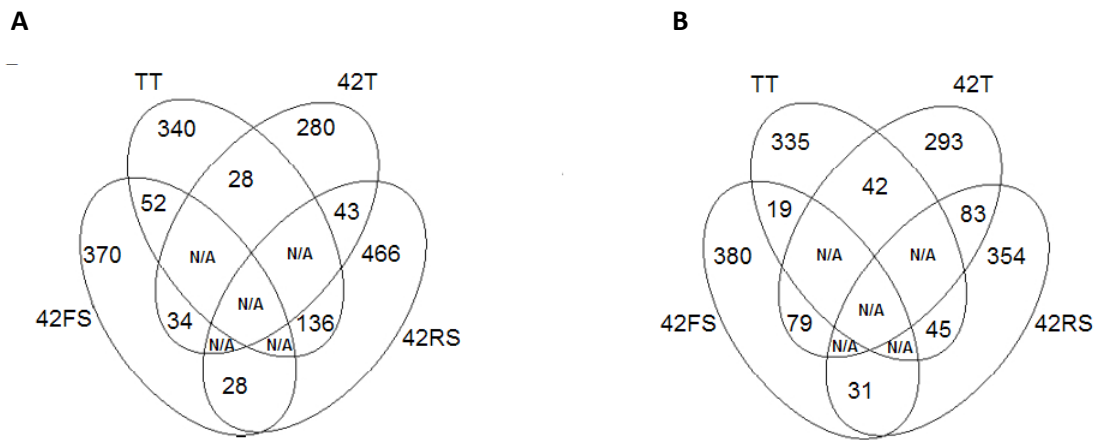
**Figura 15:** Mapas de referência de folhas de feijoeiro, após 21 dias de infecção, utilizados para as análises de expressão diferencial. Em A, planta controle; B: planta na presença de ALL-42; C: Planta+ ALL 42 + *F. solani* e D: Planta + ALL-42+ *R. solani*. Os números representam proteínas identificadas em comum ou não, com expressão diferencial.

JACKELINE LEITE PEREIRA

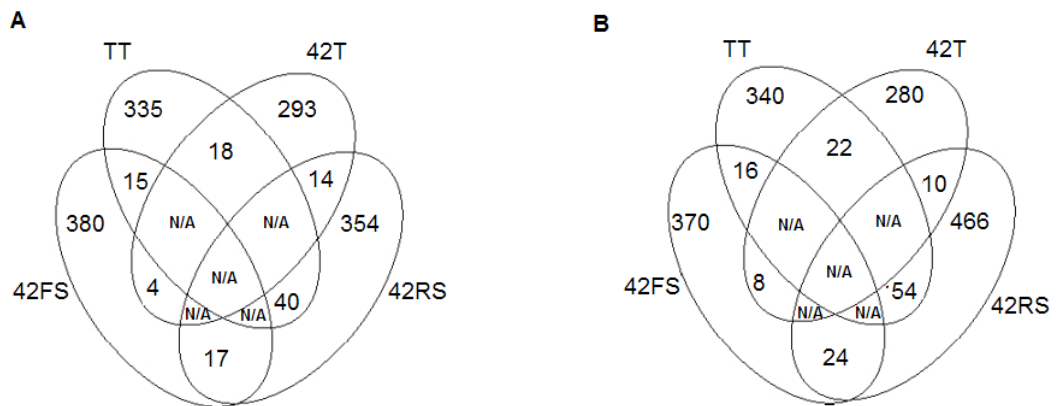


**Figura 16:** Mapas de referência de raiz de feijoeiro, após 21 dias de infecção, utilizados para as análises de expressão diferencial. Em A, planta controle; B: planta na presença de ALL-42; C: Planta+ ALL 42 + *F. solani* e D: Planta + ALL-42+ *R. solani*. Os números representam proteínas identificadas em comum ou não, com expressão diferencial.

JACKELINE LEITE PEREIRA



**Figura 17:** Diagrama de Venn mostrando o número total de "spots" detectados em (A) folha e (B) raiz de feijoeiro nas condições TT, 42T, 42FS e 42RS, bem como os "spots" em comum, mas com expressão diferencial entre as condições e validadas por ANOVA, considerando  $p \leq 0,05$ .



**Figura 18:** Diagrama de Venn mostrando o de "spots" exclusivos de (A) folha e (B) raiz, entre as condições TT, 42T, 42FS e 42RS e validadas por ANOVA, considerando  $p \leq 0,05$ .

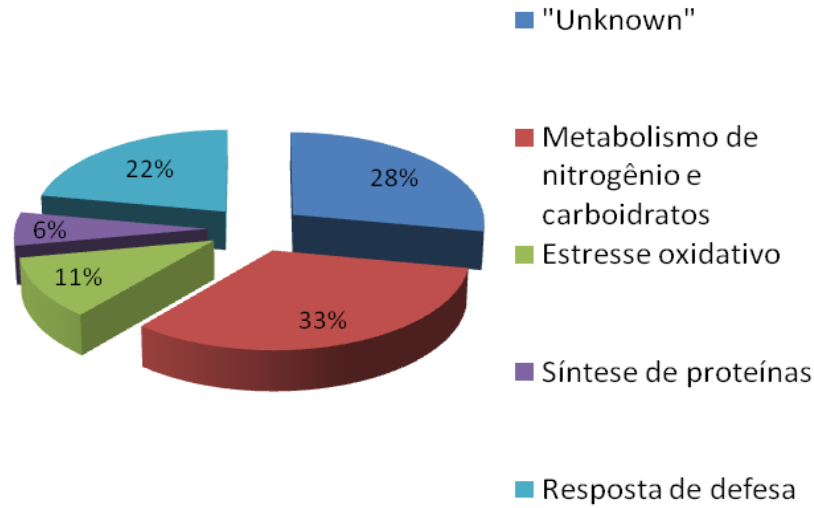


### **Identificação das proteínas por espectrometria de massa (MALDI TOF/MS)**

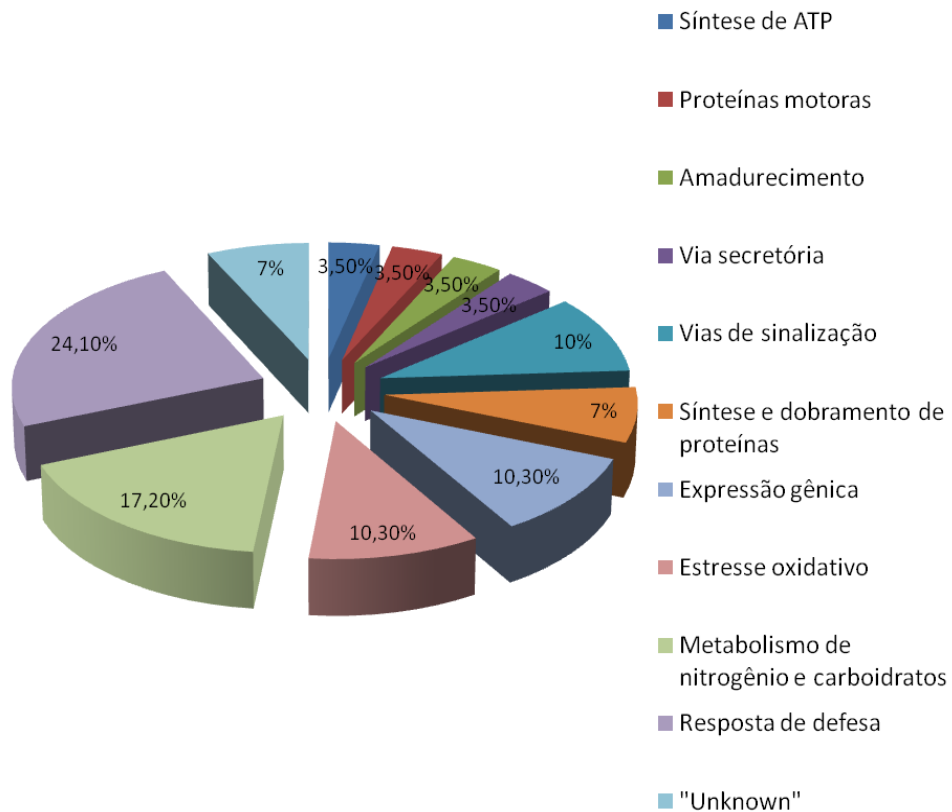
Os “spots” com expressão diferencial nas diferentes condições de cultivo foram selecionados e preparados para a sua identificação utilizando a técnica de PMF (“Peptide mass fingerprinting”). Dos 80 spots selecionados, foram identificadas 29 proteínas de raiz e 19 de folhas. As proteínas identificadas foram agrupadas em classes, de acordo com sua função (Figura 19). Para folhas, 33% das proteínas identificadas estão envolvidas no metabolismo de nitrogênio/carboidratos, enquanto 28% atuam na resposta de defesa de plantas, 11% em estresse oxidativo e 6% na síntese de proteínas (Figura 19A). Em raiz, 24,10% das proteínas identificadas tinham função na resposta de defesa, 17,10% foram agrupadas na classe metabolismo, 10,30% foram agrupadas nas classes de estresse oxidativo e expressão gênica, 10% envolvidas na síntese de ATP, entre outras mostradas na Figura 19B.

JACKELINE LEITE PEREIRA

**A**



**B**



**Figura 19:** Categorização funcional das proteínas identificadas em folhas (A) e raiz (B) de feijoeiro

## **Proteínas identificadas a partir dos mapas de folhas de feijoeiro**

### *Metabolismo*

A maior parte das proteínas identificadas em folhas de feijoeiro em resposta à presença do isolado ALL 42 e dos fitopatógenos são proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos e nitrogênio, como: a Rubisco ativase (spot F22), anidrase carbonica (spot F23), “uncoupling protein 1A” (spot F 27), e 3 subunidades da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (spots F7, F 41 e F42) (Figura 20).

Duas isoformas de ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) foram identificadas nos mapas proteômicos de folhas de feijoeiro mais expressas em função da presença dos fungos, o “spot” F7 teve maior expressão nos mapas de plantas tratadas apenas com ALL 42 (Figura 20A) e o “spot” F42 teve expressão aumentada na condição 42RS (Figura 20F). A ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) com massa molecular de aproximadamente 560kDa, é constituída de 16 subunidades (L8S8), sendo oito subunidades menores (S8), originadas do DNA nuclear, e oito subunidades maiores (L8) originadas do DNA do cloroplasto (BUSCH, 2012). É uma enzima chave que participa na assimilação de CO<sub>2</sub> em plantas e corresponde a cerca de 40% da proteína total de folhas.

Já foi demonstrado que plantas hospedeiras quando em associação com algum organismo como bactérias, fungos ou nematoides, pode aumentar a sua taxa fotossintética, como resposta de defesa, para responder a uma eventual infecção por um fitopatógeno (SHORESH & HARMAN, 2008). Em estudos utilizando plântulas de *Zea mays* como modelo, inoculadas com *T. harzianum* T 22, este foi capaz de estimular o aumento da expressão de genes relacionados ao metabolismo fotossintético da planta, estimulando, por sua vez o crescimento destas plantas (SHORESH & HARMAN, 2008), corroborando com os resultados obtidos neste trabalho, descrito para os spots F7, F41 e F42.

Dados de macro-array, de folhas de “Chestnut rose” (*Rosa roxburghii* Tratt) em interação com um fungo causador de oídio, também demonstraram a correlação entre presença de hospedeiro e aumento na expressão do gene da ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) (HUANG E DENG, 2012). Neste mesmo estudo, foram avaliadas as atividades enzimáticas das enzimas mencionadas acima em plantas infectadas após 72h, ou não, pelo oídio, demonstrando atividade aumentada de Rubisco oxigenase.

O spot F22 foi identificado como uma rubisco ativase e foi menos expresso para os tratamentos na presença do isolado de *Trichoderma* e também dos fungos fitopatogênicos. (Figura 20B). Outros estudos de análise proteômica, também detectaram diminuição da expressão de Rubisco ativase em plantas de pepino inoculadas com *Trichoderma asperellum*. A diminuição da expressão desta proteína tem sido associada com a transição para um metabolismo não fotossintético e preparação para a resposta de defesa (SEGARRA *et al.*, 2007).

O spot F27 identificado como sendo a proteína *uncoupling protein 1A* (UCP) foi mais expresso na presença dos fungos fitopatogênicos (Figura 20D). Em *A. thaliana* foi demonstrado que a proteína UCP codificada pelo gene *AtUCP1*, tem papel no ajuste do balanço bioenergético da cadeia respiratória durante a fotossíntese. Plantas mutantes que não expressam esta proteína apresentaram menores taxas de assimilação fotossintética de carbono, apresentando-se como menores taxas de crescimento (SWEETLOVE *et al.*, 2006).

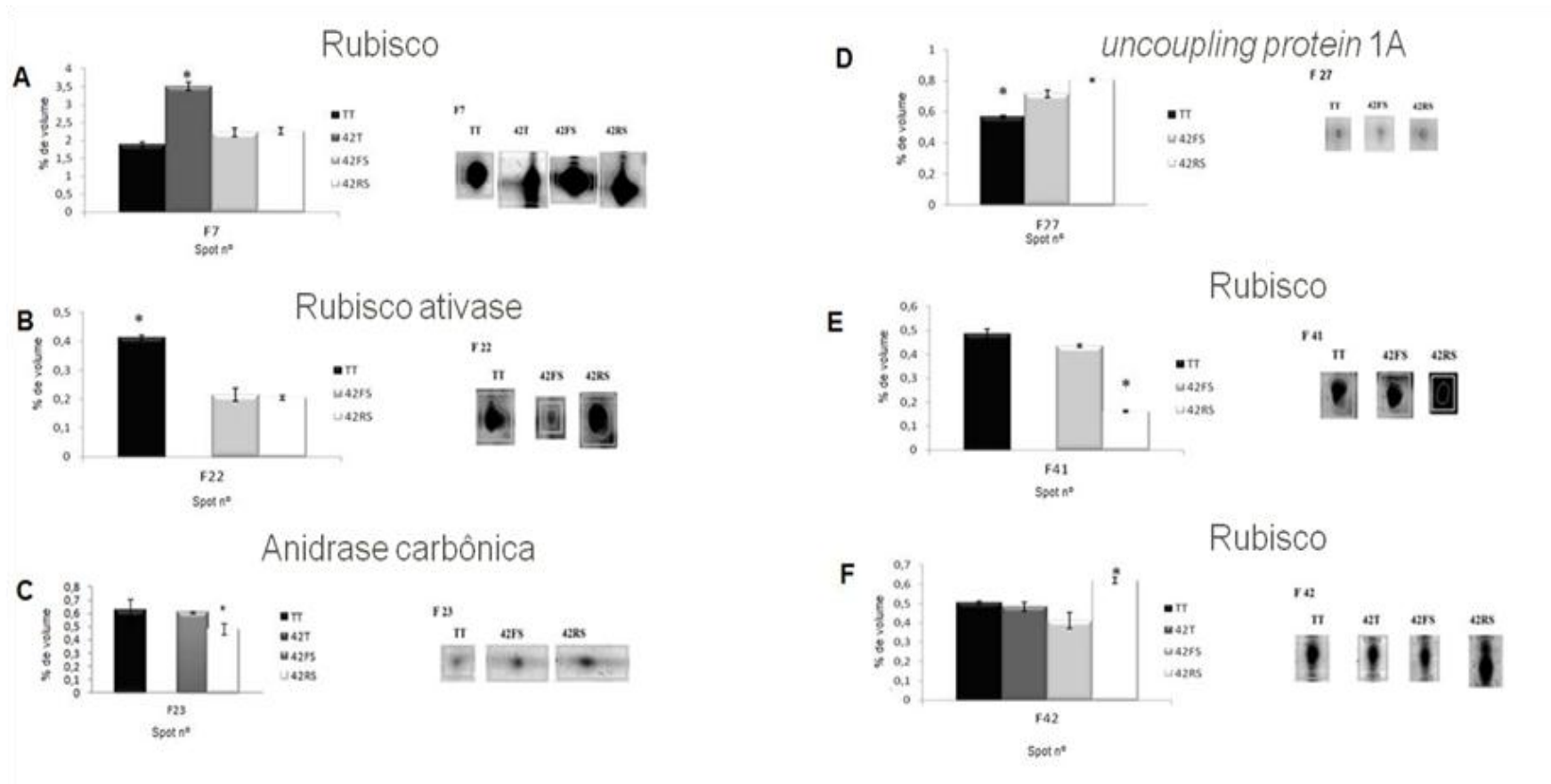
Como observado para a rubisco ativase, o “spot” identificado como a proteína anidrase carbônica (spot F23) também foi menos expresso em folhas de plantas cultivadas na presença do fungo fitopatogênico *R. solani* em comparação com o tratamento controle (Figura 20C). Esta enzima catalisa a reação de hidratação de CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> nas etapas de assimilação de CO<sub>2</sub> pelas plantas, que em seguida pode ser utilizado pela enzima fosfoenol piruvato carboxilase (BUSCH, 2012). Sabe-se também que anidrase carbônica está associada a outras enzimas do ciclo de Calvin, como a Rubisco, provendo-lhe CO<sub>2</sub> (JEBANATHIRAJAH & COLEMAN, 1998). Em folhas de tabaco, foi

**JACKELINE LEITE PEREIRA**

---

identificada uma proteína ligante a ácido salicílico, denominada SABP3, no estroma dos cloroplastos. Esta proteína demonstrou alta afinidade a ácido salicílico, quando comparada a seus análogos ativos e inativos. A purificação e parcial sequenciamento desta proteína demonstrou função de uma anidrase carbônica, indicando que esta proteína também pode estar envolvida na resposta de defesa vegetal, já que, ainda neste mesmo estudo, os autores demonstraram que o silenciamento gênico da expressão da anidrase carbônica em folhas de tabaco, suprimiu a função do gene *Pto:avrPto*, que media a resposta hipersensitiva na resposta de defesa das plantas (SLAYMAKER *et al.*, 2002).

JACKELINE LEITE PEREIRA



**Figura 20:** Proteínas identificadas em folha de feijoeiro nas condições TT, 42T, 42FS e 42RS, relacionadas metabolismo. Em A: Spot F7: Rubisco, em B: Spot F22: rubisco ativase, em C: Spot F23: Anidrase carbônica, em D: Spot F27: uncoupling protein 1A, em E e F: Spots F 41 e F42: Rubisco.

*Resposta de defesa*

Também foram identificadas nos mapas proteômicos de folhas de feijoeiro proteínas que atuam na resposta de defesa de plantas como: o spot F3, classificado como uma serina/treonina quinase (Figura 21A), o spot F25 identificado como uma Glutathione S transferase (GST) (Figura 21B) e o spot F26, identificado como uma enzima da família cinamoil CoA redutase (Figura 21C). O spot F25 foi mais expresso nos mapas proteômicos de plantas cultivadas na presença do isolado de *Trichoderma* e dos fungos fitopatogênicos, no entanto, o spot 26 foi mais expresso apenas no tratamento com o fungo fitopatogênico *F. solani*.

A enzima glutathione S-transferase (GST- EC 2.5.1.18) em plantas, desempenha um papel importante na resposta ao estresse causado por herbicidas. É considerada uma enzima de desintoxicação, por metabolizar grande variedade de compostos xenobióticos, por meio da conjugação destes como glutathione reduzida, formando substâncias de baixa toxicidade. As GSTs também promovem a conjugação de glutathione (GSH) com produtos endógenos causadores de danos oxidativos, como radicais hidroxila citotóxicos, peróxidos de lipídios de membrana e produtos de degradação oxidativa do DNA, visando sua desintoxicação (MAUCH E DUDLER, 1993) De acordo com LEVINE *et al.* (1994), o elevado nível de peróxido de hidrogênio induz um grande aumento no mRNA de GST em células de soja. Algumas GSTs também funcionam como glutathione peroxidases, por atuarem diretamente sob tais produtos (MAUCH E DUDLER, 1993).

Recentemente, García-Sánchez *et al.* (2012) analisando a resposta de defesa em plântulas de tomateiro submetidas a estresse oxidativo por compostos fenólicos, mostraram a participação da atividade de GST na resposta de defesa desencadeada pela planta. Outros estudos de análise da resposta de defesa de ervilha à presença de *Mycosphaerella pinodes* utilizando a tecnologia de microarranjo, mostraram a expressão elevada de genes como peroxidases e glutathione S-transferase (GST). Neste caso os autores sugerem

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

uma resistência gene-para-gene, ou seja, o reconhecimento tardio de linhagens específicas de patógenos, que é um passo chave para o sucesso da defesa e depende de pares complementares de genes dominantes, um do hospedeiro, e um do patógeno (FONDEVILLA *et al.*, 2011). A resistência gene-para-gene é comum em interações com muitos patógenos biotróficos (HAMMOND-KOSACK *et al.*, 1997). No caso de patógenos necrotróficos, as plantas usualmente reconhecem elicitores não específicos que ativam uma bateria de defesas basais que atuam sobre grande parte dos patógenos. No caso do fungo necrotrófico *M. pinodes*, o reconhecimento de um patógeno não é suficiente, e uma alta expressão de genes com propriedades antimicrobianas pré-formada, pode ser uma vantagem para uma resposta de defesa efetiva (FONDEVILLA *et al.*, 2011). No caso deste estudo, como essa GST só foi encontrada na condição 42FS (Figura 21B), é provável que ela tenha sido induzida por *F. solani* há possibilidade de ocorrência da resistência gene-a-gene.

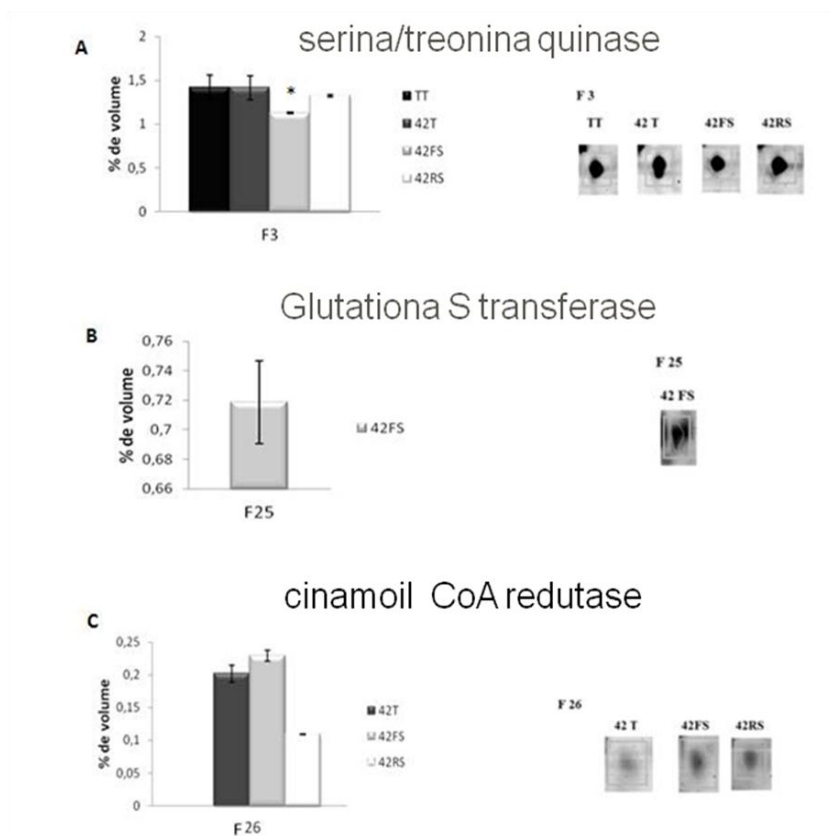
Harman e colaboradores (2004) demonstraram através da análise de folhas de *Zea mays*, a capacidade de *T. harzianum*- T22, quando inoculados em raiz, de induzir resistência sistêmica a *Colletotrichum graminicola*. Outro estudo feito por SEGARRA *et al.*, (2007) em análise proteômica de folhas de plântulas de *Zea mays*, quando T-22 inoculados em raiz, demonstrou a capacidade deste isolado, em induzir resistência sistêmica nestas plantas, através da expressão de proteínas envolvidas neste processo, corroborando com os dados obtidos neste estudo.

O spot F26, identificado como uma Cinamoil CoA Redutase (CCR), não teve expressão detectada em plantas controle, nas demais condições, sua expressão foi elevada em 42T e 42FS (Figura 21C). Esta é uma enzima que participa da via de biossíntese de lignina. A lignificação também é uma resposta ativa das plantas à invasão por patógenos, e acumulam-se evidências de que é importante mecanismo de defesa (PEREIRA, 2008). A síntese de lignina é ligada ao metabolismo de fenilpropanóides. A enzima Cinamoil-CoA redutase é uma importante enzima que participa da via de lignificação (PEREIRA, 2008). Uma análise *in silico* da sequência genômica de *A. thaliana*



JACKELINE LEITE PEREIRA

revelou 11 homólogos de CCR, às quais somente as isoformas AtCCR1 e AtCCR2 mostraram ser diferencialmente expressas durante o desenvolvimento e resposta a infecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (LAUVERGEAT *et al.*, 2001). Recentemente, em estudos de resposta de defesa em *Camelina sativa* (linho bastardo) ao patógeno necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum*, foi demonstrada a importância dos genes *CsCCR2*, e *CsCCR4*, que codificam para Cinamoil-CoA redutase, em plantas susceptíveis, ajudaram a conferir resistência aos sintomas promovidos pelo patógeno em questão, além de todos os genes testados para esta enzima terem expressão aumentada na condição em que a planta estava infectada com *S. sclerotiorum* (EYNCK *et al.*, 2012).



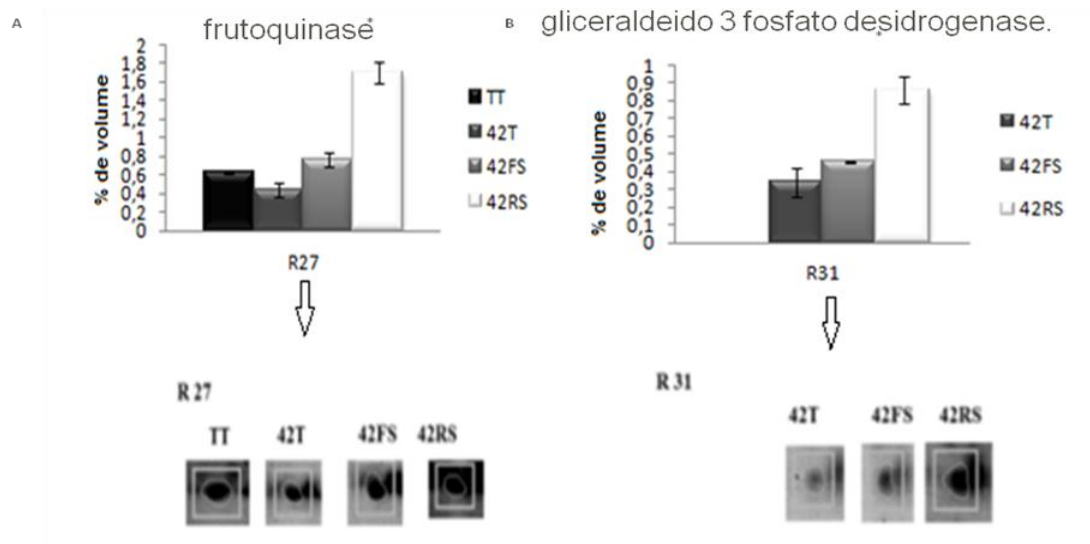
**Figura 21:** Proteínas identificadas em folha de feijoeiro nas condições TT, 42T, 42FS e 42RS, relacionadas a resposta de defesa. Em A, spot F3: serina/treonina quinase, em B, spot F 25: Glutaciona S transferase, em C, spot F26: cinamoil coA redutase

JACKELINE LEITE PEREIRA

## Proteínas identificadas a partir dos mapas proteômicos de raízes de feijoeiro

### *Metabolismo e síntese de ATP*

Os spots R27 e R31 tiveram sua expressão aumentada na condição 42RS, e foram identificados como uma frutoquinase e uma gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, respectivamente (Figura 22A e 22B). A proteína frutoquinase participa da primeira etapa da glicólise na fosforilação da glicose-6-fosfato para a geração de piruvato (NELSON *et al.*, 2002). A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma enzima essencial na via da glicólise e da gliconeogênese, catalisando a fosforilação oxidativa do substrato gliceraldeído-3-fosfato em 1,3- bifosfoglicerato na presença de NAD<sup>+</sup> e fosfato inorgânico, sendo também capaz de catalisar a reação inversa (NELSON *et al.*, 2002).

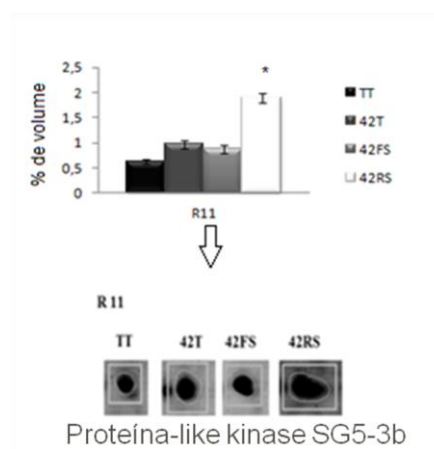


**Figura 22:** Proteínas identificadas na raiz de feijoeiro nas condições TT, 42T, 42FS e 42RS relacionadas ao metabolismo. R27: frutoquinase; R31: gliceraldeido 3 fosfato desidrogenase.

JACKELINE LEITE PEREIRA

Após a inoculação de *T.harzianum* T22 em raízes de *Zea mays*, Shores e Harman concluíram que grande parte das mudanças no padrão de expressão das proteínas, foi naquelas envolvidas no metabolismo de carboidratos. Os autores detectaram 17 proteínas com expressão aumentada na condição em que T22 estava presente (SHORESH E HARMAN, 2008). Estudos anteriores feitos com tomateiro como modelo, também demonstraram que a interação com *Trichoderma hamatum* tiveram modificação na expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo (ALFANO *et al.*, 2007), sugerindo, portanto que existe uma conexão direta entre a habilidade de *Trichoderma* em induzir o metabolismo de carboidratos e sua habilidade em induzir o crescimento. Para feijoeiro, neste estudo, o spot R31 não foi detectado em plantas controle, apenas nas demais condições, com expressão aumentada em 42RS (Figura 22B), sugerindo que esta proteína foi expressa através da indução de *T. harzianum* ALL 42 e aumentando sua expressão quando os fitopatógenos presentes.

O “spot” R11, mais expresso na condição 42RS, foi identificado como uma “Proteína-like kinase SG5-3b”. Sua expressão foi igualmente aumentada nas condições 42T, 42FS, quando comparada à expressão das plantas controle, demonstrando que a presença dos fungos, altera o seu padrão de expressão (Figura 23).



**Figura 23:** Proteínas identificadas na raiz de feijoeiro nas condições TT, 42T, 42FS e 42RS, relacionadas à síntese de ATP. Spot R11: Proteína-like kinase SG5-3b.

---

JACKELINE LEITE PEREIRA

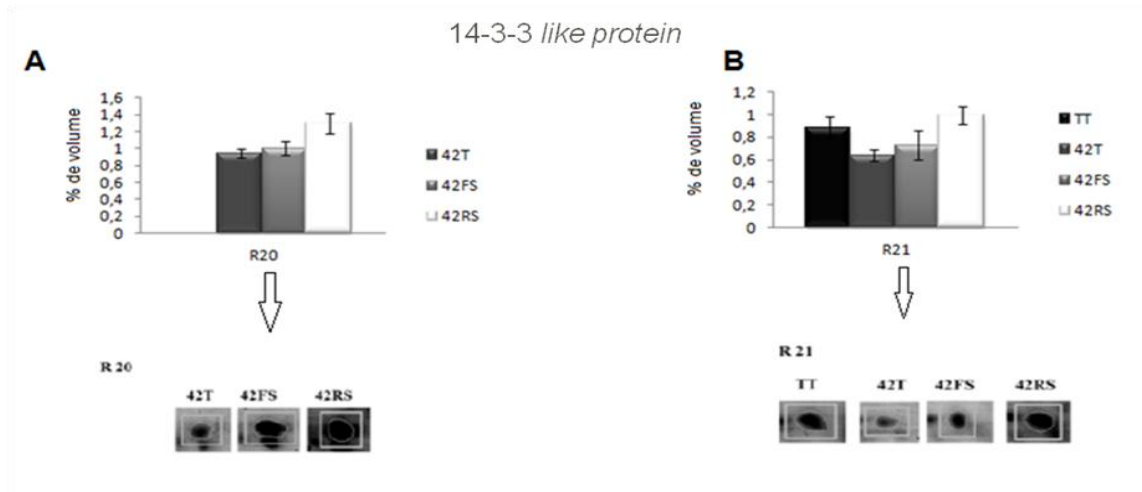
---

*Resposta de defesa, metabolismo secundário e estresse oxidativo*

Os spots R20 e R21 foram identificados como uma “14-3-3 like protein” (Figura 24). Esta classe de proteínas, já foi descrita em mamíferos (AITKEN *et al.* 1992 ), plantas (HIRSCH *et al.*, 1992;. BRANDT *et al.*, 1992), *Xenopus* (MARTENS *et al.*, 1992), *Drosophila* (SWANSON E GANGULY, 1992), e levedura (VAN HEUSDEN *et al.*, 1992), e possui diferenças funções biológicas. Em estudo à resposta de defesa de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) contra o patógeno *Verticillium dahliae*, HILL *et al.*, (1999) identificaram o gene VGh110, de uma proteína 14-3-3, cujo papel na defesa da planta , seria na transdução de sinais e regulação gênica. Estas proteínas apresentaram expressão transitória na planta, nas primeiras 12-24 horas de infecção da raiz com o fitopatógeno. Este evento pode ser associado à resposta de defesa da planta ao ataque do fitopatógeno (HILL *et al.*, 1999). Proteínas desta classe têm sido associadas com várias respostas de estresse das plantas. Em plantas de arroz, submetidos a alta salinidade e temperatura, foram vistos aumento da expressão de 14-3-3 (KIDOU *et al.*, 1993). Situações de hipóxia também induzem a expressão desta proteína em *Zea mays*. (DE VETTON, 1995). Em *Hordeum vulgare* (cevada), proteínas 14-3-3 foram induzidas em resposta a infecção por *Erysiphe graminis*, agente causal do oídio (BRANDT *et al.*, 1992). Evidências mais diretas no envolvimento de proteínas 14-3-3 na transdução de sinais e na regulação transcricional de genes que participam na resposta de defesa das plantas foi feito pela identificação de uma 14-3-3 como molécula receptora para um elicitor fúngico fusicoquina (FC). A molécula FC interage com um receptor da proteína 14-3-3, ativando uma ATPase da membrana, podendo ativar uma casacata de eventos na sinalização celular (DE BOER, 1997).

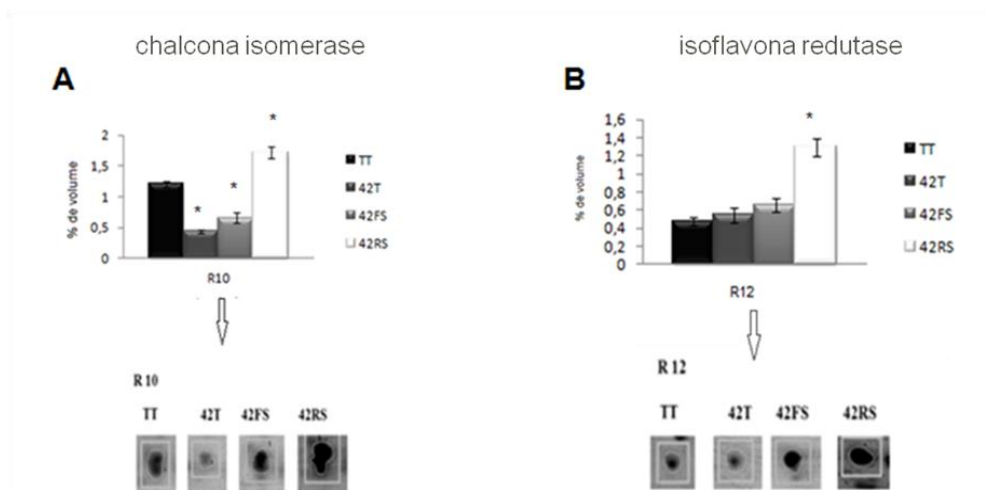
Neste estudo o spot R20 teve a expressão dessa proteína induzida pelo isolado de *T. harzinaum* ALL-42, com aumento da expressão quando *R. solani* presente, podendo esta, estar associada à resposta de defesa, enquanto para R 21, esta expressão nas plantas controle já estar presente (Figura 24).

JACKELINE LEITE PEREIRA



**Figura 24:** Proteínas identificadas na raiz de feijoeiro nas condições TT, 42T, 42FS e 42RS. R20 e R21: 14-3-3 like proteína, relacionadas à defesa de plantas.

O “spot” R10 identificado como uma chalcona isomerase apresentou expressão aumentada na condição 42RS (Figura 25A). Esta é uma enzima específica de plantas que faz parte da via metabólica de síntese de isoflavonóides e produção de fitoalexinas, catalisando a primeira reação na biossíntese destes compostos (BELL *et al.*, 1984).



**Figura 25:** Proteínas identificadas na raiz de feijoeiro nas condições TT, 42T, 42FS e 42RS. R10: chalcona isomerase e R12: isoflavona redutase, envolvidas no metabolismo secundário e resposta de defesa.

Em *P. vulgaris*, foram observadas mudanças na taxa de expressão da enzima fenilalanina amônia liase (PAL), de uma chalcona sintase e de uma chalcona isomerase, em resposta à presença do agente causador da antracnose *Colletotrichum lindemuthianum* (CRAMER *et al.*, 1985). Estes autores detectaram o aumento na expressão do mRNA desta enzima em hipocótilos de feijoeiro em cultivares resistentes e susceptíveis à doença. Sugerindo que o aumento na produção de fitoalexinas em situações que desencadeiam a resposta de defesa em *P. vulgaris*, envolvem uma indução coordenada da expressão de enzimas da via de síntese de isoflavonóides, como a chalcona isomerase (CRAMER *et al.*, 1985).

Em estudos com alfafa, foi demonstrado que, em raízes infectadas tardiamente com *Glomus intraradix*, foram detectados níveis aumentados da atividade de chalcona isomerase e quitinases, quando comparadas às plantas controle, demonstrando envolvimento destas enzimas em resposta de defesa da alfafa (VOLPIN *et al.*, 1994).

A produção de fitoalexinas faz parte da resposta de defesa de plantas em um mecanismo induzido denominado de resistência sistêmica adquirida (RSA). A RSA é iniciada pela produção de um sinal liberado a partir do sítio de infecção (neste caso, a raiz da planta), que leva à necrose e também à passagem deste sinal para outras partes da planta, induzindo sua resposta de defesa que protegerá a planta contra eventuais ataques de fitopatógenos (HARMAN, 1991).

Mais recentemente, em estudos sobre o acúmulo de isoflavonóides em raízes de *A. thaliana* infectadas com *Plasmodiophora brassicae*, foi observado um aumento na expressão de genes que codificam para chalcona isomerase e outras enzimas envolvidas na síntese de flavonoides. Além disso, os autores deste estudo concluem que os flavonoides podem atuar como antioxidantes que “sequestram” espécies reativas a oxigênio, que podem ser um resultado de estresses bióticos e abióticos, associados com várias funções celulares (PÄSOLD *et al.*, 2010).

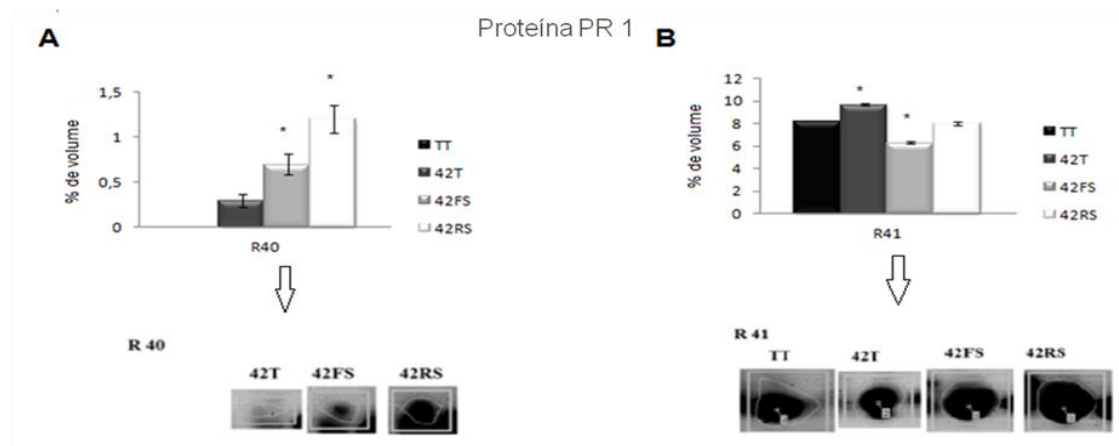
O spot R12 (Figura 25B), identificado como uma isoflavona redutase teve expressão significativa na condição 42RS, quando comparada às demais condições. Esta é uma enzima específica da via de biossíntese dos isoflavonóides, encontrada tipicamente em leguminosas. Ela catalisa uma redução NADPH – dependente, envolvida na biossíntese de compostos derivados da via dos fenilpropanóides, e teve sua importância relacionada ao sistema de defesa das plantas (FRANÇA, *et al.*, 2001), visto que isoflavonóides ajudam a conferir durabilidade, longevidade e resistência contra o ataque de fungos patogênicos, por exemplo (GANG *et al.*, 1999).

Em estudos proteômicos de resposta de defesa de abacateiro contra o fungo causador de podridão radicular *Phytophthora cinnamomi*, foram encontradas uma glutathione S transferase, 2 isoformas de chalcona isomerase e 2 isoformas de isoflavona redutase nas raízes destas plantas. Estas, por sua vez, demonstraram padrão elevado de expressão em plantas tratadas com o fitopatógeno em questão (ACOSTA-MUNIZ, *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos neste estudo para a expressão de chalcona isomerase e isoflavona redutase, mostraram mudanças significativas na condição em que *R. solani* esteve presente. Este aumento da expressão dessas proteínas pode levar na elevada produção de compostos secundários, que possuem funções antioxidantes e protetivas, como o fortalecimento da parede celular vegetal através da produção de fitoalexinas e ligninas, contribuindo, por sua vez, na resistência à *R. solani*.

Os spots R40 e R41 (Figura 26) foram identificados como proteínas de resposta de defesa (“PR1-like protein). As proteínas relacionadas à patogênese, que são sintetizadas em níveis constitutivos no hospedeiro ou podem ser induzíveis durante a interação com o patógeno, são relativamente pequenas, estáveis e acumulam predominantemente nos espaços intercelulares dos tecidos vegetais (VAN LOON, 2006).

JACKELINE LEITE PEREIRA



**Figura 26:** Proteínas identificadas na raiz de feijoeiro nas condições TT, 42T, 42FS e 42RS. R40 e R41: PR1 like proteína, relacionadas à resposta de defesa.

As diferentes funções das PRs contribuem para sua efetividade nas infecções fúngicas, na atuação sobre a parede celular do patógeno, que contém glucanas, quitinas e proteínas. Assim, essas famílias gênicas podem executar um papel importante no mecanismo de defesa direto das plantas com a diminuição acentuada da disseminação do patógeno, permitindo que o hospedeiro tenha tempo de operar os sistemas de defesa. Além disso, nos mecanismos indiretos, a ação enzimática destas proteínas sobre a parede celular do patógeno permite a liberação de moléculas sinalizadoras de reconhecimento da planta (BORGES, 2011).

As PR1-proteínas fazem parte do processo de reação hipersensitiva, um dos mais eficientes mecanismos de defesa de plantas, desencadeado pelo contato com patógenos e que leva à indução da expressão de proteínas relacionadas à patogênese (PR) (GARY & MURRAY, 2007). Esta família tem sido caracterizada por possuir efeito inibitório sobre os patógenos fúngicos em diversos atossistemas, tais como o feijoeiro e *Uromyces fabae* (NIDERMAN *et al.*, 1995), tomate e *Phytophthora infestans* (RAUSCHER *et al.*, 1999). Já em estudos com o silenciamento do gene PR1b em cevada, resultou na suscetibilidade da planta ao fungo *Blumeria graminis* (SCHULTHEISS *et al.*, 2003). Em plantas transgênicas de *Peronospora tabacina* para o aumento da expressão dos genes de PR1, apresentaram aumento de resistência ao patógeno *Phytophthora parasítica*. Estudos recentes acerca da resposta de

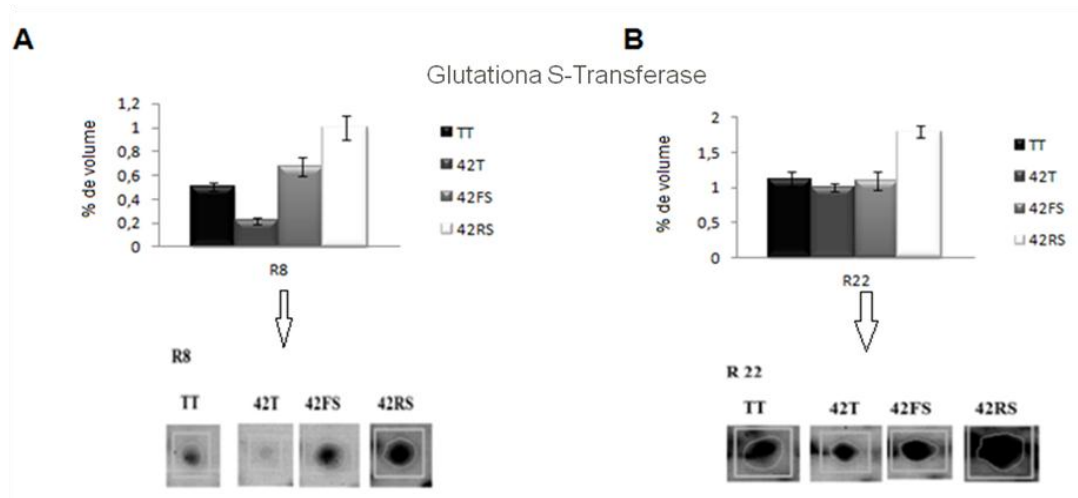


defesa de *A. thaliana* e *P.syringae* mostraram que o gene *ashr3* que codifica uma PR1 teve altos níveis de expressão nas plantas infestadas com o patógeno, correlacionado ao aumento da resistência da planta (DE-LA-PEÑA *et al.*, 2012).

Neste estudo, uma PR1 não detectada em plantas controle (Figura 26A), teve expressão aumentada na condição 42RS, entretanto, pode-se afirmar que a expressão desta proteína foi induzida pela presença do isolado de *T. harzianum* ALL42, sendo então, esta expressão potencializada pela presença dos fitopatógenos *F. solani* e *R. solani*.

O primeiro spot, não detectado em plantas controle, teve maior expressão na condição 42RS e foi pouco expresso na condição 42T (Figura 26A). Neste caso, pode-se afirmar que o ALL 42 induz a expressão desta proteína. O spot R41 teve maior expressão na condição 42T, embora encontrado em plantas controle (Figura 26B). Estes dados corroboram com os resultados de estudos que mostraram a colonização das raízes de algodoeiro, pepino e *Zea mays*, por linhagens de *Trichoderma*, resultando no aumento dos níveis de expressão de genes que codificam para diversas proteínas PR (HOWELL *et al.*, 2000; YEDIDIA *et al.*, 1999; YEDIDIA *et al.*, 2003). Em avaliação da resposta sistêmica da interação de *A. thaliana* contra *P. syringae*, sobre a capacidade de *T. asperellum* SKT-1 em induzir genes de defesa, os resultados mostraram que os níveis de PR-1, PR-2 e PR-5 tiveram altos níveis de expressão, quando SKT-1 presente (YOSHIOKA *et al.*, 2012).

Duas isoformas de glutathione S- transferase (GST) foram identificadas nos spots R8 e R22 (Figura 27). Estas são enzimas já foram encontradas em animais e vegetais e entre outras funções atuam no transporte intracelular, em processos digestivos, na síntese de prostaglandinas, na detoxificação de substâncias tóxicas e proteção contra estresse oxidativo, conforme mencionado acima. Em plantas, estas enzimas têm papel no reconhecimento de compostos eletrofílicos estranhos às células, compostos xenobióticos, marcando-os para um subsequente seqüestro vacuolar (EDWARDS *et al.*, 2000).



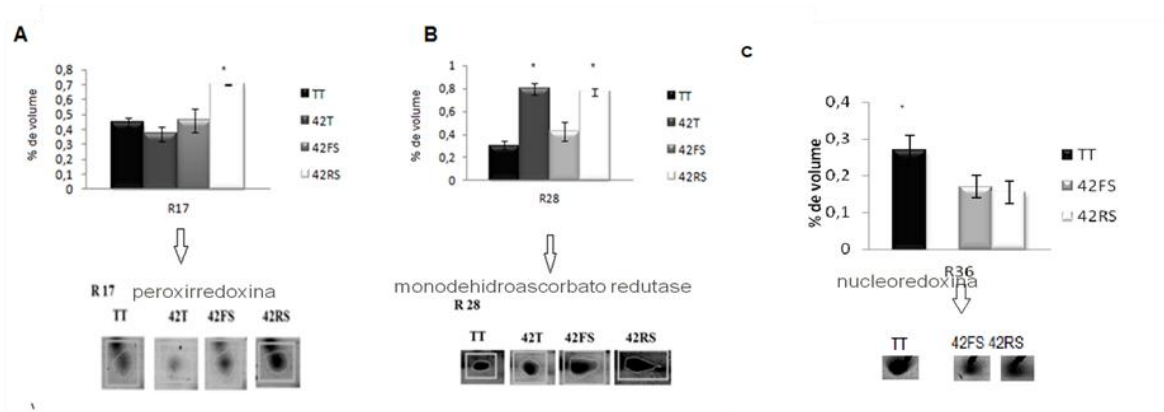
**Figura 27:** Proteínas identificadas na raiz de feijoeiro nas condições TT, 42T, 42FS e 42RS. Spots R8 e R22: isoformas de Glutathione S-Transferase, relacionadas a explosão oxidativa e resposta de defesa.

Análises do proteoma da resposta de *Arabidopsis thaliana* ao fungo *Alternaria brassicicola*, identificaram 2 isoformas de Glutathione S-transferase, com expressão aumentada nas folhas das plantas analisadas. Estudos anteriores do proteoma da interação planta-patógeno também mostram a expressão aumentada de diferentes GSTs em resposta a bactérias fitopatogênicas, sugerindo possíveis funções de resposta de *A. thaliana* à infecção por *A. brassicicola*, já que estas aparecem em diferentes isoformas e em grande abundância quando comparadas às plantas controle (MUKHERJEE *et al.*, 2010).

Neste estudo a expressão aumentada de GST na condição 42FS (spot R8) e na condição 42RS (Spot R22) (Figura 27), quando comparados às plantas controle, sugere um possível papel na resposta de defesa contra estes dois fitopatógenos, corroborando com os dados de Mukherjee e colaboradores, em 2010.

Os spots R17, R28 e R36 (Figura 28), foram identificados respectivamente como peroxirredoxina, monodehidroascorbato redutase e uma nucleoredoxina, e podem estar envolvidas na via de resposta ao estresse oxidativo.

JACKELINE LEITE PEREIRA



**Figura 28:** Spots identificados na raiz de feijoeiro, analisados nas 4 condições de trabalho (TT, 42T, 42FS e 42RS) que atuam na resposta oxidativa. Spot R17: peroxirredoxina, spot R28: monodehidroascorbato redutase e spot R36: nucleoredoxina.

A peroxirredoxina (Figura 28A) foi encontrada nas 4 condições descritas, no entanto, apresentou expressão aumentada apenas na condição 42RS, quando comparada às demais condições. É uma enzima que está envolvida na geração de EROs. A peroxirredoxina é uma peroxidase não hêmica, isto é, possui uma cisteína no sítio ativo, que é oxidada por uma molécula de peróxido de hidrogênio, a S- hidroxycisteína, esta por sua vez, forma uma ligação dissulfureto com a cadeia lateral de outra cisteína da peroxirredoxina. Tal ligação química constitui uma forma oxidada das cisteínas e sua redução química é feita por substrato orgânico (SCHIMIDT, 2008). Uma peroxirredoxina denominada GtAFP1, foi isolada de *Gentiana triflora*, quando infestada com *B. cinerea* (KIBA *et al.*, 2005). Esta proteína apresentou super expressão nos tecidos vegetais quando o fitopatógeno esteve presente. Em plantas transgênicas de tabaco, esta proteína conferiu resistência aos sintomas de *B. cinerea*. Os autores sugeriram que a detoxificação de EROs pela superexpressão desta peroxirredoxina suprime o desenvolvimento da doença causada pelo fitopatógeno mencionado, e que GtAFP1, pode ser utilizado na engenharia genética, aumentando a resistência a doenças nas plantas (KIBA *et al.*, 2005).

Neste estudo, apesar de não ter sido analisada a redução de sintomas nas interações mencionadas, pode-se sugerir que esta proteína, por estar

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

superexpressa na interação 42RS, provavelmente está envolvida na resposta de defesa de feijoeiro contra *R. solani* (Figura 28A).

As plantas protegem suas células e compartimentos subcelulares dos efeitos citotóxicos das ERO com o auxílio de enzimas antioxidantes. Uma monodehidroascorbato redutase (MDAR) (Figura 28B) foi identificada, com expressão aumentada nas condições 42T e 42RS. Nas plantas, MDAR é um componente enzimático do ciclo glutatona – ascorbato, um dos maiores sistemas antioxidantes das células vegetais, atuando na proteção contra danos produzidos por EROs, na regeneração de ascorbato e glutatona, na presença de NADPH (LIU *et al.*, 2012).

Em análises transcriptômicas de cultivares susceptíveis e resistentes de amora a *Colletotrichum acutatum*, o gene de uma monodehidroascorbatereductase apresentou alta expressão em ambos os cultivares susceptíveis e resistentes. Os autores sugeriram que este gene poderia estar envolvido na prevenção do ingresso do patógeno na célula (MILES *et al.*, 2011). Apesar de sabida sua atuação na defesa de plantas, os estudos recentes focam na função desta enzima em plantas submetidas a estresses abióticos, como em plantas de tabaco e *Arabidopsis* (CHEN & GALLIE, 2005; YIN *et al.*, 2010). Neste estudo, as maiores alterações na expressão da MDAR, foi nas interações ente planta + ALL 42 e planta+ALL42 + *R. solani* (Figura 28B), podendo indicar uma resposta mais intensa nestas 2 condições.

As tiorredoxinas, são uma família de proteínas envolvidas também ao estresse oxidativo. Um membro relativamente novo e não caracterizado desta família, trata-se das nucleoredoxinas (NRX). Neste estudo, interessantemente, o spot R36 teve expressão diminuída nas interações 42FS e 42RS, e não foi detectada na interação 42T (Figura 28C). Laloï e colaboradores (2004) mostraram a expressão aumentada de um gene de tiorredoxina (*AtTrx -h5*) durante a interação incompatível com o patógeno *P. syringae*, sugerindo uma função de reconhecimento e defesa deste gene.

JACKELINE LEITE PEREIRA

---

Rivas e colaboradores (2004), revelaram uma função para CF-9 tioredoxina na regulação de defesa vegetal em tomate contra o fungo patogênico *Cladosporium fulvum*, todavia, o mecanismo de atuação nestas respostas de defesa ainda não é bem elucidado.

As EROs são produzidas constitutivamente ou como produtos de diversos processos metabólicos, como nas interações tardias entre planta – microrganismos. A explosão oxidativa, que muitas vezes ocorre em um primeiro estágio da interação, atua como a primeira linha de defesa da planta. Para o microrganismo ter sucesso na invasão da planta, ele também deve produzir enzimas que sequestram EROs, ou conseguir suprimir os sistemas de produção de EROs nas plantas, para infectá-la (NANDA *et al.*, 2010). Esta produção massiva de EROs e seu sequestro, acontece no apoplasto entre a superfície celular dos 2 organismos, ou na rizosfera. Todavia, a explosão oxidativa parece ter intensidade diferente entre as interações planta-patógeno e planta-simbiontes. Esta diferença pode atuar como sinal específico, pré definindo a resposta do hospedeiro (NANDA *et al.*, 2010). Neste estudo, foram detectadas 3 proteínas com expressão diferencial nas condições descritas, que podem auxiliar na compreensão da resposta de defesa vegetal primária por produção de EROs.

## JACKELINE LEITE PEREIRA

**Tabela 4:** Proteínas identificadas de folha de feijoeiro

Nº do spot	Proteína	Nº de acesso (Bco feijoeiro e NCBI)	MASCOT		MW		pI		Sequencia da proteína no NCBI	Presença/ausência em plantas controle
			Cobertura seq. (%)	Score	<sup>a</sup> Esp/ <sup>b</sup> Teórico	<sup>a</sup> Esp/ <sup>b</sup> Teórico	<sup>a</sup> Esp/ <sup>b</sup> Teórico	<sup>a</sup> Esp/ <sup>b</sup> Teórico		
L3	<i>putative serine/threonine kinase</i>	1558202_2	29%	78	23,1/ 22,049	6,7/8,97			EFPLFNFSICISVATNNFSEENKLGKGGFGPVYK GKLPDGEQIAVKRLSRRSGQGLEEFKNEMMLIA KLQHRNLVRLMGCSIQGEKLLVYEYMPNKS DCFLFDPFKQTQLDWRRRFEIEGIARGLLYLHR DSRLRIIHRDLKASNVLLDESMNPKISDFGLARI FGGNQNEANTNRVVGTYGYMAPEYAM	presente
L6	<i>Unknown</i>	66974_3	22%	65	17,3/20,164	8,5/9,46			ELTISFEGEVYVFPVAVTPEKVQAVLLLLGAQEM TNSAPTSDILLQQNYQDIREINDPSRSSKLSRRF ASLVRFREKRKERCFEKKIRYSCRKEVAQRMH RKNQGQFASMKEDYKSPAENWDSSNGTPCPDST ERRCQHCIGISEKSTPAMRRGPAGPRSLCNACGL MWANKGTLRDLK	presente
L7	<i>Ribulose biphosphate carboxilase Small subunit</i>	gI809069	48%	76	15.7 /16	8.6 /8.99			TSVANNGGRVQCIQVWPTVGKKKFETLSYLPP LTKQQLAKEVDYLLRKGWVPCLEFELEHGFVY REHNKSPGYDGRYWTMWKLPFMFGCTSSQVL KELYEAQTAHPDGF IRIIGFDNVRQVQCISFIAKPPGY	presente
L8	<i>Unknown</i>	48950_3	34%	68	24,54/23,036	9,4/9,94			MGNALGGKTTKVMKIDGETFKLKTPIKVC DV LKDHPGLVLESEAVKHYGIRAKPLEAHKELMP KRLYFLVELPKEVTVAPRRVRSGINMSAKERPRE PRFGVAGRASDLTDHGNPRRAKRLLESGGGV LKMRLPKAEVERLMRGCEAEAAEKIMGLCM ANNGGVEARNGDGEVKGRVGESTKAREKRS FMPINEGGSPIAVAS	presente
L9	<i>SGF14h</i>	1716582_3	18%	64	27,9/29,152	9,66/5,27			MAAAPTREKNVYMAKLAEQAERYKKMVEF MEKVSAAANNEELTVEERNLLSVAYKNVIGAR RASRRIISSIERKEESRGNEHDVAVIRDYRSKIES ELSNICDILKLLDSRLIPSASSGDSKV FYLKMK GDYHRYLAEFKTGAKRKEAAESTLAAAYKSAQ DIANAELPPTHPIRLGLALNFSVFYIEILNSPDR ACNLAKQAFDEAIAELDTLGEESYK DSTLIMQL LRDNLTLWTSMDQDDGADEIKEAAPKQDDQ	presente

JACKELINE LEITE PEREIRA

<b>L10</b>	<i>conserved hypothetical protein</i>	3177_3	30%	71	17/17,493	3,5/4,66	SLHAFHHAPPHNVVRSVWCVCRSKESDSEGSP AEGDAKSQELLAQIAMLQTKVRLTDFLDE AYLSQFGEEAKAEFDKIGEDALKELDEAGARIT ANIESEMLAFEESSELNRVEIEESEKKIEFEGQ MEKNRNEGLFFKNLGEKALDDKEK	presente
<b>L15</b>	<i>unknown</i>	54846_3	33%	107	21,3/25,81	9,5/9,76	TYVIKIPKDVYRVPPEENARRYDQYARRKHR RSRCCCCFCWLGILFILVLLAIAAGVLYLVFR PEAPKYSIENITVRGINLTPSSVAAISPEFNVTV KADNPNDKIGIRYLKDSAEVFKDARLCNGA LPAFYHPSNNVTVFGTALRGDGIELRSEDRRAL LEAQTKRVRPLTVRIRAPVKIKVGSIRTWKITVK VNCDVTVNELTAQAKIVSKRCSYDVDLW	presente
<b>L17</b>	<i>unknown</i>	70740_3	37%	67	16,9/16,178	10.13/11,33	KPISSPGRTEKFPPLMRFLRNNASSRSRGRSRT TTAMFLRKKNTNNIETQEPSSPKVTCMGQVRV KRSASKRVPSAGATPTKFRCCSWVPHALFFH RLIKPEVCFPFQCKQVWPWVXFLQRKKRDSKV TETSSPKTELN	ausente
<b>L20</b>	<i>unknown</i>	92785_2	10%	61	34/36,75	5,2/6,12	MSDERAVHPDCRNASNPYHECSDYCFRVI KIRSQQQESEVGGASGGNNSKAIPDESYVEKE IHNGRPDLEENSDDSDPDQPAVQEAQEVDYTKL SARQKKWMLRSMQEAKKRNQIEIAAEKKR MEAPTESRQVSKQKWLDRKKNKIGKLLDANGL DMTKAYMLDTQEAAEEKYKKWEKDPAPFGW DVFNQKTLYNAYKKRTKNVEVDVEEYNRMKE ADPEFYRDASSLQYGKAPKISEEKIDRMVRELK DRDEKRNSFSRRRRFHEEKDIDSINDRNEHFNK KIERAFGKYTLEIKNNLERGTALPD	presente
<b>L22</b>	<i>rubisco activase</i>	455_1	21%	102	48,2/48,23	6,8/6,49	MAASLSTVGAVNRTLLNLNGSGGGASGPSSAF FGTSLKKVISSRVPNSKLTSGSFKIVAADKEIEET QQTEGDRWRGLAYDVSDDQDITRGKGLVDS LFQAPMDAGTHYAVMSSHEYL SAGLRQYDFD NMKDGFIAPAFDCLKLVHIAKNFMTLPNIKVP LILGVWGGKQGKSFQCELVFAKMGINPIMMS AGELESGNAGEPAKLIRQRYREASDLIKKGM CVLFINDLDAGAGRLGGTTQYTVNNQMVNAT LMNIADNPTNVQLPGMYNKEDNARVPIHTGN DFSTLYAPLIRDGRMEKFYWAPTREDRIGVCKG IFRTDGVPEKDIVELVDKHPGQSIDFFGALRARV YDDEVRKVISGVVDSVGGKLVNSKEGPPTFD QPKMTLDKLLYASMLVQEENVKRVQLADQ YLNEAALGNANEDAISGSFFK	ausente

JACKELINE LEITE PEREIRA

<b>L23</b>	<i>carbonic anhydrase</i>	749_3	25%	81	29,5/35,6	7,6/8,09	MSTSSINGWCLSSISPAKTSLKATLRPSVFATIT TPSSPSSSSSSSPSLIQDRPVFAAPSPITPTVRGD MAKEYEQAIEELQKLLREKSELKATAAEKVEQI TASLGTTSSDGIPSEASERIKTGFLYFKKEKYD KNPALYGELAKGQSPKFMVFACSDSRVCP SHV LDFQPGEAFVVRNVANIVPPYDQSKYSGTGA AI EYAVLHLKVSNI VIGH SACGGIKGLLSFPYDG TYSTDFIEEWVKIGLPAKAKVKTQHGDAPFGEL CTHCEKEAVNVSLGNLLTYPFVRDGLVNKTLA LKGYYDFVKGSFELWGLNFG LASSFSV	presente
<b>L25</b>	<i>glutathione S-transferase GST 13</i>	40460_3	15%	66	30/25,19	5,4/5,53	MASYHEEEVRLLGK WASPFSNRVDLALKLKG V PYKYSEEDLANKSADLLKYNPVHKKVPVLVHN GNPLPESLIIVEYIDETWKNP LLPQDPYERALA RFWSKTLDDKILPAIWNACWSDENGREKAVEE ALEALKILQEALKDKKFFGGESIGLV DIAANFIG YVVAIQEIAGLELLTIEKFPKLYKWSQEFINHP VIKEGLPRDELFAFFQASAKK	ausente
<b>L26</b>	<i>cinnamoyl-CoA reductase family</i>	Pa_04ANAA3_T 7_068_B05_26FE B20	27%	65	16,8/17,71	5,8/5,61	VNVLTAAKEAGVRRVVVTSVSAIIPSPNWPGD VPKREDCWADVEFCQKGLWYSLSKTLAEKA AWDFAKESGLDVVVVNSGTVMGPITPRLNAS MLMLLRLLQGSDETYEDIFMGSVHLNDVTLAH ILVYENKSAAGRHL CVESISRFGDFAAKVAELY P	ausente
<b>L27</b>	<i>uncoupling protein 1a</i>	18378376	30%	80	26/25,9	9,5/9,63	LQLQKQAATGDVVS LPKYKGM LGTVATIAREE GLSALWKGIVPGLHRQCLYGG LRIGLYDPVKTF YVGKDHVGDVPLSKKILAAFTTGAF AIAVANPT DLVKVRLQAEGLPPGVPRRYSGLNAYSTIVR QEGVGALWTGLGPNIARNGIINAELASYDQV KQILKIPGFTDNVVTHLLAGLGAGFFAVCI GSP VDVVKSRRMMGDSSYRNTLDCFIKTLKNDGPLA FYKGFLPNFGRL	presente
<b>L35</b>	<i>Aminomethyltransferase</i>	3140_3	39%	116	44,7/44,205	8,3/8,78	MRGGLWQLGQLVTRRLAHGDKKAVARRCFAS AELKKTVFHDFHVHGGKMVPFAGWSMPIQYK SIMDSTINCRQNGSLFDVSHMCGLSLKGKDAAPF EKLVIADVAGLAPGTGTLTVFTNEKGG AIDDSVIT VTDDHIYLVNAGCRDKDLAHIEEHMKAFKAKG DVSWHIHDERSLLALQGPLAAPVLQH LTKEDLSK YFGEFRVLDINGSQCFLTRTGYTGEDGFEISVPSE GVDLAKAILEKSEKIKLTGLGARDSLRLEAGLC YGN DMEQHITPIEAGLTWAIGKRRRAEGGFLGAD ILKQLEEGPSIRRVGFISSGPPRSHSEIQDEGGKNI EITSGGFSPCLKKNIAMGYVKSGLHKAGTKVKIII	ausente



JACKELINE LEITE PEREIRA

GKANEGVVTKMPFVPTKYYKPS								
<b>L38</b>	<i>GTP-binding protein</i>	60773_1	46%	69	17,5/9,67	9,8/9,92	MATVMQKIKDIEDEMARTQKNKATAHHLGLL KAKLAKLRRELLTPSSKGAGGAGEGFDVTKSG DSRVGLVGFPSVVGKSTLLNKLGTTFSEV	presente
<b>L41</b>	<i>ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit</i>	44810_2	15%	67	58/52,62	4,9/6,09	MSPQTETKASVGFKAQVVDYKLYTPDYETK DTDILA AFRVTPQGPVPEEAGA A VAAESSTGT WTTVWTDGLTSLDRYKGRCYGLEPVAGEENQ YIAYVAYPLDLFEEGSVTNMFTSIVGNVFGFKA LRALRLEDLRIPTSYIKTFQGPPIGIQVERDKLN KYGRPLLGCTIKPKLGLSAKNYGRAVYECLRG GLDFTKDDENVNSQPFMRRDRFLFC AE AIFKSQ AETGEIKGHYLNATAGTCEEMMKRAVFARELG VPIVMHDYLTGGFTANTSLAHYCRDNGLLLHI HRAMHAVIDRQKNHGMHFRVLAKALRLSGGD HVHAGTVVGKLEGEREITLGFVDLLRDFVEK DRSRGIYFTQDWVSLPGVLPV ASGGIHWHP ALTEIFGDDSVLQFGGGTLGHPWGNAPGAVAN RVALEACVQARNEGRDLAREGNEIIREASKWSP ELAAACEVWKEIKFEFQAMDTL	presente
<b>L42</b>	<i>Full= Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase Phaseolus vulgaris</i>	gI10720248	25%	83	26/42,7	6,1/8,7	MAASLSTVGAVNRTLLNLNGSGGGASGPSSAF FGTSLKKVISSRVPNSKLTSGSFKIVAADKEIET QQTEGDRWRGLAYDVSDDQDITRGKGLVDS LFQAPMDAGTHYAVISHKYLSAGLRQYNFDN IKDGFYIAPFLDKLVVHIAKNFMTLPNIKVPLI LGVWGGKQKSFQCELVFAKMGINPIMMSA GELESGNAGEPAKLIRQR YREADLIKKGKMC VLFINDLDAGAGRFSTLYAPLIRDGRMEKFW APTREDRIGVCKGIFRTDGVPEKDIVELVDKHP GQSIDFFGLRARVYDDEVRK WISGVGVDSVVGK KLVNSKEGPPTFDQPKMTLDKLLLYASMLVQE QENVKRVLADQYLNEAALGNANEDA IKS GSF FK	presente

## JACKELINE LEITE PEREIRA

**Tabela 5:** Proteínas identificadas de raiz de feijoeiro.

Nº do spot	Proteína	Nº de acesso (Bco feijoeiro e NCBI)	MASCOT		MW		pI	Sequencia da proteína no NCBI	Presença/ausência em plantas controle
			Cobertura seq. (%)	Score	<sup>a</sup> Esp/ <sup>b</sup> Teórico	<sup>a</sup> Esp/ <sup>b</sup> Teórico			
<b>R3</b>	<i>conserved hypothetical protein</i>	1563790_2	36%	72	13/10,9	5.39/9,83	DTKVALAFGMVAARRYGTDITLWHGLQKGDPYRLLREGI TALLNSYNSLQFSYHPIGVVEHMNLALMGSNRSVLLTALRFK RANSAGNVTCCKFTTC	presente	
<b>R4</b>	<i>t-snare</i>	1070170_3	65%	66	4,1/4,75	8.13/9,056	MASSFDRWEKDPFFNAEEVQESADRMESTYRTWIHSMRDA SSPWNCDELRRDLQTTLTGTAKWQLEEFERAARSSY	presente	
<b>R5</b>	<i>ripening related protein</i>	2678_1	17%	64	17/ 17,767	6.30/5,48	MVLLGKISTEIGVHATAEKWFNLFQKQLHDVQHLAERVHGT KLHQGEDWHHNDTIKQWYVIDGKVTTCHESESVDENNTI YYKLFGEDIDHRFKVFKLIFQAIDKENHGVIIKWTIEYEKLDG EVEPPYGYIEYLHKCTSDIDANLLKA	ausente	
<b>R6</b>	<i>peptide deformylase</i>	1006202_1	48%	65	18/ 10,21	6.14/5,25	SSQTCSARAGWFLGLGADSKKTNLPDTPVKAGDPVLHEPAQD VDPNEIKSERVQKIIDDMIQVMRKAPGVGLAAPQIGIPLRIIVL EDTKEYISY	presente	
<b>R7</b>	<i>ACBP3 (ACYL-COA-BINDING DOMAIN 3); acyl-CoA binding</i>	1559111_1	27%	77	26/22,193	6.93/4,27	AAASSDIERQIEESMVEPVFPSESTVLSVPQAATCVGSELKVE EVVMEVGSNNVLESPLKRSRDIKVKEEIAEANEGETREFDEKR DVESVEDSCTEIEVSTVENGVKENYDDEDDDWEGIERSELE KEFMAATEFVTHECDRLSEVGSNVKMELYGLHKVATEGPCR EPQPMPLKLSARAKWNAWQKLGNMNPEVAM	presente	
<b>R8</b>	<i>putative glutathione S-transferase [Phaseolus acutifolius]</i>	gi 21217741	26%	72	26/25	6.77/5,57	MVLKVYGPCTASTKRVLVCLLEKEVEFEVIPVDLTKGEHKDP EFLKLQPFVGVVPIQDGDYTLYESRAIMRFYADKFRSQGVEL LGRTAEEERGVEQWLEVEAHNFHPPAYDLAVHVLVFLASLFGIT PDPKVEESEAKLLKVLVDVYEDRLSKGKYLGGDFLSLADISHL PFIDYIVNKMNGYLIKERKHVSDWDDISSRPSWKKVNQL YPPPV	presente	
<b>R10</b>	<i>chalcone isomerase (EC 5.5.1.6) - kidney bean (fragment)</i>	4178_2	49%	105	26,5/15,28	5.38/5,63	LDIFYRDIISGPFEKLIRGSKILQLSGTEYSRKMENCVAHLKSV GTYGDAEAKGIEEFAEAFKKNVFPFGASVFYRQSPHGILGLSF SEDATIPGEEAVVIENKAVSAAVLETMIGEHA VSPDLKRSLAS RLPAVLNGGIIV	presente	

<b>R11</b>	<i>Pto-like kinase SG5-3b [Phaseolus vulgaris]</i>	gi 14010525	39%	92	30,6/34	6.87/5,3 5	PGSGQGLPEFQTEIMVLSKIRHRHLVSLTGYCDERLEMILVVE YMEKGTLRDHL YNTKFP TLSWKARLQICIDSARGLHYLHKG AAGGIIHRDVKSTNILLDENHVAKVADFGLSRSGPLGTESYVT TGVKGTFGYLDPEYFRSQQLTEKSDVYSFGVVLWQVLCARA AIDPSLPRDQINLVWWGLLCKNKGTLQEIIDPSIKDQIDQNSLR KFSETIEKCLQEDGSDRPTMGDVLWDLEYAVQLQRGANAIQ REPYEGSSSSVSASFQLPNVRRRLPSLSTLSEADDTIVRNDES AVDYVFSQLKIDDAR	presente
<b>R12</b>	<i>isoflavone reductase</i>	2132_1	28%	75	33/29,31	7.31/ 6,6	MAEKSKLIIIGGTGYIGKHIVEASAKSGHPTFALVRESTVSDPA KAQLIDHFKALGVNLVHGDLVDHETLVKAIKQVDVISTVG HLQLADQVKIIAAIKEAGNVKRFFPSEFGNDVDRVHAVEPAK SAFAIKVQIRRSIEEEGIPYTYVSSNYFAGYFLPTLAQPGVFAP PPPDKVVFIFGDGNPKAIFNKEEDIGTYTIRAVDDPRTLKILY LRPPQNTYSFNLVALWEKKIGKTLEKIYVPEEKLLKDIEEAPI PINVIL	presente
<b>R15</b>	<i>protein phosphatase 2C-like protein</i>	43064_3	14%	65	37, 43/31,08	7.21/6,3 6	MTGKDILHIMKVKAGFAPPDTGKGGKISKHITHGFHLMKG KSAHPMEDYL VSEFKQEKDRELGLFAIFDGHGHDVASYLQ NHLFQNILKEHDFWTESETAVKRAYLETDEKILEQALVLRG GSTAVTAILIDGQKLVVANVGDSRAVICENKARQLSVDHEP SKEKKWIERRGGFVSKIPGDVPRVDGQLAVARAFGDRSLKM HLSSEPDVLEVEVDPHTEFLILASDGIWKVMSNEEAVESIRQI KDAQAAAKHLIEEAVSRKSKDDISCIVVRF	presente
<b>R16</b>	<i>histone acetyltransferase complex component</i>	47122_2	41%	64	14,82/16,9 0	4,19/8,3 7	RLQELKEARAAGCRNSAEADRYLAQKRRREAEESGCRTKES AQGGPSNQGVNALMSPDSAGKDLSGRPAGPATSSSVNEMD VTGYYGADLLSEPEKRLCCELRLPPAMYLKMQEQLSLQILAG TVAAKSDAHQLFKMDAMKIDRVYDMLIKKGI	ausente
<b>R17</b>	<i>peroxiredoxin</i>	1721940_1	32%	69	19/17,33	5.86/5,4 1	MPIAVGDAIPDGILAYLD DENK PQT VSIHSLAAGKKVIIFGV PGAFTPTCSLKHVPGFIERAEELKGGKVDEVICISVNDPFVMN SWAKTFPENKHVKFLADGAAKYTNALGLELDLTEKGLGVRS RRFALLVEDLKVKVANVESGGEFTVSSAEIHKAL	presente
<b>R18</b>	<i>unknown</i>	885_2	36%	65	19/24,4	5.71/8,8 3	QRSLIYAFVSRGTVILAEYTEFSGNFN TIAFQCLQKLPASNNKF TYNCDGHTFN YLVDNNGFTYCVVADESIGRQVPVAFLEKVD DFLAKYGGGKAATAAANSLNKEFGSKLKEHMQYCVHPPEEI SKLAKVKAQVSEVKGVMMENIEKVLDRGEKIELLVDKTENL HHQAQDFRNSGTKIRRKMWLQNMKVKLIVLAILIALILIVLS VCRGFNC	present
<b>R19</b>	<i>acyl-CoA-binding protein</i>	1559111_1	27%	77	23/22,1	3.99/4,2 7	AAASSDIERQIEESMVPEVPFSESTVLSVPQAATCVGSELKVE EVMMEVGSNVVLESPLK SRSDIAVKEEIAEANEGETREFDEKRDVESVEDSCTEIEVSTVE NGVKENYDDEDDWEGIERSELEKEFMAATEFVTHECDRL ESVGSNVKMELYGLHKVATEGPCREPPMPLKLSARAKWNA WQKLGNMNPEVAM	ausente
<b>R20</b>	<i>14-3-3-like protein</i>	1091231_2	29%	80	29/10,82	4,35/5,3 9	SAPTTREDDYEMAKLADQSTRYEEMEEFMNKVYLSAXSYEL TVEERNLLSVAYKNMIGARRASXRIISSIEQKEESRSNXDHCP	ausente

VIHDYRSR								
<b>R21</b>	<i>14-3-3 protein</i>	282_1	36%	92	29/28,41	5.46/4,6 7	REEFVYMAKLAEQAERYEEMVEFMEKVSAAAENEELTVEER NLLSVAYKNVIGARRASWRIISSIEQKEESRGNEHDVSVIRDY RSKIESELNICDGILKLLDSRLVPSAASGDSKVFYLMKMGDY HRYLAEFKTTGGDRKEAAESTLSAYKSAQDIANSELPPHTPIRL GLALNFSVFYYEILNSPDRACSLAKQAFDEAIAELDTLGEESY KDSTLMQLLRDNLTLWTSDMQDDGADEIKEAAPKADGE	presente
<b>R22</b>	<i>glutathione S-transferase</i>	3838_2	28%	76	45/25,5	5.54/5,2 9	MASSQEEVTLGATASPFVCRVKIALKLGIEYKYVEENLGN KSEQLLKYNPVHKKVPVVFVHGDKPLAESLVIVEYIDETWNNN PILPSDPYQRALARFWSKFIDDKIVGATWKS VFTADEKEREK NVAEASESLQFLENEIADKKFFGGEELGLVDIAAVYVAFWIPL VQEIGGLELLTSEKFPNLYKWSQEFVSHPIVKESLPPRDPVFGF FKGRYESLFASK	presente
<b>R24</b>	<i>kinesin light chain, putative</i>	1563330_4	29%	62	15/16,22	8,5/10,6	IQQGGERKRAFLEVFXTKGVGGGSMFQKKKGAXMFEGGRGI LNRSVGLFLKTFEGEGILQATYDVMGKSWKSEXDLRIFPXSX GRKSLEXQILILKNKKRGLVKLLKEAGKTRDRKAKSLENLIDP GSKRTKKEGTRKRWPLGFR	presente
<b>R26</b>	<i>NAC domain protein NAC1</i>	60446_3	15%	83	35,2/34,34	6,5/8,66	MSNISMVEAKLPPGFRFHPRDEELVCDYLMKKVAHNSLLMI NVDLNLKCEPWDIPETACVGGKEWYFYTQRDRKYATGLRTRN ATASGYWKATGKDRSILRKGTLVGMKRKTLVFYQGRAPKKG KTEWVMHEFRIEGPHGPPKISSSKEDWVLCRVFYKNREVSAAK PRMGSCYEDTGSSSLPALMDSYISFDQTQTHADEFEQVPCFSI FSQNQTSPIFNHMATMEPKLPANHATNAYGGAPNLGYCLDPL SCDRKMLKAVLNQITKMERNPLNQLSKGSPSLGEGSSESYLS EVGMPHMWNNY	ausente
<b>R27</b>	<i>fructokinase</i>	3813_1	34%	73	46/34,34	5,8/5,19	ATGTGLIASFGEMLIDFVPTVSGVSLAEAPGFLKAPGGAPANV AIAVARLGGKAAAFVGLGDDEFGHMLAGILKENGVRADGIT FDQGARTALAFVTLRADGEREFMFYRNPSADMLLKPEELNLE LIRSAKVFHYGSISLIVEPCRSAPHLKAMEVAREAGCLLSYDPN LRLPLWPSADE ARKQILSIWEKADLIKVS DVELEFLTGSDKIDDASALS LWHPN LKLLLVTLGEQGSRY YTKSFKGSVDAFHVNTVDTTGAGDSF VGALLSKIVDDQSILEDEPRLRDVLFANACGAITTTQKGAIP ALPKEEDALKIHK	presente
<b>R28</b>	<i>monodehydroascorbate reductase</i>	5178_2	37%	94	49/24,6	6,2/5,03	AFYEGYYANKGVNIIKGTVAVGFTSNSDGEVNEVCLKDGRV LEADIVVVGVGRRPQTALFKGQVEEDKGGIKTDSFFKTNLS VYAVGDVATFPLKLYGELRRVEHVDHSRKS AEQAVKAIKAA EDGKTIEEYDYLPHYFYSRAFDLSWQFYGDVNGDTALFGDNEP ASPKPKFGTYWIKDGVVGVFLENGTPENS AIAKVARVQPP VADVQLAKEGLSFASKI	presente
<b>R30</b>	<i>NAC domain protein NAC1 [Phaseolus]</i>	gi 15148912	22%	73	36,3/34	8.5/8.32	MSNISMVEAKLPPGFRFHPRDEELVCDYLMKKLTHNSLLMI DVDLNLKCEPWDIPETACVGGKDWYFYTQRDRKYATGLRTRN RATASGYWKATGKDRPILRKGTLVGMKRKTLVFYQGRAPKGR KTEWVMHEFRIEGPHGPPKVS SKEDWVLCRVFYKSREVSAA	present

	<i>vulgaris]</i>						KPSMGSYEDTGSSSLPALMDSYISFDQTAHADEFEQVPCFS IFSQNAQANPIFNHMTTMEPKLPATTYGGAPNLGYCLDPLSCD RKVLKAVLSQITKMERNPLNQLKGGSTSFGESESSEYLSEVG MPHMWNNY	
<b>R31</b>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	880_3	38%	123	34,4/34,47	5,7/5,83	LVARVALQRNDVELVAINDPFITTDYMTYMFKYDTHVGQWK HFDVKVKDSKTLFLFGEKAVAVFGTRNPEDIPWGEV GADYVV ESTGVFTDKDKAAAHLKGGAKKVVISAPSKDAPMFVVGVNE KEYKPELDIVSNAASCTTNCLAPLAKVINDRFGIVEGLMTTVHA ITATQKTVDGPPSSKDWRGRAASFNIIPSSGAAKAVGKVLV ALNGKLTGMSFRVPTVDVSVVDLTVRIEKPATYEQIKAAIKE ESEGKLGILGFTDEDVVDVDFVGDSSSIFDAKAGISLNENF VKLVSWYDNEWGYSTRVIDLIVHI	absent
<b>R32</b>	<i>ferritin</i>	1118_3	25%	80	28/28,30	5,96/5,64	MALAPSKVSPFSGFSLSDGVGAVRNPTCSVSLSFLNKKVGSR NLGVSASTVPLTGVIFEPFEEVKKEELAVPTAGQVSLARQYY ADECESAINEQINVEYNASYVYHSLFAYFDRDNVALKGFARF FKESSEEREHAELMKYQONTRGGRVVLHPIKNVPSEFEHVE KGDALYAMELALSLEKLVNEKLRVSVHADRNDKPLADFI ESEFLSEQVEAIKKISEYVAQLRMVGGKGGVWHFDQSLLDH GHAA	present
<b>R35</b>	<i>protein disulfide isomerase-like protein</i>	131_3	26%	121	67/54,1	4,55/5,08	KEFVLTLDHTNFHDTVSKHDFIVIEFYAPWCGHCKKLAPEFE KAASILSSHDPPIVLAKVDANEEKNKELAMEYDVKGYPYTIKIV RNGGKNIQEQYKGPREADGIVDYLKKQNGPASTEIKSADEATA LIGENKIAIVGVFPKFSGEEFDNFIALAEKLRAEYDFGHTLNA KHLPRGESSVAGPLIRLFKPFDELFDVDSKDFHVDTLEKFVEES STPVVTVFNNDPNNHPFVVKFFNSPNAKAMMFINFTAESAES FKSKYREAAEQYKQGGVSVLVDVVESSQGAQYFGLKEEQV PLIIHQHNDGKKKFFKSNLEADHIPTWLKAYKEGNIAPYVKSEPI PETNNEPVKVVVGENLQDIVFKSGKNVLEFYPWCGHCKQ LAPILEEV AISYQSDANVIAKLDATANDIPSDTFEVQGYPTLY FRSSSGTLSQYDGGRTKEDIIEFIEKNRDKPAQQEQDKPAHQE QVKDEQETGKDEL	absent
<b>R36</b>	<i>nucleoredoxin, putative</i>	5572_2	34%	123	52/37,35	6,95/4,72	DNTHDVVSLSSPQRDFLLRNNGDQVKIESLKGKGLGVYFSA SWCGPCRKFTPTLVEAYNEVVSKGDFEVVFASADEDEESFKG YFSKMPWLAIPFSDSETRSRDELDFHVRGIPHLVILEETGKVVT EDGVDIVREYGVDAYPFTSARIQELRAQEEEARRNQSVRSLLI SPSRDFVISSDGNLILVSELEGKTVGLYFSLNSFQRSSEFTPKL VEVYEKLLKAKGENFEVVLIPLDEDEESFKKVLVSPWLSLFPK DKFCGKLAQYFELSTLPTLVIIGPDGKTLNPNVAEAIEDHGVD AYPFTPEKFFVELDEILKAREAAQTLESVLVS	present
<b>R39</b>	<i>ATPase catalytic subunit A</i>	gi 363806922	21%	105	66/68.9	6,04/5,29	MPAVYGARLTTFEDSEKESEYGYVRKVSGPVVVADGMAGA AMYELVRVGHNDLIGEIIRLEGDSATIQVYEETAGLMVNDPV LRTHKPLSVELGPGILGNIFDGIQRPLKTIKRSGDVYIPRGVS VPALDKDTLWEPQPKKIGEGDLLTGGDLYATVFENSLMQHHI	absent

							ALPPDNMGKITYIAPPGQYSIKDTVLELEFQGVKKKFTMLQT WPVTRPRVASKLAADTPLLGTGQRVLDALFPSVLGGTCAIPG AFGCGKTVISQALSKYSNSDAVVYVGCGERGNEMAEVLMDF PQLTMTLPDGREESVMKRITLVANTSNMPVAAREASIYTGIT LAEYFRDMGYNVSMADSTSRWAEALREISGRLEMPADSG YPAYLAARLASFYERAGKVKCLGGPERTGSVTIVGAVSPPGG DFSDPVSATLSIVQVFWGLDKKLAQRKHFPSVNWLSYSKY STALETFYEQFDPDFINIRTKAREVLQREDDLNEIVQLVGKDA LAEGDKITLETAKLLREDYLAQNAFTPYDKFCPFYKSVWMM RNIHFYNLANQAVERGAGSDGQKISYTLIKHRMGDLFYRLV SQKFEDPAEGEAALVAKFQKLHEDLTNGFRNLEDETR	
<b>R40</b>	<i>PR1-like protein</i> [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	gi 93359572	29%	117	16.3/16	4,3/4.83	TFEDQTTSSVAPATLYKAVAKDADTIFPKALPDSFKSVEIVEG NGGPGTIKKISFVEDGETKFVLHKIESIDEANLGYSYSIVGGVA LPETAEKITFDSKLSDGPNGGSLIKLSITYHSGKDAPPNEDELK AGKAKSDSLFKAVEAYLLANP	absent
<b>R41</b>	<i>PR1-like protein</i> [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	gi 93359572	65%	139	16/16	4.89/4.8 3	TFEDQTTSSVAPATLYKAVAKDADTIFPKALPDSFKSVEIVEG NGGPGTIKKISFVEDGETKFVLHKIESIDEANLGYSYSIVGGVA LPETAEKITFDSKLSDGPNGGSLIKLSITYHSGKDAPPNEDELK AGKAKSDSLFKAVEAYLLANP	present

## **CONCLUSÕES**

Neste estudo, *Trichoderma harzianum* ALL 42, demonstrou ser capaz de colonizar as raízes de feijoeiro comum, promovendo seu crescimento, aumento de área foliar e radicular. Nesta interação, quando os fungos fitopatogênicos *R. solani* e *F. solani* presentes no solo, observou-se um aumento nas atividades de enzimas envolvidas na resposta de defesa vegetal, quitinases,  $\beta$  1,3 glucanases e peroxidases, em raízes (resposta local) e folhas (resposta sistêmica) das plantas analisadas, em 7, 14 e 21 dias de crescimento.

O estudo dessas interações, quanto à análise de transcritos para os genes *LOX1*, *CHT1*, *GLUC* e *POD6*, codificadores de proteínas de resposta de defesa vegetal lipoxigenase, quitinase, glucanases e peroxidases, também apresentou mudanças significativas em nível de expressão nas raízes das plantas tratadas com *Trichoderma* / *Trichoderma* + fitopatógeno / fitopatógeno, quando comparadas às plantas controle. As maiores mudanças no padrão de expressão foram detectadas para os tempos de 14 e 21 dias de crescimento.

Resultados das análises proteômicas das condições TT, 42T, 42FS e 42RS, mostraram que os padrões das proteínas expressas foram alterados tanto em folhas, quanto em raízes de feijoeiro cultivado na presença de *T. harzianum* ALL 42 e os fitopatógenos *R. solani* ou *F. solani*, quando comparados com a condição controle. Para as proteínas identificadas com expressão diferencial, dezenove foram identificadas para folhas e trinta e nove para raízes, e grande parte destas atuavam na resposta de defesa vegetal e no metabolismo da planta. Diante disso, é possível que mecanismos associados à defesa das plantas sejam ativados durante a relação entre feijoeiro e ALL 42, bem como potencializar a resposta de defesa contra *F. solani* e *R. solani*.

As análises feitas neste estudo do crescimento de plantas de feijoeiro em solo interagindo com *Trichoderma*/ fitopatógenos, foram feitas de forma a simular a condição natural de plantio feita para culturas de feijoeiro comum.

## **Jackeline Leite Pereira**

---

Estas análises permitem que os resultados descritos possam auxiliar na melhor compreensão das interações descritas, bem como no desenvolvimento de novas ferramentas que visem à minimização de danos causados por estes fitopatógenos, como a utilização direta de formulados de *Trichoderma* nos sistemas de plantio, a seleção de genes de resistência em resposta a *F. solani* e *R. solani*.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A. F. B. (2005). Cultivo do Feijão da Primeira e Segunda Safras na Região Sul de Minas Gerais. Doenças e métodos de controle. Embrapa Arroz e Feijão. Sistemas de Produção, N.º. 6 Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoPrimSegSafraSulMG/doencas.htm>
- ACOSTA-MUNIZ, C. H.; ESCOBAR-TOVAR, L.; VALDES-RODRIGUEZ, S. FERNANDEZ-PAVIAD, S.; FARIAS, L. S.; SAUCEDO, BARQUERAE, M. L. E AND MIGUEL, A. G. L (2011). Identification of avocado (*Persea americana*) root proteins induced by infection with the oomycete *Phytophthora cinnamomi* using a proteomic approach *Physiologia Plantarum* 144: 59–72.
- ALFANO, G; IVEY, M.L.L., CAKIR, C.; BOS J.I.B., MILLER, S.A.; MADDEN, L.V.; KAMOUN, S.; HOITINK, H.A.J (2007). Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathology* 97: 429-437.
- ALKHALFIOUI F; RENARD M; FRENDO P; KEICHINGER C; MEYER Y; GELHAYE E; HIRASAWA M; KNAFF D.B; RITZENTHALER C; MONTRICHARD F (2008). A novel type of thioredoxin dedicated to symbiosis in legumes. *Plant Physiol.* 148, 424–435.
- ANFOKA, G. E BUCHENAUER, H. (1997). Systemic acquired resistance in tomato against *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with tobacco necrosis virus, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50. 85 -102.
- APEL, K.; HIRT, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399.
- ARAGÃO, F.J.L.; JOSIAS CORRÊA, J. F.(2005). Obtenção de feijoeiro resistente ao vírus do mosaico dourado, ANBio-notícias. Disponível em: [http://www.anbio.org.br/noticias/francisco\\_aragao.htm](http://www.anbio.org.br/noticias/francisco_aragao.htm).
- ARUMUGANATHAN, K. EARLE, ED. Nuclear DNA content of some important plant species (1991). *Plant Molecular Biology. Report*, v.9, p. 208-218.
- BAILEY, B. A.; BAE, H.; STREM, M. D.; ROBERTS, D. P.; THOMAS, S. E.; CROZIER, J.; ET AL. (2006). Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta*, 224, 1449–1464.
- BAILEY, B.A. E LUMSDEN, R.D. (1998). Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. In: *Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, Biological Control and Commercial Applications*. (Eds. C.P. Kubicek, G.E. Harman & K.L. Ondik). Taylor and Francis, London, pp.185-204.
- BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J.; LOON, L.C.V. (2007). Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 97, 239–243.
- BARROS, F.C.; SAGATA, E ; FERREIRA, L.C.C.; JULIATTI, F.C. (2010). Induction of resistance in plants against phytopathogens. *Biosci. J.* 26: 231-239.

**Jackeline Leite Pereira**

---

- BELL J.N.; DIXON, R.A.; BAILEY, J.A.; ROWELL, P.M.; LAMB, C.J. (1984). Differential induction of chalcone synthase mRNA activity at the onset of phytoalexin accumulation in compatible and incompatible plant-pathogen interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81:3384–3388.
- BENÍTEZ T.; RINCÓN A.M.; LIMÓN M.C; CODÓN A.C (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol*. 4:249-60
- BERNARDES, F.S.; PATRÍCIO, F.R.A.; SANTOS, A.S.; FREITAS, S.S (2010). Indução de resistência sistêmica por rizobactérias em cultivos hidropônicos. *Summa Phytopathol., Botucatu*, 36:115-121.
- BERNI, R. F.; SILVEIRA, P. M.; COSTA, J. L. (2002). Influência do preparo de solo e da rotação de culturas na severidade de podridões radiculares no feijoeiro comum. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/211911>.
- BIANCHINI, A.; CARNEIRO, S.M.T.P.G.; LEITE JÚNIOR, R.P. (2005) Doenças do feijoeiro e seu controle. In: Instituto Agrônomo do Paraná. Feijão: tecnologia de produção. Londrina: IAPAR, p.55-75.
- BIZI, R. M (2006). Alternativas de controle do mofo-cinza e do oídio em mudas de eucalipto. 70 f. Dissertação de Mestrado em Engenharia Florestal - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- BJORKMAN T., BLANCHARD L.M. AND HARMAN G.E. (1998). Growth enhancement of shrunken-2 sweet corn when colonized with *Trichoderma harzianum* 1295-22: effect of environmental stress. *J. Am. Soc. Hort. Sci*. 123: 35–40.
- BONALDO, S.M; PASCHOLATI, S.F; ROMEIRO, R.S; (2005). Indução de Resistência: noções básicas e perspectivas. In: Cavalcanti, L.S.; Di Piero, R.M.; Cia, P.; Pascholati, S.F.; Resende, M.L.V.; Romeiro, R.S. (Eds.). Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ, 263 p.
- BORDA, T.C.O.; FONSECA, J. R.; PELOSO, M. J.; COSTA, J.G.C.; MELO, L.C.; ANTUNES, I. F.; COSTA, I.R.S.; CARVALHO, J.R.P, BURLE, M. L (2011). PA4 - Banco Ativo de Germoplasma de Feijão (*Phaseolus vulgaris*). Disponível em: <http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/pnrg/rede-vegetal/projetos-componentes/pc3-bancos-ativos-de-germoplasma-de-especies-leguminosas-oleaginosas-e-fibrosas/planos-de-acao/pa4-banco-ativo-de-germoplasma-de-feijao-phaseolus-vulgaris>.
- BORGES, A (2011). Análise da expressão de genes relacionados à interação incompatível *Phaseolus vulgaris* / *Colletotrichum lindemuthianum*. Dissertação de mestrado USP.
- BOWLES, D. J. (1990). Defense-related proteins in higher plants. *Annual Review of Biochemistry*, Palo Alto, v. 59, p. 873- 907.
- BRADFORD, M M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

**Jackeline Leite Pereira**

---

- BRANDT J, THORDAL-CHRISTENSEN H, VAD K, GREGERSEN PL, COLLINGE DB (1992). A pathogen-induced gene of barley encodes a protein showing high similarity to a protein kinase regulator. *Plant J.* 2:815-20.
- BROTMAN, Y.; BRIFF, E.; VITERBO, A.; CHET, I. (2008). Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol* 147: 779–789.
- BROUGHTON, W.J.; HERNANDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. (2003). Bean (*Phaseolus spp.*)-model food legumes. *Plant and Soil*, Dordrecht, 252: 55–128.
- BUSCH F.A. (2012). Current methods for estimating the rate of photorespiration in leaves. [Epub ahead of print].
- BUZZERIO, N.F. (2001). Ferrugem e mancha angular do feijoeiro: efeitos de fungicidas no desenvolvimento do hospedeiro e no progresso das doenças. Dissertação de mestrado. ESALQ –USP.
- CAMPOS SILVA, J.R.; SOUZA, R.M.; ZACARONE, A.B.; SILVA, L.H.C.P.; CASTRO, A.M.S. (2008). Bacterias endofíticas no controle e inibição in vitro de *Pseudomonas syringae* pv. tomato, agente da pinta bacteriana do tomateiro. *Ciência e Agrotecnologia*. 32: 1062-1072.
- CARMONA, M. J.; MOLINA, A.; FERNANDEZ, J. A.; LOPEZ-FANDO, J. J.; GARCIA-OLMEDO, F. (1993) Expression of the a-thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. *Plant J.* 3:457–462.
- CARR J.P.; LEWSEY M.G.; PALUKAITIS P. (2010). Signaling in induced resistance. *Adv Virus Res.* 76:57-121.
- CARRERAS-VILLASEÑOR N, SÁNCHEZ-ARREGUÍN J.A.; HERRERA-ESTRELLA A.H (2012) *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. *Microbiology*. 158: 3-16.
- CARVALHO, D. D. C; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; GERALDINE, A. M. (2011). Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. *Pesq. agropec. bras.* 46: 8.
- CASA, R.T.; KRIEGER, I.; JUNIOR, P. R. K.; BOGO, A.; MOREIRA, E. N. M.; RIZZI, F. P. (2011). Podridão radicular em feijão no sistema plantio direto. *Revista de Ciências Agroveterinárias*. 10:31.
- CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STARGARLIN, J.R. (2005). Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. *In*: Cavalcanti, L.S.; Di Piero, R.M.; Cia, P.; Pascholati, S.F.; Resende, M.L.V.; Romeiro, R.S. (Eds.). *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. Piracicaba: FEALQ, p. 81-124.
- CFI-Centro de Inteligência do feijão (2008). Disponível em: (<http://www.cifeijao.com.br/index.php?p=historico>). Acesso em 12/10/2012.
- CHACÓN, M.R.; RODRIGUEZ-GALÁN, O.; BENÍTEZ, T.; SOUSA, S.; REY, M.; LLOBEL, A.; JARANA-DELGADO, J. (2007). Microscopic and transcriptome

**Jackeline Leite Pereira**

---

- analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. Intern. Microbiol. 10:19-27.
- CHEN, C.; BELANGER, R. R.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T. C (2000). Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth promoting rhizobacteria, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 56: 13 -23.
- CHEN, Z.; GALLIE, D.L (2005) Increasing tolerance to ozone by elevating folia ascorbic acid confers greater protection against ozone than increasing avoidance *Plant Physiol.*, 138: 1673–1689.
- CHET, I.(1993). *Biotechnology in plant disease control*. New York: Wiley-Liss, 373p.
- CONTRERAS-CORNEJO, H. A., MACIAS-RODRÍGUEZ, L., CORTÉS-PENAGOS, C., & LÓPEZ-BUCIO, J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149: 1579–1592.
- CORTÊS, H.P. (2000). *Introdução aos hormônios vegetais*. Embrapa. p. 131-157.
- CRAMER CL, BELL JN, RYDER TB, BAILEY JA, SCHUCH W, BOLWELL GP, ROBBINS MP, DIXON RA, LAMB CJ (1985). Co-ordinated synthesis of phytoalexin biosynthetic enzymes in biologically-stressed cells of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *EMBO J.* 4:285-289.
- DE BOER, B. (1997). Fusicoccin: a key to multiple 14-3-3 locks. *Trends Plant Sci.* 2: 60–66.
- DE BRUIJN, I.; DE KOCK, M.J.D.; YANG, M.; DE WAARD, P.; VAN BEEK, T.A.; RAAIJMAKERS, J.M. (2007). Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Mol. Microbiol.* 63, 417–428.
- DE VETTON, N.C.; FERL, R.J. (1995). Characterisation of a maize G-box binding factor that is induced by hypoxia. *Plant J.* 7: 589–601.
- DEBACH, P.; CHAPMAN.; HALL (1964). *Biological control of insect pests and weeds*. London, UK: E-1225: 8:12.
- DEBODE, J.; MAEYER, K.D.; PERNEEL, M.; PANNECOUCQUE, J.; BACKER, G.D.; HOFTE, M. (2007). Biosurfactants are involved in the biological control of *Verticillium microsclerotia* by *Pseudomonas* spp.. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1184–1196.
- DELANNOY, E., A. JALLOUL, K. ASSIGBETSÉ, P. MARMEY, J.P. GEIGER, J.F. LHERMINIER, J.F. DANIEL, C. MARTINEZ, AND M. NICOLE. (2003). Activity of class III peroxidases in the defense of cotton to bacterial blight. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16:1030-1038.
- DE-LA-PEÑA C, RANGEL-CANO A, ALVAREZ-VENEGAS R. (2012). Regulation of disease-responsive genes mediated by epigenetic factors: interaction of *Arabidopsis-Pseudomonas*. *Mol Plant Pathol.* 13:388-98.

**Jackeline Leite Pereira**

---

- DIHAZI, A. JAITI, F.; WAFATAKTAK KILANI-FEKI, O.; JAOUA, S.; DRIOUICH, A.; BAAZIZ, M.; DAAYF, F.; SERGHINI, M. A. (2012). Use of two bacteria for biological control of bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* in date palm (*Phoenix dactylifera* L) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 55. 7-15.
- DJONOVIC, S.; VITTONI, G.; MENDOZA-HERRERA, A.; KENERLEY, C.M. (2007) Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma virens* transformants constitutively coexpressing beta-1,3 and beta-1,6 glucanase genes. *Molecular Plant Pathology*. 8:469-480.
- DRUZHININA I.S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA A.; HORWITZ B.A.; KENERLEY C.M.; MONTE E.; MUKHERJEE P.K.; ZEILINGER S.; GRIGORIEV I.V.; KUBICEK C.P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat Rev Microbiol*. 16: 749-59.
- ECKER, J.R. (1995). The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science*. 268: 667-675.
- EDWARDS R.; DIXON D.P.; WALBOT V (2000). Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci* 5:193-198.
- ELAD, Y.; DAVID, D.R.; LEVI, T.; KAPAT, A.; KIRSHNER, B. (1999). *Trichoderma harzianum* T-39-mechanisms of biocontrol of foliar pathogens. *In: Modern fungicides and antifungal compounds II* (Eds. H. Lyr, P.E. Russel, H.W. Dehne & H.D. Sisler). Andover Hants, UK: Intercept, pp.459-67.
- EYNCK C, SÉGUIN-SWARTZ G, CLARKE WE, PARKIN IA. (2012). Monolignol biosynthesis is associated with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Camelina sativa*. *Mol Plant Pathol* 8:887-99.
- FAO, Organização das Nações Unidas para alimentação e agricultura (2012). Disponível em: <https://www.fao.org.br/>. Acesso em : 21/10/2012.
- FERERES, E.; ORGAZ, F.; GONZALEZ-DUGO, V. (2011). Reflections on food security under water scarcity. *J Exp Bot*. 62:4079-86.
- FERNANDES, C. F.; JUNIOR, J. R. V.; SILVA, D. S. G.; REIS, N. D.; JUNIOR, H. A. (2009). Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. EMBRAPA documentos, 133. Disponível em: [http://www.cpafr.embrapa.br/media/arquivos/publicacoes/133\\_fitopatogenos.pdf](http://www.cpafr.embrapa.br/media/arquivos/publicacoes/133_fitopatogenos.pdf).
- FERNANDES, É.K.; BITTENCOURT, V.R.; ROBERTS, D. W (2012). Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Exp Parasitol*. 130:300-5.
- FERNÁNDEZ, F; LÓPEZ, P (1986) Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Cali: CIAT.34p.
- FILHO, MRC.; MELLO, SCM.; SANTOS, RP.; MENEZES, J.E (2008). Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido

**Jackeline Leite Pereira**

---

indolacético in vitro e colonização endofítica de mudas de eucalipto. Boletim de pesquisa, EMBRAPA.  
<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/191226/1/bp2261208.pdf>.

FLOR, H.H (1971). Current status of gene-for-gene concept. Annual Review of Phytopathology 9:275-296.

FONDEVILLA, S.; KÜSTER, H.; KRAJINSKI, F.; CUBERO, J.I.; RUBIALES, D. (2011). Identification of genes differentially expressed in a resistant reaction to *Mycosphaerella pinodes* in pea using microarray technology. BMC Genomics. 13:12:28.

FORTES, F.O.; SILVA, A.C.F.; ALMANÇA, M.A.K.; TEDESCO, S.B. (2007). Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. Rev. Árvore 31:221-228.

FRANÇA, S. C.; ROBERTO, P. G.; MARINS, M. A.; PUGA, R. D.; RODRIGUES, A.; PEREIRA, J. O. (2001). Biosynthesis of secondary metabolites in sugarcane. Genetics and Molecular Biology, 24:243-250.

FRANCESCHINI, M.; GUIMARÃES, A. P.; CAMASSOLA, M.; FRAZZON, A. P.; BARATO, C. M.; KOGLER, V.; DA SILVA, M. V.; DUTRA, V.; NAKASOTO, L., CASTRO, L.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M. H. SCHRANCK, A (2001). Biotecnologia aplicada ao controle biológico. Biotecnol. Ciênc. Desenvolv, v. 23: 32-37.

GADJEV, I.; VANDERAUWERA, S.; GECHEV, T.S.; LALOI, C.; MINKOV, I.N.; SHULAEV, V.; APEL, K.; INZE, D.; MITTLER, R.; VAN BREUSEGEM, F (2006). Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* 141: 436–445.

GANG, D.R.; KASAHARA, H.; XIA Z.Q.; VANDER MIJNSBRUGGE, K.; BAUW G.; BOERJAN, W.; VAN MONTAGU, M.; DAVIN L.B.; LEWIS, N.G (1999). Evolution of plant defense mechanisms – relationships of phenylcoumaran benzylic ether reductases to pinosresinol-lariciresinol and isoflavone reductases. *J Biol Chem* 274: 7516–7527.

GARCIA-OLMEDO F.; RODRIGUEZ-PALENZUELA, P.; HERNANDEZ-LUCAS C.; PONZ F.; MARAÑA C.; CARMONA M.J.; LOPEZ-FANDO, J. FERNANDEZ J.A.; CARBONERO, P (1989). The thionins: a protein family that includes purothionins, viscotoxins and crambins. *Oxford Surv Plant Mol Cell Biol* 6: 31-60.

GARCÍA-SÁNCHEZ M.; GARRIDO, I.; CASIMIRO, I.D.E.; CASERO P.J.; ESPINOSA F.; GARCÍA-ROMERA I.; ARANDA E. (2012). Defence response of tomato seedlings to oxidative stress induced by phenolic compounds from dry olive mill residue. *Chemosphere*. 89:708-16.

GARY, L. E MURRAY, G. Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists (2007). *Curr Opin. Plant Biol.* 10:466-72.

GECHEV TS, HILLE J (2005). Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J. Cell Biol.* 168: 17–20.

**Jackeline Leite Pereira**

---

- GÓMEZ I, CHET I, HERRERA-ESTRELLA A (1997). Genetic diversity and vegetative compatibility among *Trichoderma harzianum* isolates. *Mol Gen Genet.* 256:127-35.
- GRISON R.; GREZES-BESSET B.; SCHNEIDER M. (1996). Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. *Nat Biotechnol* 14: 643–646.
- GUSMÃO, A.R.E.; FARIA, J.M.; BORBA, T.C.O.; FONSECA, J.R. (2008). Atividades do banco ativo de germoplasma de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L) da Embrapa. Documentos, IAC, Campinas, 85: 623-625.
- GUZZO, S.D. (2003). Proteínas relacionadas à patogênese. *In: Luz, WC (Ed). Revisão anual de patologia de plantas, 11:283-332.*
- HAGGAG, K. H.E. E EL-GAMAL, N. G. (2012). *In vitro* Study on *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* Isolates Causing the Damping Off and Root Rot Diseases in Tomatoes. *Nature and Science.* 10:11.
- HAMMOND-KOSACK K.E.; JONES J.D.G (1997). Plant disease resistance genes. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol.* 48:575–607.
- HAMMOND-KOSACK K.E; PARKER J.E (2003). Deciphering plant pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotechnol* 14:177–193.
- HARMAN, G. E. (1991). Seed treatment for biological control of plant disease *Crop Protection*, 10:166-171.
- HARMAN, G.E. (2000). Myths and Dogmas of Biocontrol. *Plant Disease* 84: 377 –393.
- HARMAN G.E.; HOWELL C.R.; VITERBO A.; CHET I.; LORITO M. (2004). *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol.* 2:43-56.
- HARRISON, M.J. (2005). Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 19–42.
- HERMOSA R.; VITERBO A.; CHET I.; MONTE E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology.* 158(Pt 1):17-25.
- HILL, M.K.; LYON, K.J.; LYON, B.R (1999). Identification of disease response genes expressed in *Gossypium hirsutum* upon infection with the wilt pathogen *Verticillium dahliae*. *Plant Mol Biol.* 40:289-96.
- HIRSCH S, AITKEN A, BERTSCH U, SOLL J. (1992). A plant homologue to mammalian brain 14-3-3 protein and protein kinase C inhibitor. *FEBS Lett.* 20;296(2):222-4.
- HJELJORD, L.G.; STENSVAND A.; TRONSMO, A (2001). Antagonism of Nutrient-Activated Conidia of *Trichoderma harzianum* (atroviride) P1 Against *Botrytis cinerea*. *Phytopathology.* 91:1172-80.

**Jackeline Leite Pereira**

---

- HOUTERMAN, P.M.; SPEIJER, D.; DEKKER, H.L.; DE KOSTER, C.G.; CORNELISSEN, B.J.C.; REP, M. (2007). The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. *Mol. Plant Pathol.* 8: 215–221.
- HOWELL, C. R., HANSON, L. E., STIPANOVIC, R. D. & PUCKHABER, L. S. (2000). Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90: 248–252.
- HOWELL, C.R (1998). The role of antibiosis in biocontrol. *In*: G.E. Harman and C.P. Kubicek, Editors, *Trichoderma and Gliocladium*, Taylor and Francis, London, pp. 173–184.
- HOWELL, C.R (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87: 4–10.
- HUANG, M.; XU, Q.; DENG, X. (2012). The photorespiratory pathway is involved in the defense response to powdery mildew infection in chestnut rose. *Mol Biol Rep.* 39:8187–8195.
- JEBANATHIRAJAH J.A.; COLEMAN, J.R. (1998) Association of carbonic anhydrase with a Calvin cycle enzyme complex in *Nicotiana tabacum*. *Planta.* 204(2):177-82.
- JEGATHAMBIGAI, V.; WILSON WIJERATNAM , R. S.; WIJESUNDERA, R. L. C (2010). Effect of *Trichoderma* sp. on *Sclerotium rolfsii*, the Causative Agent of Collar Rot on *Zamioculcas zamiifolia* and an on Farm Method to Mass Produce *Trichoderma* species. *Plant Pathology Journal* 9:47-55.
- KAMILOVA, F.; LAMERS, G.; LUGTENBERG, B. (2008). Biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 inhibits germination of *Fusarium oxysporum* spores in tomato root exudate as well as subsequent formation of new spores. *Environ. Microbiol.* 10, 2455–2461.
- KIBA A.; NISHIHARA M.; TSUKATANI N.; NAKATSUKA T.; KATO Y.; YAMAMURA S. (2005). A peroxiredoxin Q homolog from gentians is involved in both resistance against fungal disease and oxidative stress. *Plant Cell Physiology* 46, 1007–1015.
- KIDOU, S.I.; UMEDA, M.; KATO, A.; UCHIMIYA, H (1993). Isolation and characterisation of a rice cDNA similar to the bovine brainspecific 14-3-3 protein gene. *Plant Mol. Biol.* 21: 191–194.
- KLOEPPER, J.W. (1997). Current Status and Future Trends in Biocontrol Research and Development in the U.S., *In*: International Symposium on Clean Agriculture, Sapporo: OECD, 49-52.
- KLOEPPER, J.W.; RYU, C.M.; ZHANG, S.A. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp.. *Phytopathology* 94, 1259–1266.
- LALOI, C.; STACHOWIAK M.; PERS-KAMCZYC E.; WARZYCH E.; MURGIA I.; APEL K (2007). Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 672–677.



**Jackeline Leite Pereira**

---

- LAMB, C. & DIXON, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:251-75.
- LAUVERGEAT, V., LACOMME, C., LACOMBE, E., LASSERRE, E., ROBY, D. AND GRIMA-PETTENATI, J. (2001) Two cinnamoyl-CoA reductase (CCR) genes from *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during development and in response to infection with pathogenic bacteria. *Phytochemistry*, 57: 1187–1195.
- LIU, Y.J.; YUAN, Y.; LIU, Y.Y.; LIU, Y.; FU, J.J.; ZHENG, J.; WANG, G.Y.(2012) Gene families of maize glutathione-ascorbate redox cycle respond differently to abiotic stresses. *J Plant Physiol.* 169:183-92.
- LIVAK K.J.; SCHMITTGEN, T.D (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25:402-8.
- MACAGNAN, DIRCEU, ROMEIRO, REGINALDO DA SILVA, BARACAT-PEREIRA, MARIA CRISTINA, LANNA-FILHO, ROBERTO, BATISTA, GISELE SALES, & POMELLA, ALAN WILLIAN VILELA. (2008). Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em mudas de cacaueteiro expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. *Summa Phytopathologica*, 34: 34-37.
- MACHADO, J. L. A. (2008). Feijão: O Alimento do Povo. Disponível em: ([http://artigo cientifico.uol.com.br/uploads/artc\\_1173460598\\_86.doc](http://artigo cientifico.uol.com.br/uploads/artc_1173460598_86.doc)>. Acesso em 12/12/2012.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2011). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais> . Acesso em 13/12/2011.
- MARCHETTI, R. P.; NIPOTI, N.; D'ERCOLE M. E.; GUERZONI. (1992). Competition at atmosphere level as biocontrol mechanism in *Trichoderma* spp. *Petria* 2:137-47.
- MARGIS, R.; DUNAND, C.; TEIXEIRA, F.K.; MARGIS-PINHEIRO, M (2008) Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. *FEBS J.* 275: 3959–3970.
- MARIANO, R. L. R.; KLOEPPER, J. W (2000). Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo 8:121-137.
- MARINO, RH; MESQUITA, JB; ANDRADE, KVS; COSTA, NA; AMARAL, LA (2008) Incidência de fungos em sementes de *Phaseolus vulgaris* L. provenientes do Estado de Sergipe. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 3: 26-30.
- MARRA, R.; AMBROSINO, P.; CARBONE, V.; VINALE, F.; WOO, S. L.; RUOCOO, M.; CILIENTO, R.; LANZUISE, S.; FERRAIOLI, S.; SORIENTE, J.; GIGANTE, S.; TURRÀ, D.; FOGLIANO, V.; SCALA, F.; LORITO, M (2006). Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. *Appl Environ Microbiol.* 65:1061-70.
- MARTENS, G.J.; PIOSIK, P.A.; DANEN, E.H. (1992). Evolutionary conservation of the 14-3-3 protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 184:1456-9.

**Jackeline Leite Pereira**

---

- MARTÍNEZ-MEDINA, A.; ROLDAN, A.; ALBACETE, A.; PASCUAL, J.A (2011). The interaction with arbuscular mycorrhizal fungi or *Trichoderma harzianum* alters the shoot hormonal profile in melon plants. *Phytochemistry*. 72:223-9.
- MAUCH F; DUDLER R. (1993). Differential induction of distinct glutathione-S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol*. 102:1193-201.
- MEHDY M.C. (1994). Active oxygen species in plant defense against pathogens. - *Plant Physiol*. 105:467-472.
- MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (1998) Controle biológico. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 262p.
- MICHEREFF, S.J., BARROS, R. (2001). Proteção de plantas na agricultura sustentável, UFRPE, Imprensa Universitária, 2001. 368p.
- MILES, T.D.; DAY, B.; SCHILDER, A.C. (2011). Identification of differentially expressed genes in a resistant versus a susceptible blueberry cultivar after infection by *Colletotrichum acutatum*. *Mol Plant Pathol*. 5:463-77.
- MIRANDA, B. A.; JÚNIOR, M. L.; CUNHA, M. G. (2007). Reação de cultivares do feijoeiro comum às podridões radiculares causadas por *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli*. *Pesq Agropec Trop* 37: 221-226.
- MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci*. 9: 490–498.
- MOHAMED, H.A.L.A. & HAGGAG, W.M. (2006). Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. *Braz. J. Microbiol*. 37:181-191.
- MONTE, E (2001). Editorial Paper: Understanding *Trichoderma*: Between Agricultural Biotechnology and Microbial Ecology. *Int Microbiol* 4: 1-4.
- MORAN-DIEZ, E.; HERMOSA, R.; AMBROSINO, P.; CARDOZA, R. E.; GUTIERREZ, S.; LORITO, M.; MONTE, E. (2009). The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*–plant beneficial interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 1021–1031.
- MUKHERJEE AK, CARP MJ, ZUCHMAN R, ZIV T, HORWITZ BA, GEPSTEIN S (2010). Proteomics of the response of *Arabidopsis thaliana* to infection with *Alternaria brassicicola*. *J Proteomics*. 10: 709-720.
- MUR L.K.; KENTON, P.; LLOYD, A.J.; OUGHAM, H.; PRATS, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany* 59: 501–520.
- NAKAHARA KS, KITAZAWA H, ATSUMI G, CHOI SH, SUZUKI Y, UYEDA I. (2011). Screening and analysis of genes expressed upon infection of broad bean with Clover yellow vein virus causing lethal necrosis. *Virology*. 18:355.

**Jackeline Leite Pereira**

---

- NANDA, A. K.; ANDRIO, E.; MARINO, D. PAULY, N.; DUNAND, C. (2010). Reactive Oxygen Species during Plant-microorganism Early Interactions. *Journal of Integrative Plant Biology* 2: 195–204
- NANDA, A. K.; ANDRIO, E.; MARINO, D. PAULY, N.; DUNAND, C. (2010). Reactive Oxygen Species during Plant-microorganism Early Interactions. *Journal of Integrative Plant Biology* 2: 195–204.
- NASEBY DC, PASCUAL JA, LYNCH JM (2000). Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* polulations, soil microbial communities and soil enzyme activities. *J Appl Microbiol.* 88:161-9.
- NATARAJAN, S.; XU, C.; CAPERNA, T.J, GARRETT, W. M. (2005). Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins, *Anal. Biochem.* 342: 214–220.
- NECHET, K. L. & VIEIRA, B. A.H. (2006). Doenças do Feijão-caupi em Roraima. Circular técnica Embrapa, Disponível em: [http://www.cpafr.embrapa.br/embrapa/attachments/120\\_cit022006\\_doencacaupi\\_katia.pdf](http://www.cpafr.embrapa.br/embrapa/attachments/120_cit022006_doencacaupi_katia.pdf). Acesso em 03/03/2012.
- NELSON, D. L.; COX, M. (2002) **Lehninger – Princípios de Bioquímica**. 3ed. São Paulo: Sarvier.
- NIDERMAN, T., I. GENETET, T. BRUYÈRE, R.GEES, A. STINTZI, M. LEGRAND, B. FRITIG, E. MÖSINGER (1995). Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.*, 108: 17-27.
- NIELSEN T.H.; THRANE, C.; CHRISTOPHERSEN, C.; ANTHONI, U.; SØRENSEN, J (2000). Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin - a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *J Appl Microbiol.* 89 :992-1001.
- NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. (2000). Characterization of a 29-kDa beta-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol. Letters.* 183:119–123.
- OLIVEIRA, E., J.; ANA L.; BORÉM, A. M.; BARROS, C. L. P.; EVERALDO G. E MOREIRA, M. A. (2004). Reação de cultivares de feijoeiro comum a quatro raças de *Phaeoisariopsis griseola*. *Fitopatologia Brasileira*, 29: 220-223.
- PANDOLFO, J. D. (2007). Associação de *Trichoderma* sp. e fungicidas no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Dissertação de doutorado Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia.
- PAPAVIZAS, G.C. (1985) *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol, *Annual Review of Phytopathology* 23: 23–54.
- PÄSOLD S, SIEGEL I, SEIDEL C, LUDWIG-MÜLLER J. (2010). Flavonoid accumulation in *Arabidopsis thaliana* root galls caused by the obligate biotrophic pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Mol Plant Pathol.* 11:545-62.

**Jackeline Leite Pereira**

---

- PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C (2004). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci.* 9: 534–540.
- PATERNIANI, E. (2001). Agricultura sustentável nos trópicos. *Estudos Avançados*, 15: 303-326. Retrieved November 29, 2012, from [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-40142001000300023&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142001000300023&lng=en&tlng=es).
- PEREIRA, M.J.Z.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. (2008). Estratégias para eficiência da seleção de feijoeiro quanto à resistência à murcha-de-fusarium. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 23:721-728.
- PEREIRA, M.J.Z.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. (2008). Estratégias para eficiência da seleção de feijoeiro quanto à resistência à murcha-de-fusarium. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 23:721-728.
- PIETERSE, C. M. J.; VAN PELT, J. A.; VAN WEES, S. C. M.; TON, J.; VERHAGEN, B. W. M.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K.; HASE, S.; VOS, M. De; VAN OOSTEN, V.; POZO, M.; SPOEL, S.; VAN DER ENT, S.; KOORNNEEF, A.; CHALFUN-JUNIOR, A.; RESENDE, M. L. V.; VAN LOON, L. C. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, A. M.; PRESTES, J. M.; PICININI, E. C (2005). Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*.13: 277-295.
- PIETERSE, C.M.J.; VAN PELT, J.A.; VAN WEES, S.C.M.; TON, J.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K.M.; KEURENTJES, J.J.B.; VERNHAGEN, B.W.M.; KNOESTER, M.; VAN DER SLUIS, I.; BAKKER, P.A.H.M.; VAN LOON, L.C. (2001). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signaling and expression. *European Journal Plant Pathology*. 107:51-61.
- PIETERSE, C.M.J.; VAN WEES, S.C.M.; VAN PELT, J.A.; KNOESTER, M.; LAAN, R.; GERRITS, H.; WEISBEEK, P.J.; AND VAN LOON, L.C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 10, 1571–1580.
- PORTES, T.A. (1996). Cultura do feijoeiro comum no Brasil. Piracicaba, Potafós, p.101-137.
- POZO M.J.; AZCON-AGUILAR, C (2007). Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Curr Opin Plant Biol*, 10:393-398.
- PUNJA, Z. K. & UTKHEDE, R. S. (2003). Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotechnol.* 21: 400-407.
- RAUSCHER, M.; A.L. ÁDÁM, S.; WIRTZ, R.; GUGGENHEIM, K.; MENDGEN, H.B. DEISING (1999). PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant. *Plant J.* 19: 625-33.
- RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A.T.S (2009). A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. *Revista Liberato, Novo Hamburgo*, 10: 149-158.
- RICARD, J. L. & RICARD, T. J (1997). The ethics of biofungicides – A case study: *Trichoderma harzianum* ATCC 20476 on Elsanta strawberries against *Botrytis cinerea* (gray mold). *Agriculture and Human Values* 14: 251–258.
- RIVAS, S.; ROUGON-CARDOSO, A.; SMOKER, M.; SCHAUSER, L.; YOSHIOKA, H.; JONES JD. (2004). CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence. *EMBO J.* 23:2156-65.

**Jackeline Leite Pereira**

---

- RODRIGUES, F.A.; CARVALHO, E.M.M.; VALE, F.X.R. (2002). Severidade da podridão-radicular de *Rhizoctonia* do feijoeiro influenciada pela calagem, e pelas fontes e doses de nitrogênio. *Pesq. agropec. bras.* 37:1247-1252.
- ROHINI, V.K.; SANKARA RAO, (2001). Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease, *Plant Sci.* 160: 883-892.
- ROMEIRO, R.S. (2008). Indução de resistência em plantas a patógenos. *In: Pascholati, S.F.; Leite, B.; Stangarlin, J.R.; Cia, P. (Eds.). Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular.* Piracicaba, SP. pp. 411-429.
- ROUHIER N.; JACQUOT J.P (2002) Plant peroxiredoxins: alternative hydroperoxide scavenging enzymes. *Photosynth. Res.* 74: 259–268.
- SARTORATO, A (1996). Fungicidas recomendados para tratamento de sementes de feijão. *In: SOAVE, J.; OLIVEIRA, M.R.M. & MENTEN, J.O.M. Tratamento químico de sementes.* ed. Gramado: Abrates/Copasem. p.45-51.
- SARTORATO, A.; RAVA, C.A.; RIOS, G.P. (1996) Doenças fúngicas e bacterianas da parte aérea. *In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. DE (Coord.). Cultura do feijoeiro comum no Brasil.* Piracicaba: POTAFOS p.669-700.
- SCHIMIDT, T. F. (2008). Estudo da interação da peroxidase de raiz forte em interfaces nanoestruturadas. Tese de Mestrado – Universidade de São Paulo.
- SCHIRMBÖCK M.; LORITO M.; WANG Y.L.; HAYES, C.K.; ARISAN-ATAC, I.; SCALA, F.; HARMAN G.E.; KUBICEK C.P (1994) Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol.* 60:4364-70.
- SCHULTHEISS, H., C. DECHERT, L. KIRÁLY, J. FODOR, K. MICHEL, K.-H. KOEGL, R. HÜCKELHOVEN (2003). Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley. *Plant Sci.*, 165, 1275-1280.
- SEAPA- Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio (2010). Disponível em: [www.saa.rs.gov.br/](http://www.saa.rs.gov.br/). Acesso em 20/12/2010.
- SEGARRA, G.; CASANOVA, E.; BELLIDO, D.; ODENA, M. A.; OLIVEIRA, E.; TRILLAS, I. (2007). Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics.* 21:3943-52.
- SEO, DONG-JUN, DANG-MINH-CHANH NGUYEN, YONG-SU SONG, AND WOO-JIN JUNG (2012) Induction of Defense Response Against *Rhizoctonia solani* in Cucumber Plants by Endophytic Bacterium *Bacillus thuringiensis* GS1. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 407–415.
- SHARON E.; BAR-EYAL M.; CHET I.; HERRERA-ESTRELLA A.; KLEIFELD, O.; SPIEGEL, Y (2001). Biological Control of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology.* 91:687-93.

**Jackeline Leite Pereira**

---

- SHORESH, M. E HARMAN, G. E (2008). The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. *Plant physiology* 147: 2147-2163.
- SHORESH, M. E HARMAN, G. E. (2010). Differential expression of maize chitinases in the presence or absence of *Trichoderma harzianum* strain T22 and indications of a novel exo- endo-heterodimeric chitinase activity. *BMC Plant Biol.* 10:136.
- SLAYMAKER, D.H.; NAVARRE, D.A.; CLARK, D. DEL POZO, O.; MARTIN, G. B.; AND KLESSIG, D.F. (2002). The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 11640–11645.
- SPADOTTO, C.A E GOMES, M.A.F (2011). Agrotóxicos no Brasil. Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura\\_e\\_meio\\_ambiente/arvore/CONTAG01\\_40\\_210200792814.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_40_210200792814.html). Acesso em: 06/06/2011.
- SPAINK, H.P. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 257–288.
- STANGARLIN, J.R. (2007). Compostos pré-formados, espécies reativas de oxigênio e fitoalexinas nas interações de resistência planta-patógeno. *Summa Phytopathologica, Botucatu, v.33, supl., p.152- 154.*
- STICHER, L.; MAUCH MANI, B.; METRAUX, J.P (1997). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology, Palo Alto.*35: 235-270.
- SWANSON KD, GANGULY R (1992). Characterization of a *Drosophila melanogaster* gene similar to the mammalian genes encoding the tyrosine/tryptophan hydroxylase activator and protein kinase C inhibitor proteins. *Gene.* 15:183-90.
- SWEETLOVE, L.J.; LYTOVCHENKO, A.; MORGAN, M.; NUNES-NESE, A.; TAYLOR, N.L (2006). Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis. *Proceed. of the Nation Acad of Sci of the United States of America.* 103:19587–19592.
- TABAEIZADEH, Z.; AGHARBAOUI, Z.; HARRAK, H.; POYSA, V. (1999). Transgenic tomato plants expressing a *Lycopersicon chilense* chitinase gene demonstrate improved resistance to *Verticillium dahliae* race 2. *Plant Cell Rep.*, 19: 197-202.
- TAHERI, P. E TARIGHI, S. (2012). The Role of Pathogenesis-Related Proteins in the Tomato-*Rhizoctonia solani* Interaction. *Journal of Botany* (in press).
- TERAKAWA T.; TAKAYA N.; HORIUCHI H.; KOIKE M. (1997). A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity to transgenic tobacco. *Plant Cell Reports* 16:439-443.
- TJAMOS, E. C., (1992). Selective elimination of soilborne plant pathogens and enhancement of antagonists by solarization, sublethal fumigation, and steaming. Pages 1-15. *In Biological Control of Plant Diseases: Progress and Challenges for the Future*, Athens, Tjamos, Papavizas and Cook Editors, PLENUM Publisher.

**Jackeline Leite Pereira**

---

- TOLÊDO-SOUZA, E D., LOBO JÚNIOR, M., SILVEIRA, P M., CAFÉ FILHO, A C. (2009). Interações entre *Fusarium solani* f. sp. phaseoli E *Rhizoctonia solani* na severidade da podridão radicular do feijoeiro. Pesquisa Agropecuária Tropical. 39: 13-17.
- TORRES, AR; CURSINO, L.; MURO-ABAD, JI.; GOMES, E. A.; ARAUJO, E. F.; HUNGRIA, M.; CASSINI, STA. (2009). Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from the state of Minas gerais, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology 40: 852-856.
- TRAPIELLO, E. & GONZALEZ, A.J (2012). Diversity of culturable bacteria and occurrence of phytopathogenic species in bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.) preserved in a germplasm bank. Genet Resour Crop Evol. 59:1597–1603.
- VAN HEUSDEN G.P.; WENZEL, T.J.; LAGENDIJK, E.L.; DE STEENSMA, H.Y.; VAN DEN BERG, J.A. (1992). Characterization of the yeast BMH1 gene encoding a putative protein homologous to mammalian protein kinase II activators and protein kinase C inhibitors. FEBS Lett. 11:145-50.
- VAN LOON, L. C.; VAN KAMMEN, A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var 'Samsun' and 'Samsun NN'. Changes in protein constitution after infection with TMV. Virology. NewYork. 40: 199-211.
- VAN LOON L.C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. European Journal of Plant Pathology 119: 243–254.
- VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants, Annual Review of Phytopathology, vol. 44, pp. 135–162.
- VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants, Annual Review of Phytopathology, vol. 44, pp. 135–162.
- VAN WEES, S.C.M.; DE SWART, E.A.M.; VAN PELT, J.A.; VAN LOON, L.C. & PIETERSE, C.M.J. (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:8711-8716.
- VEIGA, M. M.(2007). Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. Ciênc. saúde coletiva, Rio de Janeiro. 12: 145-152.
- VERBENE, M. C.; VERPOORTE, R.; BOL, J. F.; MERCADO-BLANCO, J.; LINTHORST, H. J. M (2000). Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. Nature Biotechnology, New York, 18:779-783.
- VERMA, M.; BRAR, SK., TYAGI, R.D., SURAMPALLI, RY.,VALERO, JR. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control, Biochemical Engineering Journal 37: 1–20.
- VIEIRA, C.; ARAÚJO, G.A.A.; CRUZ, C.D. (1992). Comportamento de cultivares de feijão no plantio de outono/inverno. In: Vieira, R.F. (Ed.) Projeto Feijão - Relatório 88/92. Viçosa. EPAMIG. pp. 71-76.

**Jackeline Leite Pereira**

---

- VITERBO, A.; CHET, I. (2006). TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Mol Plant Pathol* 7: 249–258.
- VOLPIN H, ELKIND Y, OKON Y, KAPULNIK Y. (1994). A Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungus (*Glomus intraradix*) Induces a Defense Response in Alfalfa Roots. *Plant Physiol.* 104:683-689,
- WESEMAEL WM & MOENS M (2012). Screening of common bean (*Phaseolus vulgaris*) for resistance against temperate root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Pest Manag Sci.* 68:702-8.
- WIEST A, GRZEGORSKI D, XU BW, GOULARD C, REBOUFFAT S, EBBOLE DJ, BODO B, KENERLEY CM (2002). Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *J Biol Chem* 277: 20862-20868.
- WILSON, K.A.; MCMANUS, M.T.; GORDON, M.E.; JORDAN, T.W. (2002). The proteomics of senescence in leaves of white clover, *Trifolium repens* (L.). *Proteomics.*; 9:1114-22.
- WOO, S.L.; SCALA, F.; RUOCCO, M.; LORITO, M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, 96: 181-185.
- YAO, A.; BOCHOW, H.; KARIMOV, S.; BOTUROV, U.; SANGINBOY, S.; SHARIPOV, A. (2006). EFFECT OF FZB 24R *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 39: 323-328.
- YEDIDIA, I., BENHAMOU, N. & CHET, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1061–1070.
- YEDIDIA, I.; SHORESH, M.; KEREM, Z.; BENHAMOU, N.; KAPULNIK., Y.; CHET, I (2003). Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and the accumulation of phytoalexins. *Appl Environ Microbiol.* 69(12):7343-53.
- YIN, L. S. WANG, A.E. ELTAYEB, M.I. UDDIN, Y. YAMAMOTO, W. TSUJI, Y. TAKEUCHI, K. TANAKA (2010). Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to aluminium stress in transgenic tobacco. *Planta*, 231: 609–621
- YOSHIKAWA, N., IMAIZUMI, M., TAKAHASHI, T. & INOUE, N. (1993) Striking similarities between the nucleotide sequence and genome organization of Citrus tatter leaf and Apple stem grooving capilloviruses. *Journal of General Virology* 74:2743-2747.
- YOSHIOKA Y, ICHIKAWA H, NAZMIN HA, KOGURE A, HYAKUMACHI M. (2012). Systemic resistance induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT-1, a microbial pesticide of seedborne diseases of rice. *Pest Manag Sci.* 68(1):60-6.
- ZAMBOLIM, L. *et al.* (1997). Feijão comum: podridão, tombamento, e murcha causados por fungos de solo. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. (Eds). *Controle de doenças de plantas: grandes culturas*. Viçosa: UFV. Departamento de



**Jackeline Leite Pereira**

---

Fitopatologia; Brasília, DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento. 2v.  
p.375-402.