



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Análise do papel da SCRP-CFEM 779733 e  
da serina peptidase 747596 na interação de  
*Trichoderma harzianum* com seus  
hospedeiros**

Jovane de Oliveira Dantas

Orientadora: Eliane Ferreira Noronha

Brasília, 2019



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

# **Análise do papel da SCRP-CFEM 779733 e da serina peptidase 747596 na interação de *Trichoderma harzianum* com seus hospedeiros**

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Jovane de Oliveira Dantas

Orientadora: Eliane Ferreira Noronha

Brasília, 2019

## **Banca examinadora**

### **Titulares:**

#### **Orientadora:**

Dra. Eliane Ferreira Noronha

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília - UnB

#### **Membro Interno:**

Dr. Robert Neil Gerard Miller

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília - UnB

#### **Membro Externo:**

Dr. Roberto do Nascimento Silva

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

### **Suplente:**

Dr. Tatsuya Nagata

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília - UnB



“There's only so much you can learn in one place  
The more that I wait, the more time that I waste”

Madonna – Jump (2005)

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, pelo conhecimento adquirido ao longo desta caminhada, pelas portas abertas e pelas portas fechadas e por ter me providenciado as pessoas maravilhosas que encontrei neste caminho.

Aos meus pais, Ana Cláudia e João Olímpio, pela paciência e pelo apoio, vocês são o meu maior exemplo de respeito e caráter, aos meus irmãos Olímpio, Natália e Carolyna por toda ajuda e carinho; e a todos meus outros familiares que sempre acreditaram em mim.

À minha orientadora Dra. Elaine Ferreira Noronha, pela confiança, pelo apoio, pela paciência e por todos ensinamentos. Muito obrigado pela orientação e suporte para a realização deste projeto, além dos sorrisos e felicidade que sempre demonstrava.

Ao Dr. Roberto do Nascimento Silva, por ter me recebido em seu laboratório de braços abertos e por toda ajuda que me ofereceu. Obrigado pelas confraternizações e todas as alegrias que você e o pessoal de seu laboratório me ofereceram em Ribeirão Preto.

À Amanda Antoniêto e ao Renato Graciano por toda companhia, suporte e paciência; a ajuda de vocês foi imprescindível para a realização deste trabalho. À Alinne, Cláudia, Douglas, Karoline, Liliane, Mariana (morena), Mariana (loira), Matheus, Sílvia, Wellington e Zuleide, obrigado por tornarem a minha estadia tão agradável e por serem essas pessoas extraordinárias.

À Gabi e ao Raul, pela companhia e pelas risadas e pelo apoio nos momentos mais difíceis. Obrigado por tornarem meus dias na UnB mais alegres.

Ao Andrei, Francilene, Pedro, Alonso, Débora, Mário, Jéssica, Sofya, Joana, Sadia e aos alunos de iniciação científica Daniel, Felipe, Hamille, Letícia, Tainá, Luísa e Mariana. Obrigado por todo auxílio que vocês me deram.

À Mariana Kanashiro, minha eficiente estagiária pela dedicação no desenvolvimento deste trabalho.

À Diandra, Raíssa, Andresa, Carol, Guilherme, Lucas, Helder, Helena, Caio, Isis, Carla, Otávio, pela companhia e pelas conversas.

Às técnicas Marísia, Magal e Regina (Ecologia) e ao Dr. Gabriel Alves, pela prontidão em me ajudar.

Aos meus amigos Juscelino, Ana Paula, Lorrán, Vitor, Eduardo, Lucas, Júlia, Bruna, Déborah, Rachel, Andressa e Joeliny, obrigado pelo apoio.

Agradeço a todos meus amigos que sempre acreditaram em mim, aos outros professores que também me inspiraram (Márcio, Rosana, Nazaré, Georgios, Nilda etc.), à CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro, à USP e à UnB pelo auxílio em minha formação.

## Resumo

*Trichoderma harzianum* é um fungo utilizado no controle de doenças vegetais e como biofertilizante devido à sua capacidade de antagonizar fitopatógenos, promover crescimento vegetal e induzir resposta de defesa em plantas hospedeiras. Este fungo libera moléculas que alteram a estrutura e o metabolismo do hospedeiro permitindo a colonização de suas raízes, tais como as proteínas com domínio CFEM e as serina peptidases, estas proteínas já foram identificadas nos secretomas e transcritomas de espécies de *Trichoderma* durante a interação com fungos fitopatogênicos ou com plantas hospedeiras. Recentemente, alguns autores vêm estudando a função destas proteínas em outras interações, como, por exemplo, a micoparasítica. Embora estas proteínas estejam envolvidas nestas interações, seus papéis ainda não foram elucidados. Para validar a função dos genes SCRP-CFEM 779733 e serina peptidase 747596, que têm expressão aumentada na interação de *T. harzianum* com o feijoeiro *Phaseolus vulgaris* ou com o fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*, foram construídos dois mutantes para cada gene através de deleção por recombinação homóloga. Os mutantes foram comparados com o isolado parental quanto à capacidade de antagonizar *S. sclerotiorum*, de promover crescimento no feijoeiro e de induzir resistência sistêmica contra *S. sclerotiorum*. Não foi obtido mutante para o gene da serina peptidase em nenhum dos eventos de transformação. Foram obtidos dois mutantes nocauteados para o gene SCRP-CFEM, denominados  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup> e  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup>. Estes mutantes não apresentaram diferença quanto à capacidade antagônica em comparação ao isolado parental. Também não foram observadas mudanças em relação à área foliar e volume de raízes de feijoeiro cultivados na presença dos mutantes em comparação com o isolado parental. No entanto, foi observada diferença no tamanho total e diâmetro médio das raízes. O perfil de expressão de genes de defesa foi semelhante para feijoeiros cultivados na presença dos mutantes e isolado parental. Nossos experimentos iniciais sugerem que a SCRP-CFEM 779733 não atua diretamente no micoparasitismo, mas provavelmente tem papel na modelagem da arquitetura de raízes de feijoeiro através do desenvolvimento de raízes laterais mais finas.



## Abstract

*Trichoderma harzianum* is a fungus used to control plant diseases and as a biofertilizer due to its ability to antagonize phytopathogens, promote plant growth and induce defense response in host plants. This fungus releases molecules that alter the structure and metabolism of the host allowing the colonization of its roots, such as CFEM domain proteins and serine peptidases, these proteins have been identified in the secretomes and transcriptomes of *Trichoderma* species during interaction with phytopathogenic fungi or host plants. Recently, authors have been studying the function of these proteins in other interactions, such as mycoparasitism. Although these proteins are involved in these interactions, their roles have not been elucidated. To validate the function of the SCRP-CFEM 779733 and serine peptidase 747596 genes, which have increased expression in the interaction of *T. harzianum* with the common bean *Phaseolus vulgaris* or with the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, two mutants were constructed for each gene by homologous recombination. The mutants were compared to the parent isolate in terms of ability to antagonize *S. sclerotiorum*, to promote plant growth in common bean and to induce systemic resistance against *S. sclerotiorum*. No mutant was obtained for the serine peptidase gene in any of the transformation events. Two mutants knocked out for the SCRP-CFEM gene, named  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup> and  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup>, were obtained. These mutants showed no difference in antagonistic capacity compared to the parent isolate. Also no changes were observed in relation to leaf area and root volume grown towards in the presence of the mutants compared to the parent isolate. However, a difference was observed in the total size and mean diameter of the roots. The expression profile of defense genes was similar for bean cultivars in the presence of the mutant and parental isolate. Our initial experiments suggest that SCRP-CFEM 779733 does not directly act on mycoparasitism, but probably plays a role in the modeling of bean root architecture through the development of finer lateral roots.

## Lista de Figuras

FIGURA 1 MODELO ZIG-ZAG DA INTERAÇÃO ENTRE MICRORGANISMOS E PLANTAS E O SISTEMA IMUNE VEGETAL. ADAPTADO DE JONES E DANGL (2006).	24
FIGURA 2 RESPOSTAS DE DEFESA SISTÊMICA EM PLANTAS. ADAPTADO DE PIETERSE <i>ET AL.</i> (2009).	26
FIGURA 3. METODOLOGIA PARA MONTAGEM DO CASSETE DE DELEÇÃO ATRAVÉS DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA POR <i>S. CEREVISIAE</i> LINHAGEM SC-9721 (ADAPTADA DE COLOT <i>ET AL.</i> (2006)).	38
FIGURA 4 ESQUEMA DA ESCALA DE BELL PARA AVALIAÇÃO DA HABILIDADE DE ANTAGONISMO DE <i>TRICHODERMA SPP.</i> CONTRA FITOPATÓGENOS.	46
FIGURA 5 SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA SERINA PEPTIDASE 747596.	52
FIGURA 6 SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA SCRPF-CFEM 779733.	52
FIGURA 7. VERIFICAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE DE SELEÇÃO E DAS REGIÕES FLANQUEADORAS DOS GENES SERINA PEPTIDASE 747596 E SCRPF-CFEM 779733 POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% (M/V).	53
FIGURA 8. CONFIRMAÇÃO, EM GEL DE AGAROSE 1% (M/V), DA MONTAGEM DOS CASSETES DE DELEÇÃO ATRAVÉS DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR COM O DNA DAS <i>S. CEREVISIAE</i> TRANSFORMADAS.	54
FIGURA 9 VERIFICAÇÃO DA DELEÇÃO DO GENE DA SERINA PEPTIDASE EM GEL DE AGAROSE 1% (M/V)	54
FIGURA 10 VERIFICAÇÃO EM GEL DE AGAROSE 1% (M/V) DA DELEÇÃO DA ORF SCRPF-CFEM E DA INSERÇÃO DO GENE DE SELEÇÃO HPH.	55
FIGURA 11 MORFOLOGIA DO ISOLADO PARENTAL ( <i>T. HARZIANUM</i> TR274) E DOS MUTANTES NOCAUTEADOS PARA O GENE SCRPF-CFEM 779733 ( $\Delta$ THCFEM 1º E $\Delta$ THCFEM 2º), QUANDO CRESCIDOS EM MEIO BDA POR 7 DIAS A 28°C.	55
FIGURA 12. TESTE DE CONFRONTO ENTRE <i>T. HARZIANUM</i> E <i>S. SCLEROTIORUM</i> ..	56
FIGURA 13 ANÁLISE DOS DADOS MORFOLÓGICOS DAS PLANTAS DE FEIJOEIRO NÃO TRATADAS (PLANTA), DAS INOCULADAS COMO ISOLADO PARENTAL (ISOLADO PARENTAL), DAS INOCULADAS COM O MUTANTE $\Delta$ THCFEM 1º ( $\Delta$ THCFEM 1º) E DAS INOCULADAS COM $\Delta$ THCFEM 2º ( $\Delta$ THCFEM 2º) A) ÁREA FOLIAR MÉDIA. B) TAMANHO TOTAL MÉDIO DAS RAÍZES C) VOLUME MÉDIO DAS RAÍZES E D) DIÂMETRO MÉDIO DAS RAÍZES.	57
FIGURA 14 DADOS MORFOLÓGICOS DIVIDIDOS NAS CLASSES DE DIÂMETRO DAS RAÍZES DAS PLANTAS DE FEIJOEIRO SEM INÓCULO (PLANTA), INOCULADAS COMO ISOLADO PARENTAL (ISOLADO PARENTAL), INOCULADAS COM O MUTANTE $\Delta$ THCFEM 1º ( $\Delta$ THCFEM 1º) E INOCULADAS COM $\Delta$ THCFEM 2º ( $\Delta$ THCFEM 2º) A) DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DA RAIZ EM CLASSES DE DIÂMETRO DAS RAÍZES. B) DISTRIBUIÇÃO DO VOLUME DAS RAÍZES EM CADA CLASSE DE DIÂMETRO.	58
FIGURA 15. CLOROSE DAS FOLHAS UTILIZADAS NO EXPERIMENTO DE SUSCETIBILIDADE AO MOFO BRANCO.	59
FIGURA 16 EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES B-1,3-GLUCANASE (GLU), FENILALANINA AMÔNIA LIASE (PAL), LIPOXIGENASE 1 (LOX), PEROXIDASE (PER) E QUITINASE 1 (CHIT) NAS PLANTAS NÃO INOCULADAS (PLANTA), NAS PLANTAS INOCULADAS COM O ISOLADO PARENTAL (ISOLADO PARENTAL), NAS	

INOCULADAS COM O  $\Delta$ THCFEM 1º ( $\Delta$ THCFEM 1º) E NAS INOCULADAS COM O  $\Delta$ THCFEM 2º ( $\Delta$ THCFEM 2º);

60

FIGURA 17. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS EMPARELHAMENTOS QUE DEVEM OCORRER PARA QUE O CROMOSSOMO TROQUE SUA REGIÃO PELA DO CASSETE DE DELEÇÃO.

62

## Lista de Tabelas

TABELA 1 ESCALA DE BELL PARA AVALIAÇÃO DE CAPACIDADE ANTAGÔNICA DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.	46
TABELA 2 LISTA DE <i>PRIMERS</i> : OS FRAGMENTOS ADICIONADOS QUE SÃO COMPLEMENTARES AO GENE DE RESISTÊNCIA À HIGROMICINA SÃO MOSTRADOS EM VERMELHO; E EM VERDE SÃO MOSTRADOS OS FRAGMENTOS COMPLEMENTARES AO PLASMÍDEO PRS426	91

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ABA: ácido abscísico

AS: ácido salicílico

CFEM: Comum na membrana extracelular de fungos (Common in Fungal Extracellular Membrane)

Cht: quitinase (chitinase)

DAMP: padrões moleculares associados a danos (Damage-Associated Molecular Patterns)

ETI: imunidade desencadeada por efetores (Effector-Triggered Immunity)

ETS: suscetibilidade desencadeada por efetores (Effector-Triggered Susceptibility)

GFP: proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)

GLU:  $\beta$ -1,3-glucanase

Hph: hygromycin-B-phosphotransferase

ISR: resistência sistêmica induzida (Induced Systemic Resistance)

JA: ácido jasmônico

LOX: lipoxigenase

MAMP: padrões moleculares associados a micróbios (Microbe-Associated Molecular Pattern)

MS: meio Murashige & Skoog

NB-LRR: Nucleotide-Binding site–Leucine-Rich Repeat

PAL: Fenilalanina amônia-liase (Phenylalanine Ammonia Lyase)

PRR: receptor de reconhecimento de padrão (Pattern Recognition Receptor)

PTI: Imunidade desencadeada por padrões (Pattern-Triggered Immunity)

SAR: Resistência sistêmica adquirida (Systemic Acquired Resistance)

SCRPs: Pequenas proteínas ricas em cisteína (Small Cystein Rich Proteins)

U: Unidade de atividade enzimática

## Sumário

1.	Introdução.....	18
1.1	O feijoeiro comum e o mofo branco .....	18
1.1.1	Métodos de controle do mofo branco .....	19
1.2	O gênero <i>Trichoderma</i> .....	20
1.2.1	Interação entre <i>Trichoderma</i> spp e plantas hospedeiras .....	21
1.2.2	Interação de <i>Trichoderma</i> com fungos fitopatogênicos .....	26
1.3	Efetores.....	28
1.3.1	Pequenas Proteínas ricas em cisteína (SCRPs) .....	29
1.3.2	Serina-peptidase .....	32
2.	Objetivo .....	34
2.1	Objetivos específicos.....	34
3.	Material e métodos (fluxograma da metodologia).....	35
3.1	Organismos utilizados e condições de cultura .....	35
3.2	Análises “in silico” .....	35
3.3	Deleção por Recombinação Homóloga.....	36
3.3.1.	Obtenção da construção .....	39
3.3.2	Transformação de <i>T. harzianum</i> TR274.....	43
3.4	Confirmação da deleção .....	45
3.5	Estabilidade mitótica .....	45
3.6	Teste de antagonismo em placa contra <i>S. sclerotiorum</i> .....	46
3.7	Análise de alterações morfológicas no feijoeiro induzidas por <i>T. harzianum</i> .....	47
3.7.1	Assepsia das sementes.....	47

3.7.2	Obtenção de esporos .....	47
3.7.3	Cultivo das plantas em casa de vegetação .....	48
3.7.4	Teste de suscetibilidade .....	48
3.8	Análise da expressão de genes de defesa das raízes de feijoeiro e análise de colonização das raízes .....	49
3.8.1	Cultivo em sistema hidropônico.....	49
3.8.2	Análise de colonização de raízes .....	50
3.8.3	Análise da expressão de genes de defesa do feijoeiro por PCR em tempo real .....	50
4.	Resultados.....	52
4.1	Análise in-silico .....	52
4.2	Obtenção dos mutantes .....	53
4.3	Interação dos mutantes $\Delta$ thcfem e do isolado parental com <i>S. sclerotiorum</i> .....	56
4.4	Interação dos mutantes $\Delta$ thcfem e do isolado parental com <i>P. vulgaris</i> .....	56
4.4.1	Análise da expressão dos genes de defesa do feijoeiro na interação com os mutantes $\Delta$ thcfem e com o isolado parental .....	59
5.	Discussão .....	61
6.	Conclusão.....	65
7.	Referências bibliográficas.....	67
8.	Anexo 1 .....	81
9.	Informações complementares .....	88
9.1	Sequências gênicas.....	88
9.2	Tabela de <i>Primers</i> .....	91
9.3	Dados Brutos de expressão diferencial.....	92



9.4 Dados brutos de morfologia do feijoeiro.....	93
--	----

## 1. Introdução

### 1.1 O feijoeiro comum e o mofo branco

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa de grande importância econômica e alimentar, ele possui alto conteúdo de proteínas e fibras dietéticas, além de vitaminas e minerais, e contém baixas quantidades de gorduras saturadas. Cada 100 g de feijão comum seco provê 9 a 25 g de proteínas com uma boa quantidade de aminoácidos essenciais, em especial a lisina que está em baixa quantidade na maioria dos cereais (GANESAN; XU, 2017). Este grão é considerado um símbolo da culinária brasileira, estando presente diariamente na mesa de 70% dos brasileiros. Segundo o Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA), com base nas estimativas do valor bruto de produção para 2017, a cadeia produtiva do feijão deverá render R\$15,5 bilhões de reais em 2018 (BRASIL, 2018).

Uma das doenças que impactam a produção de feijão no Brasil é o mofo branco causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Em 2016, a doença foi considerada uma das pragas de maior risco fitossanitário e de importância econômica para as culturas de soja, feijão e algodão pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (BRASIL, 2016). A doença é favorecida em condições de umidade e com temperaturas moderadas (19 a 24 °C), as práticas de irrigação costumam fornecer este microclima importante para o desenvolvimento da doença (SCHWARTZ; STEADMAN, 1989).

Este fitopatógeno está amplamente distribuído pelo mundo e possui uma extensa gama de hospedeiros (mais de 400 espécies incluindo soja, feijoeiro, girassol, tomate) (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). Considerado um patógeno necrotrófico agressivo, seu mecanismo de agressão envolve a produção de ácido oxálico combinado com a ação de enzimas líticas. O ácido oxálico penetra no tecido, reduzindo e fornecendo um pH ótimo para a ação da pectinase (MAXWELL, 1970). Este ácido também pode interferir na produção de ácido abscísico, provocando a murcha das folhas (GUIMARAES; STOTZ, 2004). As populações do patógeno são difíceis de controlar devido à produção de estruturas de resistência denominadas escleródios que conseguem permanecer viáveis por vários anos no solo.

### 1.1.1 Métodos de controle do mofo branco

No feijão comum não há resistência total ao mofo branco, a resistência parcial é poligênica e com baixa a moderada herdabilidade (VASCONCELLOS *et al.*, 2017), e geralmente se dá mais por um mecanismo de escape à doença do que por um mecanismo fisiológico de resistência (KIM; DIERS, 2000). No escape, o microclima em torno do hospedeiro é menos favorável ao patógeno e ocorre em genótipos de plantas que permitam a penetração de mais luz no dossel, como nas plantas eretas e de folhagem porosa (SCHWARTZ; SINGH, 2013) ou em plantas com crescimento mais compacto (menor densidade foliar) (MIKLAS *et al.*, 2013). A resistência fisiológica geralmente está relacionada à sensibilidade da planta ao ácido oxálico, porém, as fontes de alelos para a resistência fisiológica ao mofo branco são de uma população andina, a qual não se adapta bem às condições brasileiras, ou vem de um reservatório genético secundário (*Phaseolus coccineus* L) (FERREIRA *et al.*, 2018).

Algumas práticas no campo podem ajudar a diminuir as infecções pelos escleródios presentes no solo, como o rodízio com culturas não hospedeiras ou o Sistema de Plantio Direto (neste, a formação de palhada sobre o solo afeta o ciclo de vida do patógeno e incrementa a atividade de microrganismos antagonicos) (ROUSSEAU; RIOUX; DOSTALER, 2007). Outras práticas como maior espaçamento entre as plantas, redução da irrigação e uso de cultivares eretos com dossel aberto podem reduzir a incidência do mofo branco no feijoeiro, porém, elas também reduzem o rendimento de grãos e o retorno econômico aos produtores (SCHWARTZ; SINGH, 2013)

O controle químico tem a maior eficiência no controle de *S. sclerotiorum* porém apresenta desvantagens quando utilizado sozinho, o uso reiterado de fungicidas gera uma pressão seletiva sobre os isolados que podem se tornar resistentes aos princípios ativos. Já foi observada a diminuição de eficácia de benzimidazóis, benomil, tiofanato metílico e carbendazim contra algumas cepas de *S. sclerotiorum* (CEZAR *et al.*, 2015).

A pressão da sociedade para a redução do uso de agrotóxicos e a grande demanda por produtividade no setor agrícola demanda a utilização de vários

métodos de controle para combater a doença, neste contexto surge o controle biológico como um pilar para uma agricultura mais sustentável, pois a sua utilização permite a redução do uso de agrotóxicos e gera menos contaminantes para o solo e para as águas subterrâneas. Algumas espécies do gênero *Trichoderma* são consideradas bons agentes de controle biológico, as preparações comerciais a base de *Trichoderma* spp. são muito eficazes no controle de vários fitopatógenos, e podem ser utilizados no manejo integrado em conjunto com agrotóxicos como o brometo de metila, benomil ou outros produtos químicos (BENÍTEZ *et al.*, 2004; VYAS; VYAS, 1995), pois muitas estirpes de *Trichoderma* spp. resistem naturalmente a vários compostos tóxicos, incluindo herbicidas, fungicidas e pesticidas, como o DDT e compostos fenólicos (CHET; INBAR; HADAR, 1997). Além disto, já foi verificado em testes de campo que algumas cepas de *T. harzianum* são competentes para controlar *S. sclerotiorum* no feijão comum. Os isolados CEN287, CEN316 e 1306 conseguiram reduzir o número de apotécios por metro quadrado e os isolados CEN287, CEN316 e 1306 reduziram a severidade do mofo-branco (CARVALHO *et al.*, 2015).

## 1.2 O gênero *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* é composto por fungos ascomicetos encontrados frequentemente nos solos e também em madeiras e plantas herbáceas. Possuem ampla distribuição geográfica, encontrados em todos os solos tropicais e temperados. São caracterizados pelo crescimento rápido, pelos conídios verdes e conidióforos ramificados (HARMAN *et al.*, 2004). Este gênero foi considerado o anamorfo (i.e, o estágio assexual) do gênero *Hypocrea*. porém, descobertas recentes mostraram que alguns fungos do gênero *Trichoderma* também possuem o estágio sexual (DATTENBÖCK *et al.*, 2018). Com as mudanças no código Internacional para nomenclatura de algas, fungos e plantas, há propostas para unificar esses gêneros, transferindo os fungos do gênero *Hypocrea* para o gênero *Trichoderma* (BISSETT *et al.*, 2015).

Considerado um gênero de espécies oportunistas, algumas espécies de *Trichoderma* conseguem colonizar plantas em relações mutualistas, mas também podem causar doenças em outras espécies de plantas, como, por exemplo, em pinheiro-larácio (*Pinus nigra*) causado por *T. viride* (NICOSIA *et al.*, 2015). Além disso, parasitam espécies fúngicas, sendo o agente causal da doença do mofo verde

em cogumelos comestíveis (COLAVOLPE; MEJÍA; ALBERTÓ, 2014). Também já há relatos de parasitismo em espécies animais, como em nematoides por *T. harzianum* (SHARON *et al.*, 2001), e em humanos com a imunidade comprometida parasitados por *T. longibrachiatum* (RICHTER *et al.*, 1999).

Algumas espécies possuem importância industrial, sendo utilizadas como produtoras de proteínas extracelulares, em especial quitinases e celulases. Também são comercializados como agentes de controle biológico contra doenças fúngicas, em especial *T. virens*, *T. harzianum*, *T. atroviride* e *T. asperellum*, pois conseguem controlar a população dos fitopatógenos através do micoparasitismo direto, competição, antibiose e através da indução de resistência da planta. No Brasil, em 2007, foram empregadas aproximadamente 550 toneladas de produtos a base de *Trichoderma* (DANIELE FRANCO MARTINS *et al.*, 2012)

## **1.2.1 Interação entre *Trichoderma* spp e plantas hospedeiras**

### **1.2.1.1 Promoção de crescimento**

Na interação mutualística de *Trichoderma* spp. com seus hospedeiros vegetais há uma troca de benefícios, a planta oferece um nicho e alguns compostos orgânicos e o fungo oferece proteção e disponibiliza de nutrientes do solo. Exsudatos radiculares, obtidos de tomates expostos a uma variedade de estresses bióticos e abióticos (ferimentos, concentração salina e ataque de patógenos), atuam como quimioatrativos e estimulam o crescimento de *T. harzianum*, em um mecanismo que parece ser seletivo para micróbios não patogênicos (LOMBARDI *et al.*, 2018). Uma vez em contato com plantas hospedeiras *Trichoderma* spp. podem colonizar suas raízes e assim induzir na planta um estado de defesa contra outros patógenos ou promover o crescimento vegetal.

A promoção de crescimento pode ser indireta, através do controle que *Trichoderma* spp. realizam sobre populações de microrganismos deletérios que afetam o crescimento vegetal, ou diretamente através da liberação de hormônios ou da solubilização de nutrientes no solo. Por exemplo, *T. harzianum* T22 consegue solubilizar nutrientes a partir dos seus compostos em fase sólida, como fosfato

mineral,  $MnO_2$ ,  $Fe_2O_3$  e zinco metálico (ALTOMARE *et al.*, 1999). Algumas estirpes de *Trichoderma* spp. também são capazes de promover indiretamente o crescimento ao degradar compostos tóxicos presentes no solo. A associação com *T. harzianum* STh20-1 permitiu que sementes de tomate germinassem em solos pobres em nutrientes contaminados com petroquímicos e que suas plântulas florescessem nos rejeitos de extração de betume sem o uso de fertilizantes (REPAS *et al.*, 2017).

O crescimento direto induzido por *Trichoderma* spp. pode ser notado tanto na parte aérea quanto nas raízes. O crescimento da parte aérea pode ser decorrente do aumento das raízes e, portanto, do aumento da área de absorção e nutrição da planta. A produção de hormônios vegetais ou de substâncias estruturalmente relacionadas é um mecanismo que várias espécies de *Trichoderma* utilizam para promover o crescimento. *T. virens* produz o ácido indol-3-acético (IAA), um regulador chave do desenvolvimento de raízes laterais e de pelos radiculares, e consegue aumentar de 4 a 6 vezes o número de raízes laterais de *Arabidopsis thaliana*, apesar de não interferir no crescimento da raiz primária (CONTRERAS-CORNEJO *et al.* 2009). *T. asperelloides* aumenta a expressão do fator de transcrição MYB77 nas raízes de *A. thaliana* que é ativado em resposta a auxinas e está envolvido na formação de raízes laterais (BROTMAN *et al.*, 2013).

### 1.2.1.2 Indução de defesa

Na colonização por *Trichoderma* spp. a planta ativa parcialmente o seu sistema imune, como uma estratégia para limitar a colonização (MARTÍNEZ-MEDINA *et al.*, 2013). Plantas hospedeiras reconhecem *Trichoderma* spp. por padrões moleculares compartilhados com outros fungos (MAMPs), como a quitina, por exemplo, ou de padrões moleculares resultantes de danos na própria planta ou no fungo colonizador (DAMP) liberados durante a colonização (DJONOVIC *et al.*, 2006; VITERBO *et al.*, 2007). Outras moléculas específicas liberadas pelo fungo também podem desencadear a resposta de defesa (DJONOVIC *et al.*, 2006; VITERBO *et al.*, 2007). O reconhecimento de padrões conservados MAMPs ou DAMPs por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) na superfície da célula vegetal resulta em uma imunidade não específica chamada PTI (imunidade

desencadeada por padrões), esta é a primeira etapa do modelo Zig-Zag proposto por JONES e DANGL (2006) (Figura 1).

As respostas de PTI incluem o reforço da parede celular, o acúmulo de compostos antimicrobianos e espécies reativas de oxigênio (CHACÓN *et al.*, 2007; CONTRERAS-CORNEJO *et al.*, 2011; SALAS-MARINA *et al.*, 2011; YEDIDIA *et al.*, 1999). Estas alterações fisiológicas contribuem para a resistência de plantas contra um amplo espectro de patógenos.

Após limitar a penetração do fungo, a expressão de alguns genes relacionados à defesa retorna a níveis pré-infecciosos (MASUNAKA; HYAKUMACHI; TAKENAKA, 2011; YEDIDIA, I.; BENHAMOU; CHET, 1999). É provável que esta supressão da defesa seja devida a moléculas efetoras secretadas por *Trichoderma spp.* que possibilitam sua permanência na planta como um simbionte avirulento (MARTÍNEZ-MEDINA *et al.*, 2013). A liberação de moléculas efetoras para interferir na PTI consiste na segunda etapa do modelo Zig-Zag.

A terceira etapa do modelo Zig-Zag consiste no reconhecimento ou não dos efetores pelas proteínas de resistência da planta. Nas interações compatíveis, os efetores podem desencadear suscetibilidade (ETS) ou, nas interações incompatíveis, podem ser reconhecidos por proteínas de resistência NB-LRR ativando a imunidade desencadeada por efetores (ETI), resultando na resistência da planta.

A quarta etapa do modelo é a corrida armamentista entre os dois organismos, ocorrendo pressão seletiva sobre os patógenos para que eles evadam a ETI, através da diversificação do efector reconhecido ou através de outros efetores liberados para enfraquecer a ETI; e a pressão gerada pelos novos efetores para a aquisição ou diversificação de proteínas R, pelas plantas, para o reconhecimento dos novos efetores.

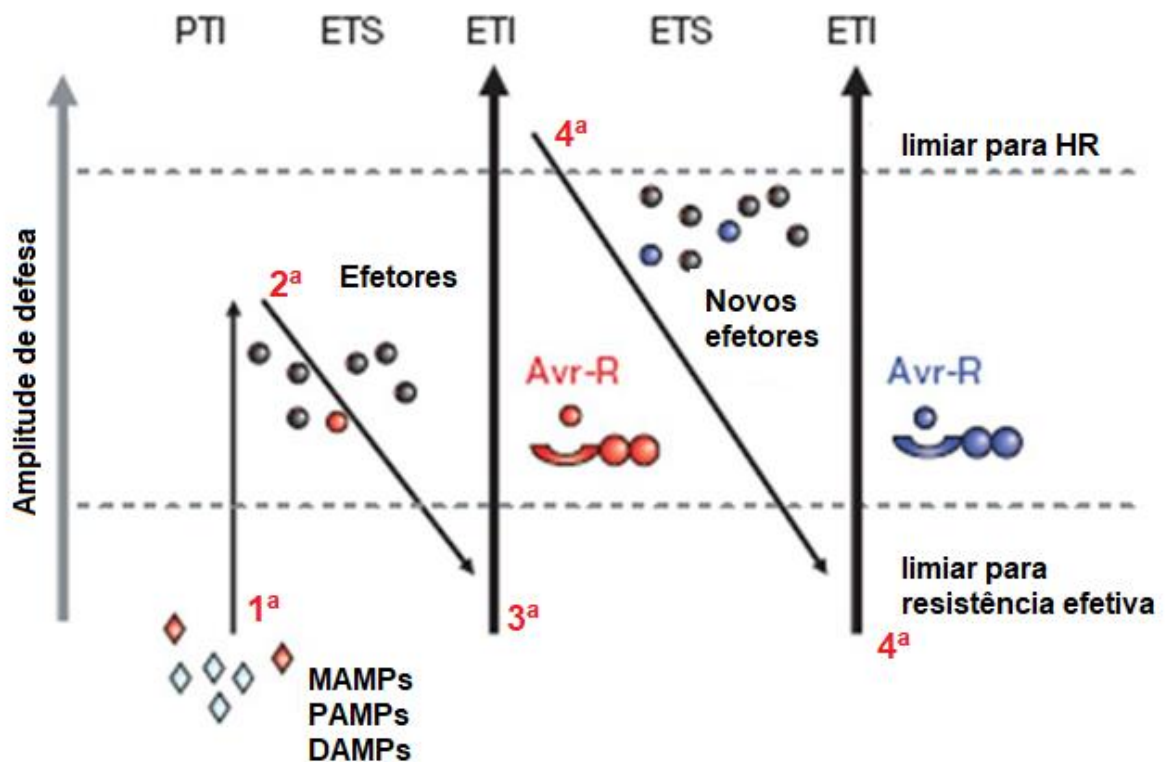


Figura 1 Modelo Zig-Zag da interação entre microrganismos e plantas e o sistema imune vegetal. Adaptado de JONES e DANGL (2006). As etapas são mostradas pelos números ordinais em vermelho. A primeira etapa consiste no reconhecimento pela planta de padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs), a patógenos (PAMPs) ou a danos (DAMPs) e ativação da imunidade desencadeada por padrões (PTI), a segunda etapa consiste na liberação de efetores pelos microrganismos para evadir da PTI causando a suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS), a terceira etapa consiste no reconhecimento dos efetores pelas proteínas de resistência da planta (Avr-R) gerando a imunidade desencadeada por efetores (ETI) que pode gerar respostas de hipersensibilidade (HR) e a quarta etapa consiste na pressão seletiva e corrida armamentista para os patógenos desenvolverem novos efetores e não serem reconhecidos e para as plantas desenvolverem novos Avr-R para reconhecerem esses novos efetores.

A resposta da ETI é geralmente mais rápida e forte que a PTI, e inclui respostas hipersensitivas, como a morte das células infectadas e uma explosão oxidativa para limitar o avanço do patógeno (JONES; DANGL, 2006). A ETI compartilha algumas respostas com a PTI, como a sinalização dependente de  $Ca^{2+}$ , a geração de espécies reativas de oxigênio no apoplasto e a secreção de componentes antimicrobianos (TSUDA *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2017), porém a dinâmica e a força de ativação são diferentes em cada forma de imunidade. Ainda não está claro como os PRRs e proteínas NB-LRR, localizados em compartimentos celulares diferentes, ativam componentes similares para induzirem defesas relacionadas (KADOTA *et al.*, 2018)



Na reação de hipersensibilidade (RH) desenvolvida na ETI ocorre morte celular rápida das células próximas ao sítio de infecção com a liberação de compostos tóxicos para isolar e matar o patógeno, evitando a sua disseminação pela planta hospedeira (AGRIOS, 2005; BOLWELL, 1999). A RH induz a produção de um grande número de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR). As proteínas PR estão divididas em 17 famílias com atividades antimicrobianas ou atividades enzimáticas para a produção de metabólitos secundários, alguns exemplos são quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanase, peroxidase, proteínas inibidoras de protease, etc. (JAIN; KUMAR, 2015). Quitinase (Chit) e  $\beta$ -1,3-glucanase (Glu) são enzimas líticas que degradam quitina e glucanos, dois componentes preponderantes na parede celular de fungos. (HOAGLAND, 1990). As peroxidases (Per) catalisam a oxidação de vários substratos na presença de peróxido de hidrogênio como acceptor de elétrons, a reação típica é  $2S + H_2O_2 + 2e^- \rightarrow 2Sox + 2H_2O$  (no qual S é o substrato doador de elétron e Sox é o substrato oxidado) (FALADE *et al.*, 2017). As peroxidases podem estar envolvidas na degradação de compostos fenólicos e na biossíntese de lignina, no catabolismo do ácido Indole-3-acético e na oxidação de compostos tóxicos (HOAGLAND, 1990).

Outras enzimas importantes para a defesa vegetal incluem a fenilalanina amônia liase (PAL) e as lipoxigenases (Lox). A PAL atua na conversão de L-fenilalanina para ácido trans-cinâmico e amônia, está envolvida na síntese de compostos fenólicos incluindo flavonoides (HOAGLAND, 1990) e também participa da via de síntese de monômeros de lignina e do ácido salicílico. As lipoxigenases catalisam a hidroperoxidação de ácidos graxos polinsaturados; em plantas e estão envolvidas na produção de aldeídos voláteis e do ácido jasmônico (MOSBLECH; FEUSSNER; HEILMANN, 2009).

Já foi descrito que espécies de *Trichoderma* simbiotes quando colonizam raízes de plantas hospedeiras podem desencadear uma resistência sistêmica induzida (ISR) (MARTÍNEZ-MEDINA *et al.*, 2013), esta resistência é desencadeada por organismos benéficos como rizobactérias promotoras de crescimento vegetal e como algumas espécies de *Trichoderma*. A ISR assemelha-se à resistência sistêmica adquirida (SAR) induzida por patógenos, pois ambas tornam as partes de plantas não infectadas mais resistentes a um amplo espectro de patógenos (GIBBS *et al.*, 2014). A ISR é caracterizada principalmente por respostas dependentes de

ácido jasmônico (JA), já a SAR é caracterizada principalmente por respostas dependentes de ácido salicílico (SA) (Figura 2). Alguns estudos apontam que há o intercruzamento entre estes dois tipos de resistência e que as vias reguladas pelos hormônios ácido salicílico (SA) e ácido abscísico (ABA) também são necessárias para o desenvolvimento da ISR (MARTÍNEZ-MEDINA et al., 2013).

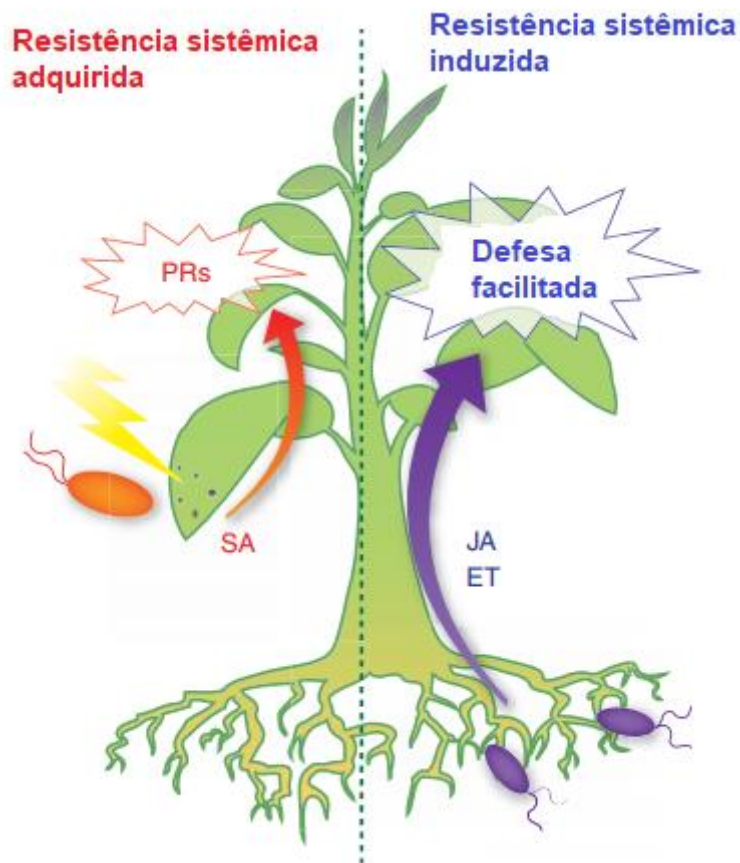


Figura 2 Respostas de defesa sistêmica em plantas. Adaptado de PIETERSE *et al.* (2009). A Resistência Sistêmica Adquirida é ativada por patógenos (em cor laranja) e depende de sinalização com o ácido salicílico (SA) e nela ocorre a produção de proteínas relacionadas à patogênese (PRs), já a Resistência Sistêmica Induzida é ativada por microrganismos benéficos (em roxo) e depende de sinalização com o ácido jasmônico (JA) e com o etileno (ET), após a sinalização outras partes da planta ficam em um estado de defesa pré-ativado que facilita a resposta de defesa contra infecções futuras.

### 1.2.2 Interação de *Trichoderma* com fungos fitopatogênicos

Algumas espécies de *Trichoderma* conseguem controlar o crescimento de fungos fitopatogênicos no solo através da competição por recursos, elas são consideradas boas competidoras por nutrientes, por exemplo, na deficiência de ferro,

estas secretam agentes quelantes férricos, chamados sideróforos, para mobilizar o ferro no ambiente (EISENDLE *et al.*, 2004). *T. harzianum* T35 controla *Fusarium oxysporum* ao competir pelos nutrientes da rizosfera e o biocontrole é mais eficaz a medida que a concentração de nutrientes diminui (BENÍTEZ *et al.*, 2004).

Outro método utilizado por *Trichoderma spp.* para controlar os fitopatógenos no solo consiste na antibiose e envolve a secreção de compostos voláteis ou antibióticos. Entre estes metabolitos, estão o ácido harzianico, tricolinas, gliovirina, viridina, alameticinas e peptaibols (BENÍTEZ *et al.*, 2004). Este último consiste numa classe de peptídeos lineares com atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias Gram positivo, e que atuam de forma sinérgica com enzimas que degradam a parede celular (CWDE) pois são capazes de formar canais de membrana dependentes de voltagem e assim desestruturar a membrana do hospedeiro (MUKHERJEE *et al.*, 2012; VITERBO *et al.*, 2007; WIEST *et al.*, 2002). O genoma de espécies de *Trichoderma* micoparasitas tem várias cópias de genes que codificam sintetases de peptídeos não ribossomais responsáveis pela síntese de peptaibols (KUBICEK *et al.*, 2011).

O micoparasitismo é considerado o mecanismo de antagonismo mais importante nas espécies de *Trichoderma* e é o estilo de vida ancestral do gênero. Este processo ocorre em etapas, sendo a primeira delas o reconhecimento do hospedeiro, o sensoriamento remoto é feito através de exoquitinases que são expressas constitutivamente em baixos níveis (HARMAN *et al.*, 2004), caso estas exoquitinases encontrem o fungo hospedeiro elas liberarão fragmentos de quitina que sinalizarão sua presença para a hifa de *Trichoderma spp.* Após isso, a hifa de *Trichoderma spp.* se une ao fungo hospedeiro e começa a se enrolar nele e forma o apressório para a fixação e penetração na hifa do fungo hospedeiro (BENÍTEZ *et al.*, 2004). A etapa seguinte consiste na produção de CWDEs e peptaibols (HOWELL, 2003), que facilitam tanto a entrada da hifa de *Trichoderma* e a assimilação do conteúdo de parede celular. As principais enzimas necessárias para lisar a parede celular de fungos hospedeiros como quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases são abundantes nos genomas de *Trichoderma spp.* (KUBICEK *et al.*, 2011). Outras enzimas importantes neste processo, já identificadas em *Trichoderma spp.* são as  $\alpha$ -manosidases, fosfatases ácidas e as proteases (MONTEIRO *et al.*, 2010).

### 1.3 Efeitores

Os Efeitores são proteínas ou outras moléculas (metabólitos, pequenos peptídeos ou pequenos RNAs) que alteram a estrutura e a função da célula hospedeira para permitir a colonização ou infecção pelo microrganismo. As proteínas efetoras foram descobertas pela sua capacidade de desencadear a resposta hipersensível em plantas resistentes (atividade de "avirulência"), porém, posteriormente foram encontradas como contribuindo para a virulência em plantas suscetíveis (plantas hospedeiras que não possuem genes de resistência eficazes). Assim, o termo efector passou a ser adotado para compensar a limitação conceitual do termo avirulência, uma vez que para definir a virulência da proteína é preciso de antemão definir o genótipo do hospedeiro para saber se a interação será compatível ou não. (HOGENHOUT *et al.*, 2009).

Devido à pressão seletiva exercida pelos hospedeiros para reconhecer proteínas efetoras, estas costumam evoluir rapidamente e não costumam apresentar indícios de homologia com outras proteínas. A falta de homologia torna difícil prever se uma proteína é efectora ou não (MARTIN; KAMOUN, 2012). Há pouco consenso sobre a anotação destas proteínas, geralmente pequenas proteínas secretadas são consideradas efetoras, o que superestima o número de proteínas que realmente são efetoras. Alguns critérios utilizados para refinar a busca por efetores incluem: a procura de um peptídeo sinal, a ausência de domínios transmembrana, a falta de similaridade com outros domínios proteicos óbvios, tamanho razoavelmente pequeno e que a proteína seja específica da espécie estudada (SONAH; DESHMUKH; BÉLANGER, 2016).

As proteínas efetoras podem atuar no apoplasto (espaço intercelular) ou no citoplasma do hospedeiro (são translocadas para o interior da célula ou são secretadas diretamente nela através do haustório). Alguns motivos de aminoácidos conservados podem ajudar a prever se a proteína será translocada. O motivo RxLR já foi validado como essencial para a translocação de proteínas efetoras em oomicetos e também vem sendo estudado em efetores fúngicos. KALE *et al.* (2010) mostrou que trocas de alguns aminoácidos em determinadas posições deste motivo ainda eram capazes de transportar a molécula do efector Avr1b fusionada com GFP

para dentro de raízes de soja; a troca do motivo completo pela sequência AAAA, no entanto, impossibilita a translocação da proteína. Mostrando assim que motivos similares a RxLR (KALE; TYLER, 2011) podem também ter papel na translocação de proteínas efetoras. Outro motivo de translocação vem mostrando potencial para pesquisa especificamente em efetores fúngicos como o [W/Y/F]<sub>x</sub>C (GODFREY *et al.*, 2010).

Outras características nas sequências de aminoácidos das proteínas efetoras começaram a ser estudadas, como a presença de uma região de desordem intrínseca. Regiões com esta característica são estruturalmente flexíveis, não demonstrando estruturas secundárias em condições fisiológicas *in vitro* mas podendo dobrar dependendo de um estímulo como, por exemplo, durante interações com outras proteínas. Estas regiões possuem menor complexidade de sequência, abrigam aminoácidos carregados não-interativos e poucos resíduos hidrofóbicos (MARÍN; UVERSKY; OTT, 2013). Proteínas efetoras bacterianas são ricas em regiões longas de desordem intrínseca (MARÍN; UVERSKY; OTT, 2013) e as proteínas efetoras de oomicetos que possuem o motivo RxLR são mais desordenadas do que as outras efetoras no secretoma (SHEN *et al.*, 2017). MARÍN *et al.* (2013) postularam que a flexibilidade estrutural dessas regiões pode ser essencial para a translocação do efector, para a evasão do sistema de imunidade inata vegetal ou para o mimetismo de uma função do hospedeiro. Proteínas não efetoras com essas regiões estão tipicamente relacionadas com transdução de sinal e regulação transcricional (DUNKER *et al.*, 2005; IAKOUCHEVA *et al.*, 2002; UVERSKY *et al.*, 2005)

GUZMÁN-GUZMÁN *et al.* (2017) identificou 233 candidatos a efector nos genomas de *T. asperellum*, *T. virens* e *T. reesei*, elas foram agrupadas em 18 famílias, das quais 7 já são estudadas como importantes na interação: Proteínas com domínio LysM, tiorredoxinas, proteínas com domínio CFEM (Common in Fungal Extracellular Membranes), cerato-plataninas, serina proteases, hidrofobinas e metaloproteases

### 1.3.1 Pequenas Proteínas ricas em cisteína (SCRPs)

As proteínas denominadas “small cystein rich proteins” (SCRPs) constituem um grupo de proteínas não homólogas mas que possuem funções similares e que evoluíram por convergência análoga. Inclui proteínas sem atividade catalítica conhecida, mas que são ligantes de carboidratos, lipídeos e proteínas, podendo se ligar a receptores de membrana, mascarar MAMPs, evitando o reconhecimento do organismo produtor por plantas hospedeiras, e também podem atuar como toxinas (TEMPLETON; RIKKERINK; BEEVER, 1994). Estas proteínas se caracterizam pela presença de peptídeo sinal de secreção, tamanho pequeno (300 aminoácidos ou menos) e pela presença de pelo menos 4 cisteínas (KUBICEK *et al.*, 2011). As proteínas efetoras secretadas por patógenos no apoplasto de plantas hospedeiras geralmente são SCRPs assim como a maioria dos inibidores de serina ou cisteína proteases. Os efetores apoplásticos de *C. fulvum*, por exemplo, tem a capacidade de inibir enzimas hidrolíticas da planta, como proteases, glucanases, e quitinases (SONAH; DESHMUKH; BÉLANGER, 2016).

O genoma de *Trichoderma* spp. contém um abundante arsenal de genes que codificam pequenas proteínas secretadas ricas em cisteína (SCRPs) (KUBICEK *et al.*, 2011). Entre estas proteínas estão as cerato-plataninas, as swoleninas, as hidrofobinas e proteínas com domínio CFEM (Common in Fungal Extracellular Membranes).

As cerato plataninas SM1/EPL1 e SM2 podem atuar como MAMPs modulando a resposta de defesa de plantas hospedeiras. No entanto, também já foi demonstrado que elas podem ser efetoras diminuindo a resposta de defesa de hospedeiras (GOMES *et al.*, 2015), neste estudo foi mostrado que mutantes nocauteados para SM1 de *T. harzianum* ALL 42 desencadearam de forma mais intensa o nível de expressão de genes de defesa de feijoeiro comum, como Lox e Glu, em comparação com o selvagem..

As swoleninas e as hidrofobinas de *Trichoderma* spp. são importantes para a sua capacidade de colonizar as raízes, a super expressão de swolenina em *T. asperellum* aumentou a capacidade de colonizar raízes de pepino (BROTMAN *et al.*, 2008), e a deleção do gene da hidrofobina tvhydii diminui a capacidade de *T. virens* de colonizar a raiz de tomate, enquanto a sua super expressão aumenta a capacidade (GUZMÁN-GUZMÁN *et al.*, 2017).

O domínio CFEM (Common in Fungal Extracellular Membranes) é exclusivo dos fungos, provavelmente surgiu no último ancestral comum dos filos Ascomycota e Basidiomycota e foi perdido no subfilo Taphrinomycotina. Nem todas proteínas com o domínio CFEM são detectadas por softwares que buscam proteínas secretadas, como o Secretool, o que pode indicar que algumas delas fiquem associadas na parede celular ou na membrana plasmática (MENDOZA-MENDOZA *et al.*, 2018). Existe uma associação entre este domínio e a patogenicidade de fungos. Proteínas com este domínio são reconhecidas por receptores de superfície celular, e desencadeiam cascatas de transdução de sinal que alteram a atividade de moléculas de adesão em interação patógeno-hospedeiro (ZHANG *et al.*, 2015).

O domínio CFEM está presente em uma ou mais cópias em proteínas de membrana, normalmente com uma cópia no N terminal. A sequência consenso é PxC[A/G]x<sub>2</sub>Cx<sub>8-12</sub>Cx<sub>1-3</sub>[x/T]Dx<sub>2-5</sub>CxCx<sub>9-14</sub>Cx<sub>3-4</sub>Cx<sub>15-16</sub>C, onde “x” é qualquer aminoácido e a distância entre eles é mostrada. O domínio é predominantemente formado por resíduos hidrofóbicos (32 – 45% de frequência) e contém 8 resíduos de cisteína (KULKARNI; KELKAR; DEAN, 2003). Deleções de genes contendo este domínio em *Candida albicans* mostrou que estes genes são pleiotrópicos, influenciando características de superfície celular e a formação de biofilme (PÉREZ *et al.*, 2011). Em outros modelos, proteínas com este domínio tem papel na assimilação de ferro (NASSER *et al.*, 2016), homeostase redox e desenvolvimento assexuado (SABNAM; ROY BARMAN, 2017), ou ainda como receptor de superfície celular ou como molécula de adesão na interação patógeno-hospedeiro (KOU *et al.*, 2017).

Poucos estudos mostram o papel de proteínas com o domínio CFEM nas interações mutualísticas de *Trichoderma* spp. com plantas. LAMDAN *et al.* (2015) mostrou que a abundância de duas SCRPs-CFEM no secretoma de *T.virens* é reduzida na interação com raízes de milho em hidroponia e que mutantes destas duas SCRPs-CFEM são similares ao selvagem nos parâmetros fisiológicos de germinação, crescimento, esporulação em BDA e capacidade de colonização. Porém possuem maior habilidade de indução de resposta sistêmica (ISR), sendo que as plantas de milho que interagiram com os mutantes eram mais resistentes a *C. heterostrophus* do que as que interagiram com o selvagem. Mostrando, assim, que estas duas proteínas atuam diminuindo a ISR. A diminuição da abundância das

SCRP-CFEM pode ser devida ao aumento de degradação destas proteínas ou ao sequestro delas pelas raízes (LAM DAN *et al.*, 2015; MENDOZA-MENDOZA *et al.*, 2018). Um estudo mostrou que estas duas proteínas tem sua expressão diminuída a nível transcricional (HORWITZ *et al.*, 2013), porém, um estudo de análise de transcrito a nível global não mostrou regulação significativa nestas duas proteínas (MORÁN-DIEZ *et al.*, 2015).

### 1.3.2 Serina-peptidase

As serina-peptidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas e que possuem em seu sítio ativo a tríade catalítica serina-histidina-aspartato. São encontradas em todos organismos vivos e possuem uma variedade de funções, como na maturação de proteínas, clivagem do peptídeo sinal, transdução de sinal, reciclagem de proteínas intracelulares, apoptose, quebra e aquisição de nutrientes entre outros. Estas enzimas podem ser específicas, reconhecendo um motivo ou uma proteína em particular, ou ter uma ação mais generalista clivando qualquer resíduo hidrofóbico ou positivamente carregado (MUSZEWSKA *et al.*, 2017).

As serina proteases do tipo tripsina são marcadores de patogenicidade (DUBOVENKO *et al.*, 2010), sendo importantes na degradação de proteínas estruturais de parede celular (LEGER; JOSHI; ROBERTS, 1997). Enquanto as serina proteases do tipo subtilase costumam ser as principais proteases secretadas por saprófitos para a aquisição nutricional de aminoácidos (LI *et al.*, 2017).

As serina proteases podem estar envolvidas na proteção da hifa de *Trichoderma* spp. contra enzimas do hospedeiro (GUZMÁN-GUZMÁN *et al.*, 2017) sendo importantes no controle de *B. cinerea* por *T. harzianum* (BENÍTEZ *et al.*, 2004) e na diminuição dos sintomas causados por *R. solani* em sementes de algodão (FLORES; CHET; HERRERA-ESTRELLA, 1997).

Várias Serina proteases já foram validadas em *Trichoderma* spp. na interação com fitopatógenos, a maioria delas são expressas na presença de componentes de parede celular de fungos. Alguns estudos mostram que as serina proteases podem



ter aplicação para o controle de outros hospedeiros como por exemplo em nematoides (SUAREZ *et al.*, 2004), porém pouco se sabe da importância delas na interação de *Trichoderma* spp. com plantas sem a presença de nenhum fitopatógeno.

## 2. Objetivo

O objetivo geral foi avaliar o papel das proteínas serina peptidase 747596 e SCRP-CFEM 779733 na capacidade de *T. harzianum* em controlar *S. sclerotiorum*, promover o crescimento e induzir defesa em *P. vulgaris*.

Segundo dados do nosso grupo, a serina peptidase 747596 tem sua expressão aumentada na interação de *Trichoderma harzianum* com o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (STECCA STEINDORFF *et al.*, 2014) e a SCRP-CFEM 779733 possui um ortólogo em *T. asperellum* que possui sua transcrição aumentada na interação com *Phaseolus vulgaris* além de aparecer no secretoma desta interação (dados não publicados).

### 2.1 Objetivos específicos

- Desenvolver mutantes de *T. harzianum* TR274, nocauteados para as proteínas acima mencionadas;
- Analisar a interação dos mutantes com o fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum* em comparação com a linhagem parental, para analisar a capacidade de micoparasitismo ou antagonismo.
- Analisar a interação dos mutantes com *P. vulgaris* em comparação com a linhagem parental para avaliar a capacidade de promover crescimento ou de induzir defesa.

### 3. Material e métodos (fluxograma da metodologia)

#### 3.1 Organismos utilizados e condições de cultura

O isolado *T. harzianum* TR274 foi utilizado como modelo neste trabalho, levando em consideração que seu genoma foi sequenciado e está disponível para consulta no site do MycoCosm na página do Joint Genome Institute – JGI, e que nosso grupo possui dados de expressão diferencial durante sua interação com *S. sclerotiorum* e com feijoeiro comum *P. vulgaris*.

*T. harzianum* TR274, o fungo *S. sclerotiorum*, e as sementes de feijão de *P. vulgaris* cultivar pérola foram cedidos pela CNPAF, EMBRAPA arroz e feijão – GO. Os isolados foram cultivados e mantidos em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) a 28°C. Uma suspensão de conídios de *T. harzianum* TR274 e uma suspensão de conídios de *S. sclerotiorum* foram estocadas em glicerol 50% para sua criopreservação a -80°C. As sementes de feijão foram estocadas a 4°C.

A linhagem SC-9721 de *Saccharomyces cerevisiae* foi cedida pelo Laboratório de Biotecnologia Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP.

#### 3.2 Análises “in silico”

Para a busca de SCRPs no genoma de *T. harzianum* TR274 e de motivos de translocação, foram desenvolvidos scripts em linguagem de programação Python, utilizando a biblioteca BioPython. Os genomas foram baixados na página do Joint Genome Institute - JGI (<https://genome.jgi.doe.gov/pages/search-for-genes.jsf?organism=Trihar1>). O parâmetro utilizado para a busca foi: proteínas com tamanho menor que 300 aminoácidos e com mais de 4% de cisteínas. Após essa busca, as sequências proteicas foram analisadas pelo software SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) para a montagem da lista de SCRPs secretadas e a busca de prováveis motivos de translocação.

Foram buscados motivos de translocações já conhecidos para efetores: o RxLR-like e o Y/F/W-xC. Os parâmetros utilizados pelo script para encontrar motivos RxLR-like foi a procura entre os 50 aminoácidos após a clivagem pelo SignalP por sequências [R/K/H] x [L/I/M/F/Y/W] [R/K/H] (GUZMÁN-GUZMÁN *et al.*, 2017; KALE;

TYLER, 2011). Os parâmetros para a busca por motivos Y/F/W-xC foi a delimitação de que o “x” não poderia ser um C e que a sequência deveria estar entre os 30 aminoácidos após a clivagem do peptídeo sinal (GODFREY *et al.*, 2010; GUZMÁN-GUZMÁN *et al.*, 2017).

A partir da lista de proteínas SCRP secretadas com domínios de efetores gerada (anexo 1), foi selecionada a proteína SCRP-CFEM 779733 que possui motivo de translocação putativo YVC. Outro critério para sua escolha foi a transcrição aumentada de seu ortólogo em *T. asperellum* em interação com o feijoeiro (dados a serem publicados). Também foi selecionada a serina peptidase alcalina 747596, identificada entre as 10 proteínas mais expressas na interação entre *T. harzianum* TR274 e *S. sclerotiorum* (STECOA STEINDORFF *et al.*, 2014).

### **3.3 Deleção por Recombinação Homóloga.**

A obtenção dos mutantes nocauteados para o gene da serina peptidase 747596 ( $\Delta$ thsep) e para o da SCRP-CFEM 779733 ( $\Delta$ thcfem) foi realizada pela técnica de deleção por recombinação homóloga, nesta técnica é utilizado um cassete contendo um gene de seleção flanqueado nas regiões 5' e 3' com sequências correspondentes às que flanqueiam o gene a ser deletado.

Neste trabalho foi utilizado o gene que confere resistência à higromicina (Hygromycin-B-phosphotransferase protein - hph) como gene de seleção, e a montagem do cassete foi realizado mediante recombinação na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Para a montagem do cassete é necessário que as sequências flanqueadoras tenham uma ponta complementar ao gene hph e a outra ponta seja complementar ao vetor (pRS426) utilizado para transformar a levedura (Figura 3A).

A sequência que flanqueia pelo lado 5' deve ser complementar ao gene hph na sua extremidade direita e por isto o *primer reverse* que será utilizado para amplificar esta região terá uma pequena parte (20 nucleotídeos) que corresponde à sequência do gene hph, e a extremidade esquerda desta sequência será complementar ao plasmídeo utilizado para transformar a levedura, por isso o *primer forward* possui uma parte que é complementar ao plasmídeo pRS426.

Já a sequência flanqueadora pelo lado 3' deve ser complementar ao gene *hph* na sua extremidade esquerda, por isto o *primer forward* para amplificar esta região é que contém a sequência complementar ao gene *hph*; e na extremidade direita ela deve ser complementar ao plasmídeo pRS426, e por isto o *primer reverse* é que possui os nucleotídeos complementares ao pRS426.

A união é então realizada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem SC-9721 que irá recombinar as regiões homólogas ao gene de resistência e as regiões homólogas ao plasmídeo (Figura 3B). Esta linhagem não possui a capacidade de sintetizar uracil/uridina, e o plasmídeo pRS426 reestabelece esta via biosintética pois ele contém o gene *URA3*, após a transformação são selecionados os transformantes que conseguem crescer em meio de cultura sem uracil ou uridina.

O DNA das leveduras transformadas é extraído e o cassete de deleção é conseguido através da reação de PCR que irá amplificar desde a região que flanqueia pelo lado 5' passando pelo gene *hph* até o final da outra região que flanqueia pelo lado 3' (Figura 3C). Este cassete é utilizado para transformar protoplastos de *T. harzianum* que irá recombinar as regiões do cassete que são homólogas ao genoma do fungo, neste processo ocorrerá a inserção do gene de resistência e a retirada do gene escolhido (Figura 3D)

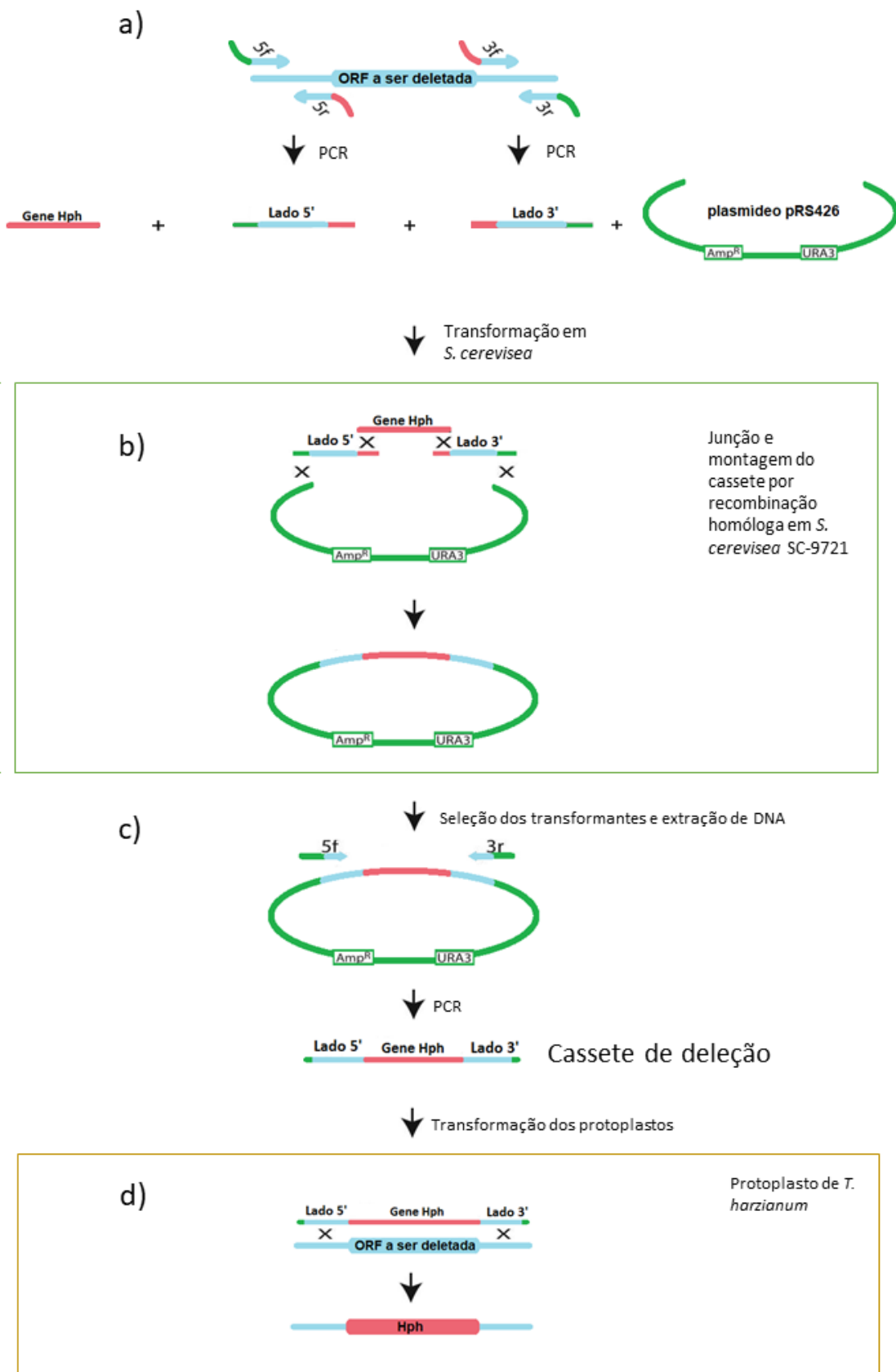


Figura 3. Metodologia para montagem do cassete de deleção através de recombinação homóloga por *S. cerevisiae* linhagem SC-9721 (Adaptada de COLÓT *et al.* (2006)). A) PCR das regiões flangeadoras com *primers* adaptados contendo uma parte complementar ao gene *hph* ou ao

plasmídeo pRS426 B) Recombinação e junção do plasmídeo com as regiões flanqueadoras e com o gene hph em *S. cerevisiae* C) PCR para recuperação do cassete montado D) Transformação de *T. harzianum* com o cassete e subsequente substituição do gene alvo pelo gene hph 5f: *primer forward* da região que flanqueia pelo lado 5'. 5r: *primer reverse* da região que flanqueia pelo lado 5'. 3f: *primer forward* da região que flanqueia pelo lado 3', 3r: *primer reverse* da região que flanqueia pelo lado 3'. Gene Hph: gene de resistência à higromicina (hygromycin B phosphotransferase). URA3: gene da Orotidine 5'-phosphate decarboxylase, que reverte a auxotrofia que a linhagem SC-9721 possui à uridina/uracila. Amp<sup>r</sup>: β-lactamase, confere resistência a antibióticos beta-lactâmicos como as penicilinas e cefamicina. Em verde é representado fragmentos com sequencias do plasmídeo pRS426. Em vermelho: sequencias do gene Hph. Em azul: sequencias do genoma de *T. harzianum*.

### 3.3.1. Obtenção da construção

#### 3.3.1.1 Extração do DNA genômico de *T. harzianum*

A extração de DNA de *T. harzianum* TR274 foi realizada seguindo o protocolo de VITIKAINEN *et al.* (2010). O micélio crescido em meio líquido batata-glicose foi macerado com nitrogênio líquido; depois foi misturado 100 mg de micélio macerado com 800 µL de tampão de extração (1,4M NaCl, 0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA) com 10 µL de RNase H (10mg/mL) e com 16 µL de β-mercaptoetanol. A amostra foi vortexada para homogeneizar e colocada em banho-maria a 65°C por 20 minutos. Depois foi colocada no gelo e adicionado 400 µL de fenol e 400 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (49:1) e vortexada por 10 minutos a 20000 g à temperatura de 4°C; O sobrenadante foi transferido para outro tubo com 800 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (49:1), vortexado novamente e centrifugado por 10 minutos a 20000 g e à 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 800 µL de isopropanol. O tubo foi misturado por inversão e incubado durante a noite em freezer -20°C. Após, a amostra foi centrifugada por 30 minutos a 20000 g à 4°C. O isopropanol foi descartado, e o DNA lavado com etanol 70%; este tubo foi vortexado e centrifugado por 5 minutos a 20000 g à temperatura de 4°C. Após, o etanol foi descartado e o precipitado foi secado à temperatura ambiente por 60 minutos. Posteriormente o precipitado foi ressuscitado em água Milli-Q autoclavada. O DNA foi armazenado em freezer -20 °C até a sua utilização como molde para a amplificação das regiões flanqueadoras.

#### 3.3.1.2 Primers para obtenção das construções

Os *primers* utilizados (material suplementar) para amplificação das regiões flanqueadoras dos genes selecionados foram desenhados de acordo SCHUSTER *et al.* (2012). Eles foram desenhados de forma que os fragmentos amplificados tivessem entre 1000 a 1500 pares de bases e com os fragmentos complementares ao gene de resistência à higromicina ou ao plasmídeo pRS426. Os *primers* para amplificação do gene de resistência à higromicina foram cedidos pelo Laboratório de Biotecnologia Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP)

### **3.3.1.3 PCR das regiões flanqueadoras e do gene de resistência.**

Cada tubo de reação continha 1 U de Taq DNA polimerase phoneutria®, tampão da enzima 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, *primer forward* 0,2 µM, *primer reverse* 0,2 µM, 0,5 µg de DNA de *T. harzianum* para os fragmentos 5' e 3' ou do plasmídeo pΔTku70 para o gene de resistência à higromicina e água milli-Q autoclavada q.s.p. 25 µl.

Os ciclos programados no termociclador para amplificação dos fragmentos flanqueadores foram: 94°C por 3 minutos; 94°C por 30 segundos, 65°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos (ciclo repetido 40 vezes); e extensão final: 72°C por 10 minutos. Para o gene de resistência à higromicina foram: 94°C por 3 minutos; 94°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos (ciclo repetido 40 vezes); e extensão final: 72°C por 10 minutos. Após terminado, as amostras foram guardadas em freezer -4°C.

Os fragmentos amplificados foram precipitados com etanol e acetato de amônio (CROUSE; AMORESE, 1987) e depois concentrados para serem unidos ao vetor pela *S. cerevisiae* linhagem SC-9721.

### **3.3.1.4 Transformação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* SC-9721**

#### **3.3.1.4.1 Preparo do vetor para transformação**

O vetor utilizado para transformação da levedura foi o pRS426. O vetor foi digerido seguindo o protocolo FastDigest® com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI.



#### **3.3.1.4.2 Preparo de células competentes**

Uma colônia de *S. cerevisiae* linhagem SC-9721 foi coletada de placa com meio SC- URA (glicose 20g/L, triptofano 0,1g/L, leucina 0,1g/L, histidina 0,05g/L, lisina 0,1g/L, Yeast Nitrogen Base 7g/L e ágar-ágar 17g/L) e inoculada em 10 mL de meio YPD (glicose 1% (m/v), peptona 2% (m/v) e extrato de levedura 1% (m/v)) em frasco cônico, foi incubado por 16 horas a 200 rpm e 30°C. Posteriormente, 2,5 mL desta cultura foram transferidos para um frasco cônico contendo 100 mL de meio YPD, que foi incubado com agitação de 200 rpm a 30°C. Após 4 horas de incubação, a cultura foi centrifugada por 5 minutos a 5000 g. Em seguida, as células foram ressuspensas com água Milli-Q autoclavada, centrifugadas por 5 minutos a 5000 g, e por fim ressuspensas com solução 1x de TE (0,1M Tris pH7,5, 0,01M EDTA pH 7,5)

#### **3.3.1.4.3 Transformação da levedura**

O protocolo utilizado foi seguindo o de SCHIESTL (1989). Foi preparado um mix (mix 1) contendo: 300ng do vetor pRS426 digerido (aproximadamente 2,5µL); 300ng do gene de seleção hph (aproximadamente 3µL); 300ng do fragmento 5' do gene de interesse (aproximadamente 3µL); 300ng do fragmento 3' do gene de interesse (aproximadamente 3µL) e 100µg de DNA de esperma de salmão (10 mg/mL). Um segundo mix (mix 2) foi preparado contendo: 100 µL de água Milli-Q autoclavada; 100µL de acetato de lítio 1M e 800µL de PEG 3350 50%.

Em seguida, 100µL de células competentes e 600µL do mix 2 foram adicionados ao mix 1, esta mistura foi homogeneizada por inversão e incubada sob agitação de 200 rpm por 30 minutos a 30°C. Depois, acrescentou-se 70µL de DMSO e as amostras foram incubadas por 15 minutos a 42°C, seguido por 2 minutos de banho de gelo.

Por último, 700µL de água Milli-Q foi adicionado ao mix 1 e centrifugados a 18385 g por 30 segundos. Descartou-se 800µL de sobrenadante e o restante foi inoculado em meio sólido SC-URA (glicose 20g/L, triptofano 0,1g/L, leucina 0,1g/L, histidina 0,05g/L, lisina 0,1g/L, Yeast Nitrogen Base 7g/L e ágar 17g/L) durante 3 dias a 30°C.

#### **3.3.1.5 Extração de DNA total da levedura**

A extração foi realizada de acordo com EVANS (1990) e GOLDMAN *et al.*, (2003). Após os 3 dias de incubação da *S. cerevisiae* transformada, a placa foi dividida em 4 quadrantes, e cada quadrante teve suas colônias coletadas e inoculadas em 10 mL de meio líquido SC-URA (glicose 20g/L, triptofano 0,1g/L, leucina 0,1g/L, histidina 0,05g/L, lisina 0,1g/L, Yeast Nitrogen Base 7g/L) e incubadas por 48 horas a 200 rpm à temperatura de 30°C. Após incubada, a cultura foi centrifugada por 5 minutos a 5657 g, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 1 mL de tampão de extração (EDTA 0,5M 50mL/L, Tris-HCl 2M pH8 100mL/L, NaCl 14,62g/L e SDS 10% 50mL/L). Em seguida foram adicionadas pérolas de vidro às amostras, e agitadas em vórtex por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e a partir dele foi feita a extração de DNA com 800µL de solução de clorofórmio:fenol (1:1), agitando a mistura durante 10 minutos em vórtex.

Posteriormente, foi centrifugado a 12000 g durante 15 minutos. A fase superior foi coletada e em seguida adicionou-se 450µL de isopropanol a ela. As amostras foram centrifugadas durante 2 minutos a 12000 rpm a 4°C e o sobrenadante descartado por inversão. Após, adicionou-se 100µL de etanol 70% a elas e centrifugou-as novamente a 12000 rpm, 4°C, por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Por fim, o sedimento foi ressuspendido com 50µL em água com 5µL RNase (10 mg/mL). A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% (m/v).

### **3.3.1.6 Amplificação do cassete de deleção**

Para cada amplificação do cassete de deleção, foram utilizados 1,25 U da TaKaRa polimerase®, tampão da enzima (1X), dNTP (0,2 mM), 1 µg de DNA das leveduras transformadas, *primer forward* da região que flanqueia pelo lado 5' (0,2 µM), e *primer reverse* da região que flanqueia pelo lado 3' (0,2 µM) dos genes em questão e água milli-Q autoclavada q.s.p. 50 µl. A amplificação foi realizada de acordo com o protocolo: Desnaturação inicial: 98°C por 10 segundos; Ciclo 40 vezes: 98°C por 7 segundos, 65°C por 30 segundos, 72°C por 5 minutos; Extensão final:: 72°C por 10 minutos. As amostras foram guardadas a -20°C e posteriormente concentradas por precipitação em etanol. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% (m/v).

### **3.3.2 Transformação de *T. harzianum* TR274**

#### **3.3.2.1. Obtenção de protoplastos**

Para obtenção dos protoplastos foi utilizada uma suspensão de conídios oriunda de placa do *T. harzianum* TR274 recém-esporulada (sete dias de cultivo em meio MEX). 30 µL desta suspensão foram espalhados em disco de papel celofane disposto em placa de cultura contendo meio MEX com 0,1% peptona para germinação durante 22 horas a 30°C. Em seguida, os conídios desta placa foram utilizados para a obtenção dos protoplastos. Para isto, adicionou-se 75 mg de enzima de lise de *T. harzianum* (Sigma #L-1412) em 15 mL de solução tampão P autoclavado (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0057g/mL, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,00142 g/mL, Sulfato de amônio 0,07926 g/mL; pH 5,6) esta mistura foi filtrada, dentro do fluxo, em uma placa de Petri (90 mm), depois 5 papéis celofane foram imersos dentro desta placa, um por um, para a remoção dos conídios.

Esta placa, com a solução para lisar a parede celular e os conídios, foi selada com parafilme, envolvida em papel toalha e incubada por 5 horas a 30°C e a 60 rpm para tornar os conídios em protoplastos. Os protoplastos foram colhidos da placa de Petri, pipetando a solução que estava na placa em um funil com filtro miracloth dentro de um tubo cônico de 50 mL, este tubo foi então centrifugado a 2000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os protoplastos sedimentados foram ressuspensos em 10mL de Tampão P. Novamente, centrifugou-se o tubo por 10 minutos, 2000 g a temperatura ambiente para precipitar os protoplastos, após a centrifugação o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, os protoplastos foram ressuspensos em 1 mL de Tampão STC autoclavado. (Sorbitol 0,218g/mL, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,00145g/mL, 1M Tris-HCL pH7.4 0,01mL/mL, Água Milli-Q autoclavada), foi adicionado 250 µl de solução de PEG (PEG 6000 0,25g/mL, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,0075g/mL, Tris HCl 1M pH 7,5 0,01mL/mL) e misturado por inversão. O tubo foi armazenado no gelo.

#### **3.3.2.2 Transformação de *T. harzianum***

A transformação de *T. harzianum* foi realizada seguindo protocolo de DERNTL *et al* (2015), com pequenas alterações. Para cada uma das construções ( $\Delta thcfem$  e  $\Delta thsep$ ) 30 $\mu$ g do cassete de deleção (concentrado em 10  $\mu$ L de água Milli-Q) foram misturados a 130  $\mu$ L da suspensão de protoplastos em um tubo cônico de 50 mL, e a mistura incubada por 30 minutos no gelo. Posteriormente, foi adicionado 1mL da solução de PEG (PEG 6000 0,25g/mL, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,0075g/mL, Tris HCl 1M pH 7,5 0,01mL/mL) e a mistura incubada à temperatura ambiente. Após 5 minutos de incubação, foram adicionados 2 mL de tampão STC (Sorbitol 0,218g/mL, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,00145g/mL, 1M Tris-HCL pH7.4 0,01mL/mL, Água Milli-Q autoclavada) e meio de seleção (MEX + 1.2 M de sorbitol) para um volume final de 40 mL. A mistura foi homogeneizada e 10 mL desta foi transferida para placas de petri (total de 4 placas) e incubadas a 30°C. Após 1 hora de incubação, 10 mL de meio de seleção MEX + 1.2 M de sorbitol contendo higromicina na concentração final de 100 $\mu$ g/mL. As placas foram incubadas a 30°C até o surgimento de colônias (2 -3 dias). Cada colônia transformante foi retirada da placa (fazendo um corte) e transferida para placas contendo meio seletivo MEX contendo higromicina na concentração final de 100 $\mu$ g/mL, estas foram incubadas a 30°C por 7 a 9 dias até a germinação dos conídios e conidiação do micélio.

Os conídios foram ressuspensos com solução salina, coletados e inoculados em novas placas com meio MEX contendo Triton X-100 (0,1% p/v) e higromicina (100  $\mu$ g/mL) para obter colônias individuais a partir dos conídios. Estas colônias foram repicadas para uma outra placa contendo o meio seletivo MEX contendo higromicina (100  $\mu$ g/mL) até a germinação dos conídios e conidiação do micélio, este procedimento foi repetido 3 vezes. Na última passagem essas colônias foram cultivadas em meio BDA para os experimentos seguintes e em meio MEX para extração do DNA genômico.

O experimento de transformação dos protoplastos de *T. harzianum* foi repetido. As 20 colônias únicas para os mutantes  $\Delta thsep$  do 1º experimento ( $\Delta thsep$  1º), as 12 colônias para  $\Delta thcfem$  do 1º experimento ( $\Delta thcfem$  1º), as 16 colônias dos mutantes  $\Delta thsep$  do 2º experimento ( $\Delta thsep$  2º) e as 5 colônias únicas de  $\Delta thcfem$  do 2º experimento ( $\Delta thcfem$  2º) foram crescidas em meio líquido MEX e tiveram seus DNAs extraídos para verificação da deleção da ORF dos respectivos genes alvos.

### 3.4 Confirmação da deleção

A verificação da deleção dos genes de interesse foi realizada por PCR, pela presença ou ausência da ORF do gene deletado e presença da ORF do marcador de seleção, *hph*.

A reação de PCR para confirmação da deleção da ORF da Serina peptidase foi realizada utilizando 0,65 U de Taq polimerase Cellco<sup>®</sup>, tampão da enzima 1X, dNTP 0,2 mM, *primer forward* 0,2  $\mu$ M, *primer reverse* 0,2  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ g de DNA molde, e água milli-Q autoclavada q.s.p. 25  $\mu$ l. O protocolo de amplificação foi realizado como descrito a seguir: desnaturação inicial: 95°C por 3 minutos; ciclo repetido 36 vezes: 95°C por 30 segundos, 57°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e 10 segundos. Extensão final a 72°C por 4 minutos e 20 segundos.

A reação de PCR para confirmação da deleção da ORF da SCR-CP-EM foi realizada utilizando 1 U de Taq DNA polimerase phoneutria<sup>®</sup>, tampão da enzima 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, *primer forward* 0,2  $\mu$ M, *primer reverse* 0,2  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ g de DNA molde e água milli-Q autoclavada q.s.p. 25  $\mu$ l. O protocolo de amplificação foi realizado como descrito a seguir: desnaturação inicial: 94°C por 3 minutos; ciclo repetido 36 vezes: 94°C por 30 segundos, 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto. Extensão final a 72°C por 10 minutos.

As amostras foram guardadas em freezer a -20°C, e os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% (m/v).

### 3.5 Estabilidade mitótica

Os mutantes que não apresentaram a ORF do gene alvo e que apresentaram o marcador de seleção foram analisados quanto a estabilidade mitótica do marcador de seleção, três mutantes  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup> e um mutante  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup> foram inoculados e crescidos em meio BDA não seletivo (sem higromicina) por 10 gerações, após isso os mutantes foram crescidos em meio líquido MEX e tiveram seus DNAs extraídos para confirmação de que não houve a saída do gene *hph* e que não houve recuperação do gene deletado. Um mutante  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup> e um mutante  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup> foram escolhidos para os testes seguintes com os hospedeiros.

### 3.6 Teste de antagonismo em placa contra *S. sclerotiorum*

Para avaliar a capacidade de antagonismo dos mutantes  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup> e  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup> e o isolado parental, foi realizado o teste de confronto contra *S. sclerotiorum*. Para isso, os fungos *T. harzianum* ( $\Delta$ thcfem1<sup>o</sup>,  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup> e isolado parental) e *S. Sclerotiorum* foram previamente crescidos em meio BDA, após a conidiação, foi transferido um disco de 4 mm de diâmetro retirado da placa de *S. sclerotiorum* para a borda de uma nova placa de petri contendo meio BDA, após 2 dias, foi transferido, para a borda oposta desta mesma placa, um disco de 4 mm de diâmetro de *T. harzianum* isolado parental ou de  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup> ou de  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup>. Cada condição foi realizada em triplicata. As placas inoculadas foram incubadas por 14 dias em estufa BOD com fotoperíodo de 8 horas escuro e 16 claro à temperatura de 28°C, após este período as placas foram fotografadas e a área de sobreposição de *T. harzianum* sobre o *S. sclerotiorum* foi analisada de acordo com a escala de BELL (1982) mostrada na Figura 4 e na Tabela 1.

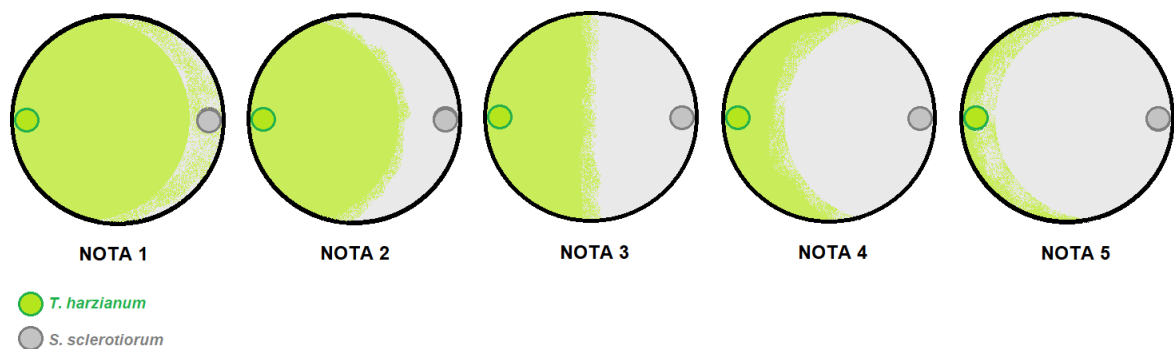


Figura 4 Esquema da escala de Bell para avaliação da habilidade de antagonismo de *Trichoderma* spp. contra fitopatógenos. As notas são atribuídas de acordo com a área que *Trichoderma* spp. consegue crescer na placa contra o fitopatógeno. As notas 1 e 2 classifica *Trichoderma* como muito eficiente no antagonismo, as notas 3, 4 e 5 classificam *Trichoderma* como ineficiente em antagonizar o fitopatógeno.

Tabela 1 Escala de Bell para avaliação de capacidade antagonista de *Trichoderma* spp. contra fungos fitopatogênicos.

Nota	Classificação do Antagonismo	Descrição
	de	

	<i>Trichoderma</i> spp.	
1	Muito eficiente	<i>Trichoderma</i> spp. cresce completamente sobre o patógeno, e cobre 100% da placa.
2	Eficiente	<i>Trichoderma</i> spp. cresce e cobre 66% da placa
3	Ineficiente	<i>Trichoderma</i> spp. e o patógeno crescem e cada um domina 50% da placa, e nenhum organismo parece dominar o outro
4	Ineficiente	O patógeno cobre 66% da placa
5	Muito ineficiente	O patógeno cresce sobre <i>Trichoderma</i> spp. e cobre 100 % da placa

### 3.7 Análise de alterações morfológicas no feijoeiro induzidas por *T. harzianum*

Para analisar se o gene deletado estaria envolvido nas alterações morfológicas no feijoeiro induzidas por *T. harzianum*, foram cultivadas plantas de feijoeiro na presença e na ausência de *T. harzianum* isolado parental e mutantes  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup> e  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup>, as raízes e as folhas destas plantas foram coletadas e digitalizadas para a análise.

#### 3.7.1 Assepsia das sementes

A assepsia das sementes de feijão cultivar pérola foi realizada dentro de fluxo laminar pela imersão em hipoclorito de sódio na concentração de 1% de cloro ativado por 7 minutos, após isso elas foram lavadas 3 vezes com água destilada autoclavada por um minuto.

#### 3.7.2 Obtenção de esporos

Para a obtenção de conídios, a linhagem parental e os mutantes  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup> e  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup> foram inoculadas em seus respectivos erlenmeyer contendo 50 g de arroz parboilizado hidratado com 30 mL de água destilada previamente autoclavado

a 120 °C por 20 minutos. Os frascos foram incubados a 28°C com fotoperíodo de 16 horas claro por 8 horas escuro durante 7 dias. O material dos frascos foi ressuscitado em 100 mL de água destilada autoclavada para a obtenção da suspensão de conídios.

### **3.7.3 Cultivo das plantas em casa de vegetação**

O substrato utilizado para o crescimento das plantas foi o Bioplant Plus®, o substrato foi hidratado conforme a indicação do fabricante e foi dividido para ser autoclavado a 120°C por 50 minutos. Em seguida, o substrato foi colocado em copos plásticos de 500 mL (perfurados no fundo e nos lados para evitar acúmulo de água), as sementes de feijão cultivar pérola foram distribuídas nestes copos, destas 25 não foram inoculadas (condição planta), 25 foram inoculadas com  $10^7$  conídios de *T. harzianum* linhagem parental (condição planta + isolado parental), 25 foram inoculadas com  $10^7$  conídios do mutante  $\Delta thcfem 1^\circ$  (condição planta +  $\Delta thcfem 1^\circ$ ); e 25 plantas inoculadas com  $10^7$  conídios do mutante  $\Delta thcfem 2^\circ$  (condição planta +  $\Delta thcfem 2^\circ$ ). As plantas foram colocadas em casa de vegetação regadas diariamente durante 14 dias. Após este período, 15 plantas de cada condição foram coletadas aleatoriamente e tiveram suas raízes lavadas e digitalizadas utilizando o scanner Epson Expression 12000XL com um fundo preto para contrastar com as raízes. As folhas também foram coletadas e digitalizadas usando o scanner Epson Expression 12000XL com um fundo branco, e utilizadas para o teste de suscetibilidade ao patógeno *S. Sclerotiorum*.

A análise morfológica das raízes digitalizadas foi realizada com o software WinRhizo® 2008, e a das folhas digitalizadas foi realizada com o ImageJ®. A média dos grupos foi comparada estatisticamente usando o Teste T bicaudal não pareado entre cada grupo separadamente.

### **3.7.4 Teste de suscetibilidade**

O teste de suscetibilidade a *S. sclerotiorum* foi realizado utilizando a metodologia de folha destacada (adaptado de PETTITT *et al.*, 2011). 15 folhas destacadas das plantas crescidas em cada condição (planta, planta + isolado parental, planta +  $\Delta thcfem 1^\circ$  e planta +  $\Delta thcfem 2^\circ$ ) foram colocadas em formas



esterilizadas forrada com papel filtro umedecido com água autoclavada, cada forma continha apenas as folhas correspondentes a cada condição. Em cada folha foi feito 3 pequenas lesões utilizando palitos de dente, em seguida um disco da cultura de *S. Sclerotiorum* foi colocada sobre cada lesão. Após sete dias as imagens foram digitalizadas para comparação da área infectada pelo software ImageJ®.

### **3.8 Análise da expressão de genes de defesa das raízes de feijoeiro e análise de colonização das raízes**

Para analisar a eficiência de colonização das raízes por *T. harzianum* e analisar as diferenças na expressão de genes de defesa das raízes de feijoeiro, plantas de feijoeiro foram cultivadas em sistema de hidroponia, cada condição continha 10 plantas. As condições foram: plantas crescidas na presença de *T. harzianum* isolado parental, plantas crescidas na presença de *T. harzianum*  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup>, plantas crescidas na presença de *T. harzianum*  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup> e plantas não inoculadas. As raízes foram coletadas e, para cada condição, 5 raízes foram reservadas para análise do teste de colonização e 5 raízes reservadas para extração de RNA e análise da expressão gênica.

#### **3.8.1 Cultivo em sistema hidropônico.**

A assepsia das sementes de feijão cultivar pérola foi realizada dentro de fluxo laminar pela imersão em hipoclorito de sódio na concentração de 1% de cloro ativado por 7 minutos, após isso elas foram lavadas 3 vezes com água destilada autoclavada por um minuto. As sementes foram então transferidas para placas de petri contendo ágar-água 2% (m/v) e estas incubadas em estufa BOD a 28°C por 3 dias, com fotoperíodo de 16 horas claro por 8 horas escuro.

Após a germinação, as sementes que possuíam raízes de aproximadamente 3 cm foram transferidas para um sistema de hidroponia semelhante ao descrito por YEDIDIA *et al.* (1999) e por DJONOVIC *et al.* (2006). Este sistema consiste em tubos cônicos de 50 mL com o fundo cortado colocados em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio Murashige and Skoog (MS) acrescido de vitaminas

Gamborg (100 mg/L mio-inositol, 1 mg/L ácido nicotínico, 1 mg/L cloridrato de piridoxina, 10 mg/L cloridrato de tiamina), selados com papel filme. As plantas ficaram neste sistema por 4 dias dentro de incubadora BOD (28°C, com fotoperíodo de 16 horas claro por 8 horas escuro), após esse período o meio foi trocado por um novo meio MS acrescido de vitaminas Gamborg e 0,05% de sacarose (m/v), e neste momento foi inoculado  $10^7$  conídios de *T. harzianum* isolado parental nas 10 plantas da condição “planta + isolado parental”,  $10^7$  conídios do mutante  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup> nas 10 plantas da condição “planta +  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup>” e  $10^7$  conídios do mutante  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup> nas 10 plantas da condição “planta +  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup>”, as outras 10 plantas não foram inoculadas para servirem de controle na condição “planta”. As plantas de todas condições foram incubadas por mais 48h. Após isto, as plantas tiveram suas raízes coletadas e cada condição foi dividida em dois grupos com 5 plantas, as raízes destas 5 plantas foram lavadas para retirar o excesso de fungo e unidas, um grupo foi congelada em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C para posterior extração de RNA e o outro grupo foi utilizado para a análise de colonização. As plantas reunidas em cada grupo formaram a amostra composta correspondente a uma réplica biológica. Este ensaio foi repetido 3 vezes.

### **3.8.2 Análise de colonização de raízes**

Após a lavagem, as raízes tiveram sua superfície esterilizada com a imersão em água sanitária na concentração de 1% de cloro ativado por 3 minutos depois foram lavadas 3 vezes com água autoclavada. Após isso, para cada condição, as raízes foram pesadas e 3 g delas foram colocadas em cadinhos com 15 ml de água autoclavada e foram maceradas, 1 ml desta mistura foi inoculado em meio BDA com 0,1% de Triton X100. Após 48 horas as colônias foram contadas para determinar a taxa de colonização. O experimento foi repetido 3 vezes (Protocolo adaptado a partir de LAMDAN *et al.* (2015))

### **3.8.3 Análise da expressão de genes de defesa do feijoeiro por PCR em tempo real**

#### **3.8.3.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA**

A extração de RNA das plantas das réplicas biológicas foi realizada utilizando o kit PureLink™ RNA mini kit (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. O RNA

extraído foi concentrado por precipitação com etanol com acetato de sódio 3M, e ressuspendidas em 20 µL de água ultrapura. A integridade dos RNAs foi analisada em gel de agarose 1% (m/v). Os RNAs concentrados foram quantificados e avaliados em NanoDrop (Thermo scientific); as amostras que apresentaram razões 260/280 nm e 260/230 nm maiores que 2,00 foram utilizadas para as próximas etapas.

As amostras de RNA foram tratadas com TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen) para eliminar traços de DNA genômico, em seguida 5 µg do RNA foram utilizados para realizar a síntese do cDNA utilizando o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), após a síntese do cDNA, foi adicionado à amostra RNase H fornecida pelo kit. O cDNA foi diluído em 80 µL de água Milli-Q para ser utilizado nas reações de PCR quantitativo em tempo real.

### 3.8.3.2 PCR quantitativo em tempo real

Cada reação de PCR quantitativo continha 1 µL de *primer forward* 100 µM e 1 µL de *primer reverse* 100 µM (informações complementares), 6 µL de MAXIMA® SYBR-green PCR Master mix Kit (Invitrogen), 4 µL de água ultrapura e 4 µL do cDNA. Cada reação foi realizada em triplicata.

Os ciclos programados no termociclador foram: 95°C por 10 minutos (1 vez), 95°C por 15 segundos seguido 60°C por 1 minuto (ciclo repetido 40 vezes); a curva de *Melting* consistiu em 95°C por 10 segundos, 60°C por 1 minuto e 90°C por 10 segundos para finalizar. Os dados foram coletados continuamente através do software Step One Plus™ real-time PCR System da Applied Biosystems®.

Os *primers* usados para estas reações correspondem aos seguintes genes do feijoeiro: β-1,3-Glucanase (Glu), Fenilalanina amônia liase (PAL), Lipoxigenase 1 (Lox), Peroxidase (Per) Quitinase 1 (Chit); além desses genes relacionados à defesa do feijoeiro, o gene da β-actina (Act) também foi utilizado como controle endógeno para normalizar a quantidade de cDNA em cada amostra (informações complementares).

Os níveis de expressão dos genes foram calculados de acordo com o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

## 4. Resultados

### 4.1 Análise in-silico

A serina peptidase 747596 (Figura 5) é uma proteína grande com 637 aminoácidos. A anotação dela prevê o peptídeo sinal para secreção, um domínio de ativação e o domínio da família das serina peptidases S8/S53.

```
MKISLIVLNGLLAGAMA VPTGSQVVHEKRDTNNARWIKREAVDPNTKVPVRIALKQSNLDKGMDYLLD  
VSHPESSNYGNHYTADQVVDLDFAPSDESINSVKSWLVKSGVPASSITASKSKGWLSFTTTSGQLESL  
HTSFSTYDHVDARNVHIGTDEYSLPKEISQHVDFITPGVVVFAPVKTSAKKEKRGHKSIRRASKPLPAHIA  
QILANPRATSTCGSAITPQCIKSMYNITAGTSAISSNALGVFEVEDTYAQQDLTQFWKSFATNIPSTTG  
PKVDGIDGAKAPTSPINAGGESDLDFEIAIPIYPQTTVLYQSSVKNDDIFNTFLDAIDGSYCTFSDDGET  
GDDPTVDGTTTRNEQCGAFTPTNVISFSYGTAEADYPTYYLQRQCDEFMKLGLQGTSIVFASGDDGVA  
RRSGPCLGSKRNIFTPEGEPASCPYVTSVGATTLPSGSPGDEETAVTSFSSGGGFSNIWTTTPSYQAS  
AVAAVFASHDPGYASYNTSAGVIPTTGGIYNKAGRGYPDVSAVGDNGVVNDEEQVLEGGTSMATPL  
FAGILTRINEERITAGKSPIGFANPALYANPAMFNDITVGNQAKGGPNGDSGASACGNKGFSAVAGWD  
PVTGLGTPNYPALLEYFLGLP*
```

Figura 5 Sequência de aminoácidos da serina peptidase 747596. A proteína apresenta peptídeo sinal (em azul claro); o domínio de ativação de peptidase S53 (em cinza) e o domínio da superfamília das peptidases S8/S53 (em roxo). Dados do InterproSCAN.

O script criado para identificar proteínas SCRP resultou na identificação de 182 proteínas secretadas SCRP putativas no genoma de *T. harzianum* (anexo 1). Destas, 37 possuem pelo menos um dos dois motivos de translocação putativo de proteínas efetoras RxLR-like ou Y/W/F/xC. A maioria destas proteínas não está anotada, e as principais categorias encontradas foram: beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase (10 proteínas), Killer toxin, Kp4/SMK-like (6 proteínas), proteínas com domínio CFEM (5 proteínas) e Hidrofobinas (5 proteínas).

A proteína escolhida SCRP-CFEM 779733 possui 197 aminoácidos e contém peptídeo sinal de secreção e um motivo putativo de translocação YVC dentro do domínio CFEM; esta proteína também apresenta uma região de desordem intrínseca (Figura 6).

```
MKAAFVAVALAALAQAQTRADI PSCALPCLDDAVKANTKCSTTDYVVCICKDFNAVQGAATGCVVEKC  
GTDVAINKVLPATQALCA ANSGSGSSSGSGSSSAANTTPAQQTTSAAQSSSAQSSSAQSSVASAPP  
SSAPAQTTSAAQTTPVVPVGTGTGVPPPAGNKTTTGAPTAP TNGASTILPGLAFIAALCAFAL*
```

Figura 6 Sequência de aminoácidos da SCRP-CFEM 779733. A proteína apresenta peptídeo sinal (em azul claro), o domínio CFEM (em verde) uma região de desordem intrínseca (amarelo). Dados do Interpro SCAN. E o motivo de translocação YVC (destacado) inferido pelo nosso Script

A página da proteína SCRP-CFEM 779733 no JGI coloca ela como pertencente ao ortogrupo KOG1878, este grupo está relacionado com a transcrição

e é descrito como “co-regulador de receptores nucleares SMRT/SMRTER, contendo domínio Myb-like”.

#### 4.2 Obtenção dos mutantes

As sequências utilizadas para a montagem do cassete de seleção foram amplificadas com sucesso: foram obtidos os produtos com o tamanho esperado para o gene *hph* (1432 pb), para a sequência flanqueadora pelo lado 5' do gene da serina peptidase (1218 pb), para a sequência flanqueadora pelo lado 3' do gene da serina peptidase (1210 pb), para a sequência flanqueadora pelo lado 5' do gene da SCR-PCFEM (1100 pb), e para a sequência flanqueadora pelo lado 3' do gene da SCR-PCFEM (844 pb) (Figura 7).

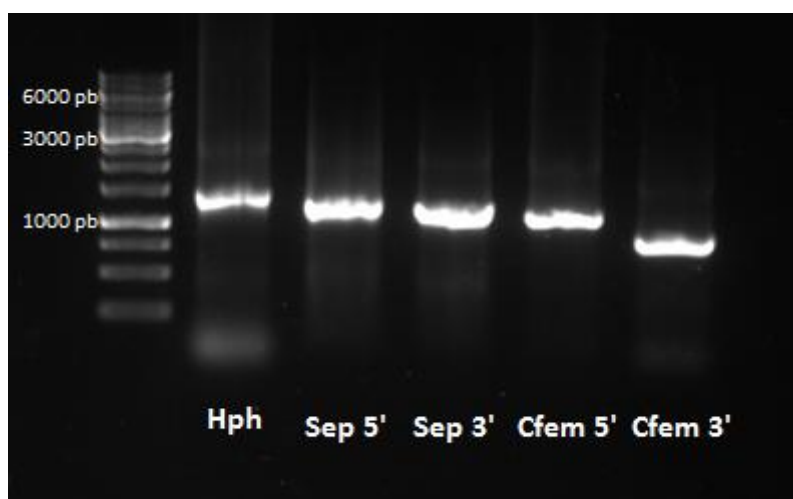


Figura 7. Verificação da amplificação do gene de seleção e das regiões flanqueadoras dos genes Serina peptidase 747596 e SCR-PCFEM 779733 por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v). Hph: Hygromycin B phosphotransferase - gene de resistência a higromicina. Sep 5': sequência flanqueadora pelo lado 5' do gene Serina peptidase; Sep 3': sequência flanqueadora pelo lado 3' do gene Serina peptidase; Cfem 5': sequência flanqueadora pelo lado 5' do gene SCR-PCFEM. Cfem 3': sequência flanqueadora pelo lado 3' do gene SCR-PCFEM

Com essas sequências amplificadas e o vetor foi possível transformar e reverter a auxotrofia da linhagem SC-9721 de *S. cerevisiae*, indicando que os fragmentos foram unidos ao plasmídeo formando os cassetes de deleção. Para o cassete de deleção  $\Delta$ thsep, 2 dos 4 quadrantes com leveduras transformadas amplificaram o cassete de deleção que continha 3860 pares de base. Para o cassete de deleção  $\Delta$ thcfem, 3 dos 4 quadrantes com leveduras transformadas amplificaram o cassete que continha 3376 pares de base (Figura 8)

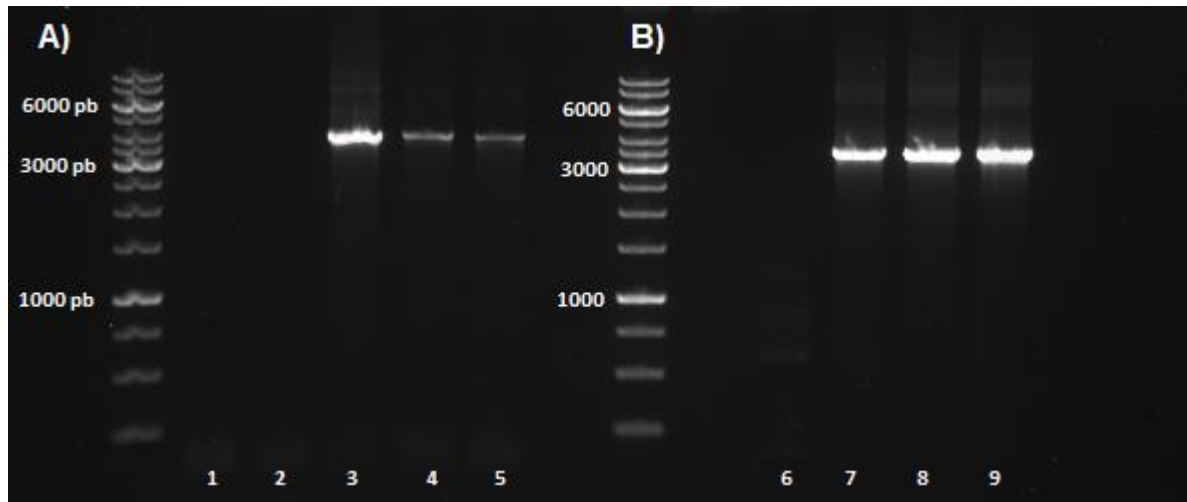


Figura 8. Confirmação, em gel de agarose 1% (m/v), da montagem dos cassetes de deleção através de amplificação por PCR com o DNA das *S. cerevisiae* transformadas. A) PCRs para o cassete de deleção da serina peptidase ( $\Delta$ thsep), os poços 4 e 5 são duplicatas da mesma amostra. B) PCRs para amplificação do cassete de deleção da SCRPF-CFEM ( $\Delta$ thcfem).

Foram obtidos 20 transformantes de *T. harzianum* no primeiro evento de transformação dos protoplastos para a geração dos mutantes  $\Delta$ thsep ( $\Delta$ thsep 1<sup>o</sup>), e 16 transformantes do segundo evento de transformação ( $\Delta$ thsep 2<sup>o</sup>). O DNA genômico de todos os transformantes de *T. harzianum*  $\Delta$ thsep dos dois eventos de transformantes apresentaram a ORF da serina peptidase, apesar de serem resistentes à higromicina (Figura 9).

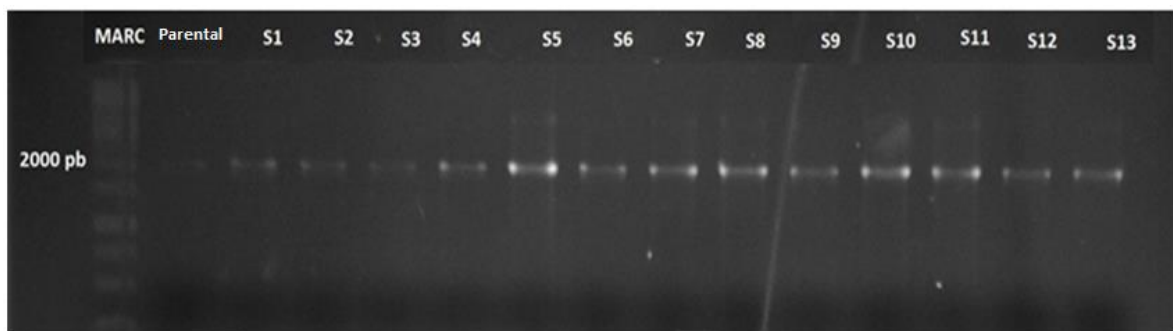


Figura 9 Verificação da deleção do gene da Serina peptidase em gel de agarose 1% (m/v) com o resultado da amplificação da ORF no isolado parental (parental) e nos mutantes  $\Delta$ thsep 1<sup>o</sup> (S1 a S13). MARC: marcador GeneRuler™ 1 kb DNA ladder

Foram obtidos doze transformantes do primeiro evento de transformação dos protoplastos para a geração dos mutantes  $\Delta$ thcfem ( $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup>), e cinco transformantes do segundo evento de transformação ( $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup>) (resultado não mostrado).

O DNA genômico de três transformantes  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup> e um transformante  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup> não apresentaram a banda correspondente à amplificação da ORF da SCR-PCFEM e apresentaram o gene de seleção hph (Figura 10), após o teste de estabilidade mitótica estes mesmos mutantes continuaram com o gene de seleção integrado no genoma.

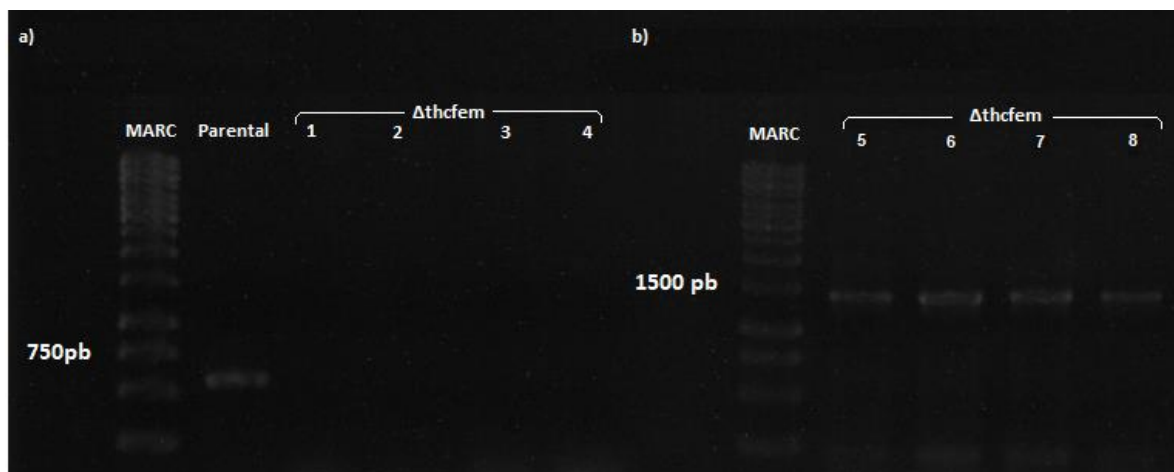


Figura 10 Verificação em gel de agarose 1% (m/v) da deleção da ORF SCR-PCFEM e da inserção do gene de seleção hph. a) Resultados da PCR para amplificar a ORF SCR-PCFEM dos mutantes estáveis  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup> (1,2 e 3),  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup> (4) e no isolado parental (parental) comprovando a deleção nos mutantes. b) Resultados da amplificação da ORF do gene de resistência a higromicina (hph) nos mutantes estáveis  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup> (5,6 e 7) e  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup> (8) comprovando a persistência do marcador de seleção nos mesmos mutantes. MARC: marcador GeneRuler™ 1 kb DNA ladder.

Os mutantes  $\Delta$ thcfem quando crescidos em meio BDA se mostraram bastante parecidos com o isolado parental, porém ambos mutantes esporularam menos (Figura 11).



Figura 11 Morfologia do isolado parental (*T. harzianum* TR274) e dos mutantes nocauteados para o gene SCR-PCFEM 779733 ( $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup> e  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup>), quando crescidos em meio BDA por 7 dias a 28°C.



#### 4.3 Interação dos mutantes $\Delta$ thcfem e do isolado parental com *S. sclerotiorum*

Os mutantes  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup> e  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup> colonizaram o micélio do fitopatógeno *S. sclerotiorum* crescendo sobre ele assim como o isolado parental (Figura 12). Todos sendo avaliados, portanto, com a nota 1 na escala de Bell e classificados como antagonistas eficientes. Embora tenham sido classificados com nota 1, pode-se observar que os mutantes apresentaram uma área menor de esporulação sobre o patógeno (Figura 12).

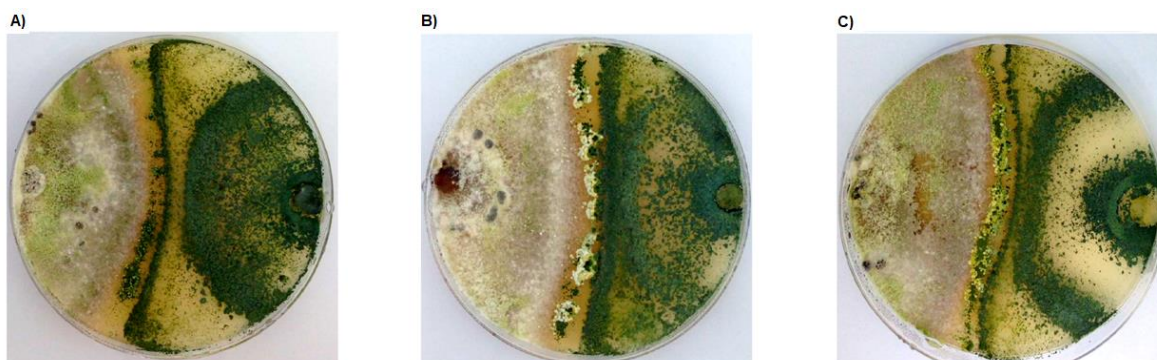


Figura 12. Teste de confronto entre *T. harzianum* e *S. Sclerotiorum*. O isolado parental (A) e os mutantes  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup> (B) e  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup> (C) aparecem do lado direito e conseguem crescer sobre o fitopatógeno (lado esquerdo) em 100% de sua área (nota 1 na escala de Bell). O experimento foi feito em triplicata para cada isolado, e todos eles classificados com a mesma nota.

#### 4.4 Interação dos mutantes $\Delta$ thcfem e do isolado parental com *P. vulgaris*

Não foi observada diferença estatística nos valores de área foliar e volume das raízes entre as plantas cultivadas na presença do isolado parental e dos mutantes  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup> e  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup> (Figura 13 A e C). Porém foi observada diferença no tamanho total das raízes, as plantas tratadas com o isolado parental apresentaram raiz total 127 cm maior do que as tratadas com o  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup>, 235 cm maior que as tratadas com  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup> e 248 cm maior que as plantas sem tratamento (Figura 13 B).

Além disto, as plantas tratadas com o isolado parental apresentam um diâmetro médio de raiz menor (Figura 13 D), o diâmetro médio delas é 0,05 mm



menor do que o diâmetro médio das plantas tratadas com os ambos mutantes e 0,03 mm menor do que o das plantas não tratadas.

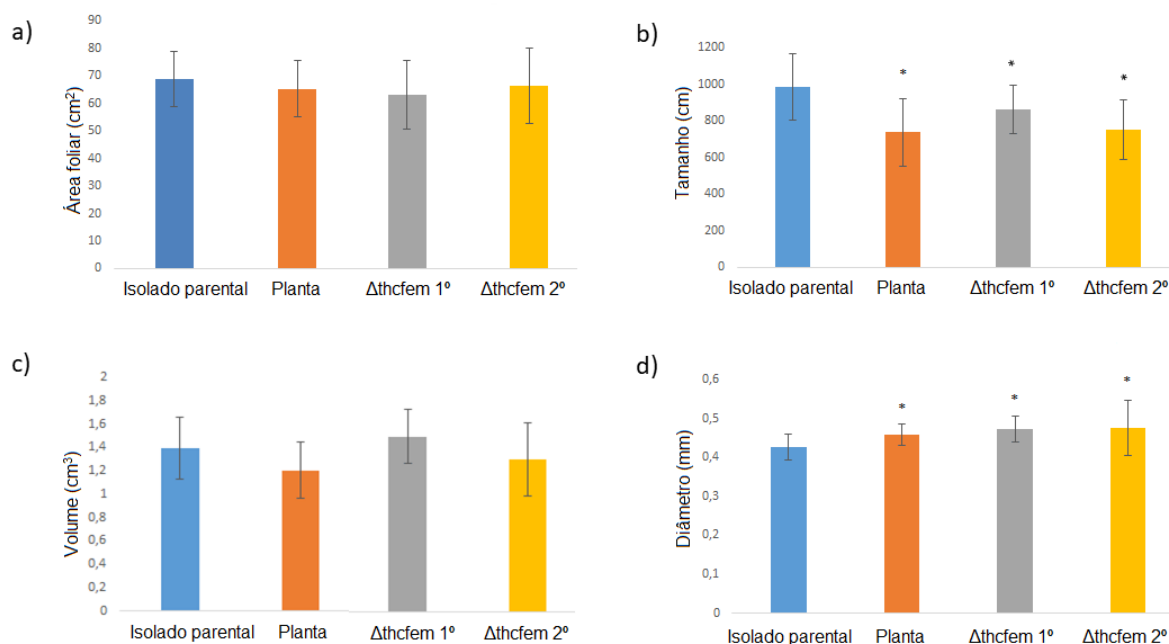


Figura 13 Análise dos dados morfológicos das plantas de feijoeiro não tratadas (Planta), das inoculadas como isolado parental (isolado parental), das inoculadas com o mutante  $\Delta thcfem 1^\circ$  ( $\Delta thcfem 1^\circ$ ) e das inoculadas com  $\Delta thcfem 2^\circ$  ( $\Delta thcfem 2^\circ$ ) a) área foliar média. b) Tamanho total médio das raízes c) Volume médio das raízes e d) Diâmetro médio das raízes. Os asteriscos (\*) representam  $p < 0,5$  no teste T em relação ao selvagem; as linhas verticais indicam o desvio padrão.

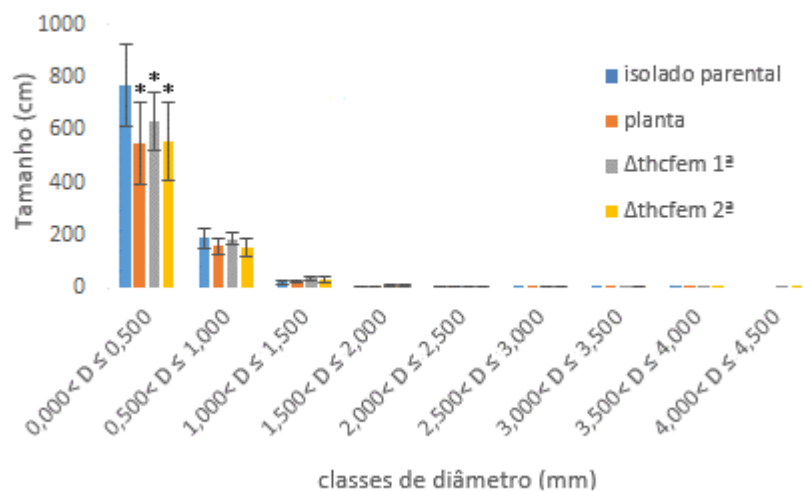
A diferença de tamanho entre os grupos também é observada na distribuição das raízes em classes de diâmetro (Figura 14 A). As raízes com diâmetro de até 0,5 mm apresentam tamanho maior nas plantas tratadas com o isolado parental, elas são cerca de 220 cm maiores em tamanho do que nas plantas sem tratamento e nas plantas tratadas com  $\Delta thcfem 2^\circ$ , e 140 cm maiores que as tratadas com  $\Delta thcfem 1^\circ$ .

Apesar do volume total não ter apresentado diferença estatística entre os grupos, foi observada diferença estatística no volume quando as raízes são divididas em classes de diâmetro (Figura 14 B). As raízes com diâmetro de até 0,5 mm apresentam volume maior nas plantas tratadas com o isolado parental, em decorrência do aumento do tamanho como citado anteriormente, elas são cerca de 0,13 cm<sup>3</sup> maiores do que nas plantas sem tratamento e nas plantas tratadas com  $\Delta thcfem 2^\circ$ , e 0,09 cm<sup>3</sup> maiores que as tratadas com  $\Delta thcfem 1^\circ$ .

Nas raízes com diâmetro entre 1,0 e 1,5 mm as raízes são maiores nas plantas tratadas com mutantes; elas ocupam 0,16 cm<sup>3</sup> a mais nas tratadas com

$\Delta thcfem 1^{\circ}$  do que nas tratadas com o isolado parental, e ocupam  $0,8 \text{ cm}^3$  a mais nas tratadas com  $\Delta thcfem 2^{\circ}$  do que nas tratadas com o parental. Nas raízes com diâmetro entre 1,5 e 2,0 mm, as plantas tratadas com ambos mutantes ocuparam cerca de  $0,075 \text{ cm}^3$  a mais do que as tratadas com o parental (Figura 14).

a)



b)

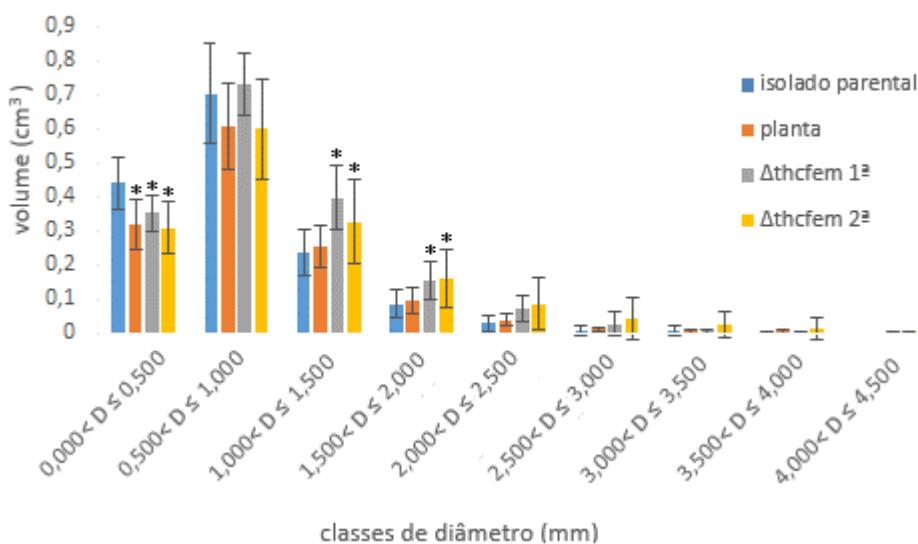


Figura 14 Dados morfológicos divididos nas classes de diâmetro das raízes das plantas de feijoeiro sem inóculo (Planta), inoculadas como isolado parental (isolado parental), inoculadas com o mutante  $\Delta thcfem 1^{\circ}$  ( $\Delta thcfem 1^{\circ}$ ) e inoculadas com  $\Delta thcfem 2^{\circ}$  ( $\Delta thcfem 2^{\circ}$ ) a) Distribuição do tamanho da raiz em classes de diâmetro das raízes. b) distribuição do volume das raízes em cada classe de diâmetro. Os asteriscos (\*) representam  $p < 0,5$  no teste T em relação ao selvagem e as linhas verticais indicam o desvio padrão.

Não foi possível observar a suscetibilidade de feijoeiro a *S. sclerotiorum* no teste de folhas destacadas, pois durante o experimento as folhas desenvolveram clorose antes do aparecimento dos sintomas do mofo branco (Figura 15).



Figura 15. Clorose das folhas utilizadas no experimento de suscetibilidade ao mofo branco.

A análise de colonização das raízes por contagem de colônias também foi mal sucedida, pois na maioria das placas cresceu apenas uma colônia ou nenhuma de *Trichoderma harzianum*, além de que apareceram colônias com morfologia de outras espécies de fungos e bactérias.

#### **4.4.1 Análise da expressão dos genes de defesa do feijoeiro na interação com os mutantes $\Delta thcfem$ e com o isolado parental**

Os mutantes ativaram os genes de defesa do feijoeiro com um padrão bastante semelhante aos ativados pelo isolado parental apesar de diferirem na intensidade da ativação (Figura 16).

Quando comparadas com as plantas controle, as plantas inoculadas com o isolado parental apresentaram um aumento de 2 vezes a transcrição do gene glucanase, e aumento de 1,6 e 1,09 para os mutantes  $\Delta thcfem$  1<sup>o</sup> e  $\Delta thcfem$ , respectivamente.

Para o gene da lipoxigenase, as plantas inoculadas com o isolado parental aumentaram em 0,5 o nível de transcrição. Já as inoculadas com o  $\Delta thcfem$  1<sup>o</sup>

quase não alteraram a transcrição deste gene aumentando os transcritos em apenas 0,055 e o  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup> aumentou a transcrição em 0,74 vezes.

Os transcritos de peroxidase diminuíram 0,21 vez nas plantas com o isolado parental, diminuíram 0,52 nas que interagiram com o mutante  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup> e 0,83 nas que interagiram com o  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup>

Os transcritos da Quitinase aumentaram 3,2 vezes na interação com o isolado parental, enquanto na interação com o  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup> eles aumentaram 5,9 vezes, e na interação com  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup> aumentaram 1,75 vez

Os transcritos da fenilalanina amônia liase aumentaram 2,38 vezes nas plantas com o isolado parental e aumentaram 4 vezes nas plantas com o  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup> e 1,775 vez nas plantas com  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup>.

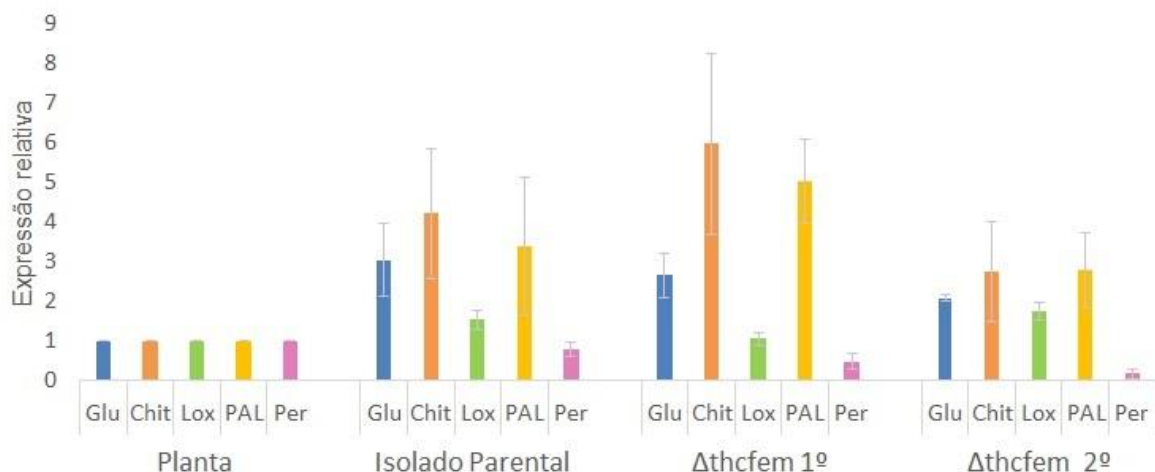


Figura 16 Expressão relativa dos genes  $\beta$ -1,3-Glucanase (Glu), Fenilalanina amônia liase (PAL), Lipoxigenase 1 (Lox), Peroxidase (Per) e Quitinase 1 (Chit) nas plantas não inoculadas (planta), nas plantas inoculadas com o isolado parental (Isolado parental), nas inoculadas com o  $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup> ( $\Delta$ thcfem 1<sup>o</sup>) e nas inoculadas com o  $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup> ( $\Delta$ thcfem 2<sup>o</sup>); os genes dos tratamentos foram normalizados pelos dados de expressão de  $\beta$ -actina de cada tratamento e os dados são relativos à expressão desses mesmos genes na condição planta (plantas crescidas sem nenhum isolado). As linhas verticais representam o erro padrão.

## 5. Discussão

Usualmente o método de deleção por recombinação homóloga não é considerado efetivo em fungos filamentosos, ele depende do tamanho das sequências homólogas no cassete de deleção e também varia muito dependendo do loci alvo no genoma. Em *Trichoderma reesei* a recombinação homóloga usualmente não excede a frequência de 15% (BISCHOF; SEIBOTH, 2014). Fungos filamentosos usam preferencialmente a via de recombinação não-homóloga (NHEJ) para integrar o DNA. Uma estratégia que já é utilizada para aumentar a taxa de recombinação homóloga em *T. reesei* consiste em utilizar uma linhagem que tem genes chaves (tku70 e tmus53) da via NHEJ deletados. A desvantagem em utilizar linhagens nocauteadas para esses genes é que elas são mais sensíveis a danos no DNA, tem menor estabilidade genômica e possuem expressão de alguns genes alterada (SCHUSTER *et al.*, 2012), levando estes fatores em conta a utilização de uma linhagem de *T. harzianum* nocauteados para os genes da via NHEJ não seria a mais recomendada para a análise de interação com hospedeiros.

A dificuldade para a deleção do gene serina peptidase através de recombinação homóloga pode ser devido a diferença entre o tamanho do gene a ser deletado e o do gene de seleção a ser inserido. Como mostrado na Figura 17, a região de deleção que contém a ORF da serina peptidase é bem maior (2561 pb) que a região do gene hph (1432 pb), como essas duas regiões não são homólogas, é necessário que o gene da SEP faça uma alça para que ambas as extremidades pareiem com suas regiões homólogas do cassete. Minha hipótese é de que a probabilidade da alça se formar no cromossomo pode ser baixa, visto que neste caso o DNA está associado a proteínas da cromatina. Se este for a causa da dificuldade em obter o mutante  $\Delta$ thsep uma possibilidade seria repetir a técnica de recombinação homóloga porém com os *primers* desenhados para eliminarem apenas uma parte da proteína truncando-a.

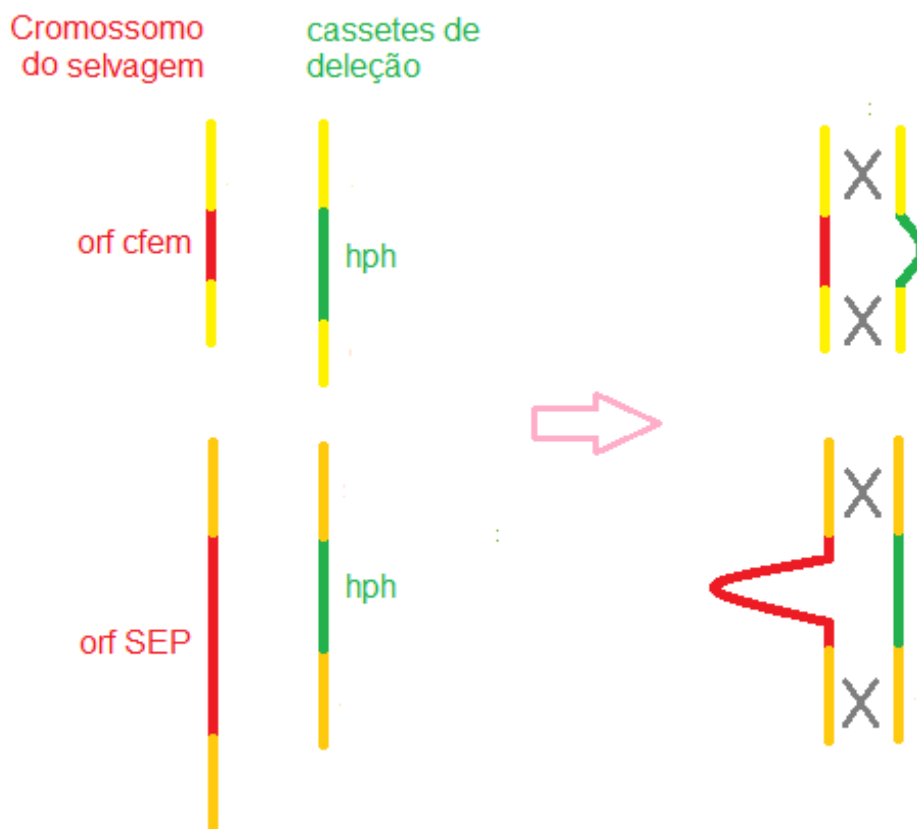


Figura 17. Representação esquemática dos emparelhamentos que devem ocorrer para que o cromossomo troque sua região pela do cassete de deleção. As regiões homólogas são mostradas em amarelo. Para a deleção do gene SCRPF-CFEM (orf cfem)

Os mutantes  $\Delta$ thcfem esporulam menos em meio BDA e sobre o fitopatógeno, este fenótipo pode ser devido a perda do gene SCRPF-CFEM ou pode ser um efeito colateral do processo de transformação dos protoplastos ou como resultado da seleção exercida pela higromicina sobre os isolados. Independentemente do motivo que causou este fenótipo, a diminuição da conidiação dos mutantes  $\Delta$ thcfem não afetou a capacidade deles em antagonizar contra *S. sclerotiorum*.

A diferença na intensidade da ativação dos genes analisados (PAL, Lox, Glu, Chit e Per) não pode ser atribuída à SCRPF-CFEM conclusivamente, pois  $\Delta$ thcfem<sup>1º</sup> ativou os genes de maneira mais intensa que o isolado parental mas  $\Delta$ thcfem<sup>2º</sup> ativou de maneira mais branda que o isolado parental.

O fenótipo em que ambos mutantes concordaram foi na alteração da morfologia das raízes do feijoeiro. Na presença dos mutantes  $\Delta$ thcfem, as raízes

apresentaram menos fios com diâmetro de até 0,5 mm, portanto a proteína SCRP-CFEM pode estar relacionada ao aparecimento de raízes secundárias mais finas.

A explicação para que os mutantes  $\Delta thcfem$  alterem o tamanho total das raízes mas não o volume total decorre de uma compensação exercida pelas raízes de maior diâmetro. Apesar das plantas tratadas com o isolado parental possuírem tamanho maior nas raízes com diâmetro até 0,5 mm elas possuem tamanho menor nas raízes com diâmetro de 1,0 a 2,0 mm. A diferença no tamanho das raízes de 1,0 a 2,0 mm de diâmetro é pequena porém elas contribuem mais para o volume do que as raízes de até 0,5 mm de diâmetro. Por exemplo, enquanto as plantas tratadas com o isolado parental são 140 cm maiores na classe de até 0,5 mm do que nas plantas tratadas com  $\Delta thcfem$  1<sup>o</sup>, estes 140 cm contribuem apenas para 0,09 cm<sup>3</sup> do volume, já na classe entre 1,0 e 1,5 mm as raízes tratadas com  $\Delta thcfem$  1<sup>o</sup> apresentam apenas 15 cm a mais que as tratadas com o isolado parental, porém esses 15 cm contribuem com 0,16 cm<sup>3</sup> para o volume. A anotação da proteína SCRP-CFEM pode indicar uma explicação de como ela pode alterar a morfologia das raízes. O ortogrupo (co-regulador de receptores nucleares SMRT/SMRTER, contendo domínio Myb-like) ao qual ela pertence não possui nenhuma outra proteína com o domínio CFEM.

É importante salientar que o KOG (EuKaryotic Orthologous Groups) é uma ferramenta que identifica grupos de genes parálogos e ortólogos. O domínio Myb-like não foi identificado na SCRP-CFEM 779733, mas sim em outros genes que estão no mesmo ortogrupo que ela.

A região de desordem intrínseca confere flexibilidade conformacional, podendo passar de um estado desorganizado para um estado organizado quando encontra o a molécula parceira com quem ela interage (AHRENS; NUNEZ-CASTILLA; SILTBERG-LIBERLES, 2017). Esta região poderia ser responsável por interagir com outras proteínas da planta sinalizando que ela deveria formar as raízes de menor calibre.

Uma escolha mais criteriosa para analisar qual a diferença em nível transcricional promovida pela SCRP-CFEM seria as vias de sinalização mediada por etileno e auxinas (DE PALMA *et al.*, 2019) ou então genes envolvidos com o balanço redox, pois estas vias já foram relacionadas com o aparecimento de fios absortivos

(CAROL; DOLAN, 2006). DE PALMA et al. (2019) mostrou *T. harzianum* T22 modula a transcrição de *SIMYB93* nas raízes de tomateiro e sugeriu que este pode ser o motivo dos efeitos que este isolado provoca na arquitetura das raízes, pois este gene *SIMYB93* é similar ao regulador negativo de desenvolvimento de raízes laterais induzido por auxina *AtMYB93* de *Arabidopsis thaliana* (GIBBS et al., 2014).

Interessante notar que esses genes endógenos de plantas contém o domínio Myb, talvez a *SCR-CP* 779733 consiga modular o desenvolvimento de raízes laterais mimetizando, através da sua região de desordem intrínseca, o domínio Myb de um gene ortólogo ao *AtMYB93* no feijoeiro.



## 6. Conclusão

*Trichoderma harzianum* provoca vários efeitos benéficos nas plantas hospedeiras desde a indução de resposta de defesa até a promoção de crescimento, estes efeitos são mediados por hormônios liberados pelo fungo e também por proteínas, neste trabalho lançamos um novo olhar para o papel de proteínas com o domínio CFEM: a importância da proteína SCR-PCFEM no aparecimento de raízes secundárias que ainda não tinha sido descrito.

### Perspectivas

- Analisar por PCR se a ORF do gene SCR-PCFEM ficou ancorada no gene hph, com *primers* que amplifiquem desde a região que está antes dos 1000 pb de homologia até a extremidade direita do gene hph, e, para verificar se ficou ancorado na outra ponta do gene, utilizar *primers* que amplifiquem desde a extremidade esquerda do gene hph até a região após os 1000 pb de homologia.
- Repetir os experimentos em casa de vegetação para corroborar os resultados do presente trabalho;
- Investigar a expressão diferencial de genes que já são reconhecidos como importantes para a morfogênese de raízes e outros relacionados à defesa de plantas;
- Analisar por microscopia eletrônica de varredura a interação da planta com os mutantes e *S. sclerotiorum*;
- Analisar a capacidade de colonização das raízes através de RTqPCR para genes específicos de *Trichoderma*;
- Fazer o teste de suscetibilidade de feijoeiro a mofo branca em testes de campo ou em folhas destacadas utilizando ácido giberélico para prevenir senescência;
- Verificar *in-silico* se a fusão da SCR-PCFEM 779733 com GFP mudaria a conformação da proteína através do  $\Delta G$  predito, e caso não afete complementar os mutantes nocauteados com o gene SCR-PCFEM 779733

fusionado com GFP e repetir os experimentos para analisar se o fenótipo é recuperado.

## 7. Referências bibliográficas

AGRIOS, G. N. *Plant pathology*. [S.l.]: Elsevier Academic Press, 2005.

AHRENS, J. B.; NUNEZ-CASTILLA, J.; SILTBERG-LIBERLES, J. Evolution of intrinsic disorder in eukaryotic proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 74, n. 17, p. 3163–3174, 8 set. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28597295>>. Acesso em: 13 jan. 2019.

ALTOMARE, C. *et al.* Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* rifai 1295-22. *Applied and environmental microbiology*, v. 65, n. 7, p. 2926–33, jul. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10388685>>. Acesso em: 25 mar. 2019.

BELL, D. K. In Vitro Antagonism of *Trichoderma* species Against Six Fungal Plant Pathogens. *Phytopathology*, v. 72, n. 4, p. 379, 1982. Disponível em: <[http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Abstracts/Phyto72\\_379.htm](http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Abstracts/Phyto72_379.htm)>. Acesso em: 28 dez. 2018.

BENÍTEZ, T. *et al.* Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, v. 7, n. 4, p. 249–60, dez. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15666245>>. Acesso em: 1 fev. 2019.

BISCHOF, R.; SEIBOTH, B. Molecular Tools for Strain Improvement of *Trichoderma* spp. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. [S.l: s.n.], 2014. p. 179–191.

BISSETT, J. *et al.* Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA fungus*, v. 6, n. 2, p. 263–95, dez. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26734542>>. Acesso em: 19 mar. 2019.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*, v. 7, n. 1, p. 1–16, 1 jan. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20507424>>. Acesso em: 2 jun. 2018.

BOLWELL, G. P. Role of active oxygen species and NO in plant defence

responses. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 2, n. 4, p. 287–294, ago. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10459001>>. Acesso em: 4 fev. 2019.

BRASIL, M. D. A. P. E. A. (MAPA). *PLANO NACIONAL PARA O DESENVOLVIMENTO DA CADEIA PRODUTIVA DO FEIJÃO E PULSES*. . [S.l: s.n.], 2018. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/feijao/2018/4a-re/minuta-pndcpfp-indicacao-contribuicoes-versao-02-02-2018.pdf>>. Acesso em: 2 fev. 2019.

BRASIL, M. DA A. P. E A. *PORTARIA Nº 82, DE 12 DE AGOSTO DE 2016 - Diário Oficial da União - Imprensa Nacional*. Disponível em: <[http://www.in.gov.br/web/guest/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/21290521/do1-2016-08-15-portaria-n-82-de-12-de-agosto-de-2016-21290462](http://www.in.gov.br/web/guest/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/21290521/do1-2016-08-15-portaria-n-82-de-12-de-agosto-de-2016-21290462)>. Acesso em: 17 dez. 2018.

BROTMAN, Y. *et al.* Role of Swollenin, an Expansin-Like Protein from *Trichoderma*, in Plant Root Colonization. *Plant Physiology*, v. 147, n. 2, p. 779–789, 2008. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.108.116293>>.

CAROL, R. J.; DOLAN, L. The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. *Journal of Experimental Botany*, v. 57, n. 8, p. 1829–1834, 19 maio 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16720604>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

CARVALHO, D. D. C. *et al.* Biological control of white mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 50, n. 12, p. 1220–1224, dez. 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-204X2015001201220&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2015001201220&lng=en&tlng=en)>. Acesso em: 27 set. 2018.

CEZAR, J. *et al.* *Sclerotinia sclerotiorum e Mofo branco: Estudos básicos e aplicados*. [S.l: s.n.], 2015.

CHACÓN, M. R. *et al.* Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, v. 10, n. 1, p. 19–27, mar. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17407057>>. Acesso em:

28 jan. 2019.

CHET, I.; INBAR, J.; HADAR, Y. Fungal Antagonists and Mycoparasites. In: WICKLOW, D. T.; SÖDERSTRÖM, B. (Org.). . *The Mycota*. 4 vol ed. Berlim: Springer-Verlag, 1997. p. 165–184.

COLAVOLPE, M. B.; MEJÍA, S. J.; ALBERTÓ, E. Efficiency of treatments for controlling *Trichoderma* spp during spawning in cultivation of lignicolous mushrooms. v. 1270, p. 1263–1270, 2014.

COLOT, H. V *et al.* A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 27, p. 10352–7, 5 jul. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16801547>>. Acesso em: 25 out. 2017.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A. *et al.* *Trichoderma* -induced plant immunity likely involves both hormonal- and camalexin-dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea* . *Plant Signaling & Behavior*, v. 6, n. 10, p. 1554–1563, 28 out. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21931272>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A. *et al.* *Trichoderma virens*, a Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent Mechanism in *Arabidopsis*. *PLANT PHYSIOLOGY*, v. 149, n. 3, p. 1579–1592, 1 mar. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19176721>>. Acesso em: 15 jun. 2018.

CROUSE, J.; AMORESE, D. Ethanol Precipitation: Ammonium Acetate as an Alternative to Sodium Acetate. *Focus*, v. 9, n. 2, 1987. Disponível em: <[https://web.archive.org/web/20091122123626/http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/pdf/focus.Par.34900.File.dat/Focus Volume 9 Issue 2.pdf](https://web.archive.org/web/20091122123626/http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/pdf/focus.Par.34900.File.dat/Focus%20Volume%209%20Issue%202.pdf)>. Acesso em: 5 jan. 2019.

DANIELE FRANCO MARTINS *et al.* *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 35, n. 1, p. 274–288, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0871-018X2012000100026](http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2012000100026)>. Acesso em: 14 jun. 2018.

DATTENBÖCK, C. *et al.* Gene regulation associated with sexual development and female fertility in different isolates of *Trichoderma reesei*. *Fungal Biology and Biotechnology*, v. 5, n. 1, p. 9, 15 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29785273>>. Acesso em: 19 mar. 2019.

DE PALMA, M. *et al.* Transcriptome reprogramming, epigenetic modifications and alternative splicing orchestrate the tomato root response to the beneficial fungus *Trichoderma harzianum*. *Horticulture Research*, v. 6, n. 1, p. 5, 1 dez. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30603091>>. Acesso em: 13 jan. 2019.

DERNTL, C. *et al.* Novel Strategies for Genomic Manipulation of *Trichoderma reesei* with the Purpose of Strain Engineering. *Applied and environmental microbiology*, v. 81, n. 18, p. 6314–23, set. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26150462>>. Acesso em: 23 out. 2017.

DJONOVIĆ, S. *et al.* Sm1, a Proteinaceous Elicitor Secreted by the Biocontrol Fungus *Trichoderma virens* Induces Plant Defense Responses and Systemic Resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 19, n. 8, p. 838–853, ago. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16903350>>. Acesso em: 29 dez. 2018.

DUBOVENKO, A. G. *et al.* Trypsin-like proteins of the fungi as possible markers of pathogenicity. *Fungal biology*, v. 114, n. 2–3, p. 151–9, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20960971>>. Acesso em: 17 fev. 2018.

DUNKER, A. K. *et al.* Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. *FEBS Journal*, v. 272, n. 20, p. 5129–5148, out. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16218947>>. Acesso em: 3 fev. 2019.

EISENDLE, M. *et al.* Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH Regulatory system in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic cell*, v. 3, n. 2, p. 561–3, abr. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15075286>>. Acesso em: 2 fev. 2019.

EVANS, G. A. Molecular cloning: A laboratory manual. Second edition. Volumes 1, 2, and 3. Current protocols in molecular biology. Volumes 1 and 2. *Cell*,

v. 61, n. 1, p. 17–18, 6 abr. 1990. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867490902106>>. Acesso em: 1 nov. 2017.

FALADE, A. O. *et al.* Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *MicrobiologyOpen*, v. 6, n. 1, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27605423>>. Acesso em: 30 jan. 2019.

FERREIRA, L. U. *et al.* Combining ability as a strategy for selecting common bean parents and populations resistant to white mold. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 18, n. 3, p. 276–283, set. 2018. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-70332018000300276&lng=en&tling=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-70332018000300276&lng=en&tling=en)>. Acesso em: 27 set. 2018.

FLORES, A.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*. *Current genetics*, v. 31, n. 1, p. 30–7, jan. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9000378>>. Acesso em: 4 fev. 2019.

GANESAN, K.; XU, B. Polyphenol-Rich Dry Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Health Benefits. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 11, 4 nov. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29113066>>. Acesso em: 2 fev. 2019.

GIBBS, D. J. *et al.* *At* MYB93 is a novel negative regulator of lateral root development in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, v. 203, n. 4, p. 1194–1207, set. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24902892>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

GODFREY, D. *et al.* Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif. *BMC genomics*, v. 11, n. 1, p. 317, 2010.

GOLDMAN, G. H. *et al.* Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryotic cell*, v. 2, n. 1, p. 34–48, fev. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12582121>>. Acesso em: 1 nov. 2017.

GOMES, E. V. *et al.* The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self cell wall protection. *Scientific Reports*, v. 5, n. October, p. 17998, 2015.

GUIMARAES, R. L.; STOTZ, H. U. Oxalate Production by *Sclerotinia sclerotiorum* Deregulates Guard Cells during Infection. *PLANT PHYSIOLOGY*, v. 136, n. 3, p. 3703–3711, 1 nov. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15502012>>. Acesso em: 17 dez. 2018.

GUZMÁN-GUZMÁN, P. *et al.* Identification of effector-like proteins in *Trichoderma* spp. and role of a hydrophobin in the plant-fungus interaction and mycoparasitism. *BMC Genetics*, v. 18, n. 1, p. 16, 2017. Disponível em: <<http://bmccgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12863-017-0481-y>>.

HARMAN, G. E. *et al.* TRICHODERMA SPECIES — OPPORTUNISTIC , AVIRULENT PLANT SYMBIONTS. v. 2, n. January, 2004.

HOAGLAND, R. E. Biochemical Responses of Plants to Pathogens. [S.l: s.n.], 1990. p. 87–113. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1990-0439.ch005>>. Acesso em: 30 jan. 2019.

HOGENHOUT, S. A. *et al.* Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 22, n. 2, p. 115–122, fev. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19132864>>. Acesso em: 19 dez. 2018.

HORWITZ, B. *et al.* *Trichoderma* genomes: a vast reservoir of potential elicitor proteins. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.scienceopen.com/document?vid=ad44c366-ff7e-4cc9-8343-af171ec27e59>>. Acesso em: 4 fev. 2019. , 1 jan. 2013

HOWELL, C. R. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*, v. 87, n. 1, p. 4–10, 23 jan. 2003. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>>. Acesso em: 2 fev. 2019.

IAKOUCHEVA, L. M. *et al.* Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-



associated proteins. *Journal of molecular biology*, v. 323, n. 3, p. 573–84, 25 out. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12381310>>. Acesso em: 3 fev. 2019.

JAIN, S.; KUMAR, A. The pathogenesis related class 10 proteins in plant defense against biotic and abiotic stresses. *Advances in Plants & Agriculture Research*, v. 2, n. 7, p. 305–314, 2015. Disponível em: <<http://medcraveonline.com>>. Acesso em: 18 dez. 2018.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. *Nature*, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 16 nov. 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature05286>>. Acesso em: 18 dez. 2018.

KADOTA, Y. *et al.* Quantitative phosphoproteomic analysis reveals common regulatory mechanisms between effector- and PAMP-triggered immunity in plants. *New Phytologist*, 5 nov. 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/nph.15523>>. Acesso em: 7 dez. 2018.

KALE, S. D. *et al.* External Lipid PI3P Mediates Entry of Eukaryotic Pathogen Effectors into Plant and Animal Host Cells. *Cell*, v. 142, n. 2, p. 284–295, 23 jul. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20655469>>. Acesso em: 13 out. 2017.

KALE, S. D.; TYLER, B. M. Entry of oomycete and fungal effectors into plant and animal host cells. *Cellular Microbiology*, v. 13, n. 12, p. 1839–1848, 2011.

KIM, H. S.; DIERS, B. W. Inheritance of Partial Resistance to Sclerotinia Stem Rot in Soybean. *Crop Science*, v. 40, n. 1, p. 55, 2000. Disponível em: <<https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/40/1/55>>. Acesso em: 17 dez. 2018.

KOU, Y. *et al.* Structure-function analyses of the Pth11 receptor reveal an important role for CFEM motif and redox regulation in rice blast. *New Phytologist*, v. 214, n. 1, p. 330–342, 1 abr. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/nph.14347>>. Acesso em: 19 dez. 2018.

KUBICEK, C. P. *et al.* Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of Trichoderma. *Genome biology*, 2011.

KULKARNI, R. D.; KELKAR, H. S.; DEAN, R. A. An eight-cysteine-containing

CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 28, n. 3, p. 118–121, mar. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12633989>>. Acesso em: 19 out. 2017.

LAMDAN, N.-L. *et al.* Secretome of *Trichoderma* interacting with maize roots: role in induced systemic resistance. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, v. 14, n. 4, p. 1054–63, 2015a.

LAMDAN, N.-L. *et al.* Secretome of *Trichoderma* Interacting With Maize Roots: Role in Induced Systemic Resistance. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 14, n. 4, p. 1054–1063, abr. 2015b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25681119>>. Acesso em: 12 jun. 2018.

LEGER, R. J. S.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. W. Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology*, v. 143, n. 6, p. 1983–1992, 1 jun. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202474>>. Acesso em: 17 fev. 2018.

LI, J. *et al.* Phylogenomic evolutionary surveys of subtilase superfamily genes in fungi. *Scientific reports*, v. 7, p. 45456, 30 mar. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28358043>>. Acesso em: 17 fev. 2018.

LOMBARDI, N. *et al.* Root Exudates of Stressed Plants Stimulate and Attract *Trichoderma* Soil Fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 31, n. 10, p. 982–994, out. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29547355>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

MARÍN, M.; UVERSKY, V. N.; OTT, T. Intrinsic disorder in pathogen effectors: protein flexibility as an evolutionary hallmark in a molecular arms race. *The Plant cell*, v. 25, n. 9, p. 3153–7, set. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24038649>>. Acesso em: 2 fev. 2019.

MARTIN, F.; KAMOUN, S. (Org.). Rust effectors. *Effectors in Plant-Microbe Interactions*. [S.l.]: Wiley-Blackwell, 2012. p. 185.

MARTÍNEZ-MEDINA, A. *et al.* Deciphering the hormonal signalling network behind the systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* in tomato.

*Frontiers in Plant Science*, v. 4, p. 206, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805146>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

MASUNAKA, A.; HYAKUMACHI, M.; TAKENAKA, S. Plant growth-promoting fungus, *Trichoderma koningi* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/in the roots of *Lotus japonicus*. *Microbes and environments*, v. 26, n. 2, p. 128–34, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21502738>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

MAXWELL, D. P. Oxalic Acid Production by *Sclerotinia sclerotiorum* in Infected Bean and in Culture. *Phytopathology*, v. 60, n. 9, p. 1395, 1970. Disponível em: <[http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1970Abstracts/Phyto60\\_1395.htm](http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1970Abstracts/Phyto60_1395.htm)>. Acesso em: 17 dez. 2018.

MENDOZA-MENDOZA, A. *et al.* Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: Role of the fungal secretome. *Fungal Biology Reviews*, v. 32, n. 2, p. 62–85, 1 mar. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1749461317300738>>. Acesso em: 23 nov. 2018.

MIKLAS, P. N. *et al.* Characterization of white mold disease avoidance in common bean. *European Journal of Plant Pathology*, v. 135, n. 3, p. 525–543, 8 mar. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10658-012-0153-8>>. Acesso em: 17 dez. 2018.

MONTEIRO, V. N. *et al.* New Insights in *Trichoderma harzianum* Antagonism of Fungal Plant Pathogens by Secreted Protein Analysis. *Current Microbiology*, v. 61, n. 4, p. 298–305, 7 out. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20213103>>. Acesso em: 31 mar. 2019.

MORÁN-DIEZ, M. E. *et al.* Host-specific transcriptomic pattern of *Trichoderma virens* during interaction with maize or tomato roots. *BMC genomics*, v. 16, n. 1, p. 8, 2015.

MOSBLECH, A.; FEUSSNER, I.; HEILMANN, I. Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 47, n. 6, p. 511–517, jun. 2009. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19167233>>. Acesso em: 30 jan. 2019.

MUKHERJEE, M. *et al.* Trichoderma-plant-pathogen interactions: advances in genetics of biological control. *Indian journal of microbiology*, v. 52, n. 4, p. 522–9, dez. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24293705>>. Acesso em: 1 fev. 2019.

MUSZEWSKA, A. *et al.* Fungal lifestyle reflected in serine protease repertoire. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 9147, 22 ago. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28831173>>. Acesso em: 19 dez. 2018.

NASSER, L. *et al.* Structural basis of haem-iron acquisition by fungal pathogens. *Nature Microbiology*, v. 1, n. 11, p. 16156, 12 nov. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nmicrobiol2016156>>. Acesso em: 19 dez. 2018.

NICOSIA, M. G. L. D. *et al.* Dieback of Pinus nigra Seedlings Caused by a Strain of Trichoderma viride. v. 99, n. 1, p. 1–6, 2015.

PÉREZ, A. *et al.* Some biological features of Candida albicans mutants for genes coding fungal proteins containing the CFEM domain. *FEMS Yeast Research*, v. 11, n. 3, p. 273–284, maio 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21205162>>. Acesso em: 19 out. 2017.

PETTITT, T. R. *et al.* A simple detached leaf assay provides rapid and inexpensive determination of pathogenicity of Pythium isolates to “all year round” (AYR) chrysanthemum roots. [S.d.]. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-3059.2011.02451.x>>. Acesso em: 31 mar. 2019.

PIETERSE, C. M. J. *et al.* Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, v. 5, n. 5, p. 308–316, 17 maio 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nchembio.164>>. Acesso em: 31 mar. 2019.

REPAS, T. S. *et al.* Growing plants on oily, nutrient-poor soil using a native symbiotic fungus. *PloS one*, v. 12, n. 10, p. e0186704, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29049338>>. Acesso em: 27 jan. 2019.

RICHTER, S. *et al.* Fatal Disseminated Trichoderma longibrachiatum Infection in an Adult Bone Marrow Transplant Patient: Species Identification and Review of

the Literature. v. 37, n. 4, p. 1154–1160, 1999.

ROUSSEAU, G.; RIOUX, S.; DOSTALER, D. Effect of crop rotation and soil amendments on Sclerotinia stem rot on soybean in two soils. *Canadian Journal of Plant Science*, v. 87, n. 3, p. 605–614, jul. 2007. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.4141/P05-137>>. Acesso em: 18 dez. 2018.

SABNAM, N.; ROY BARMAN, S. WISH, a novel CFEM GPCR is indispensable for surface sensing, asexual and pathogenic differentiation in rice blast fungus. *Fungal Genetics and Biology*, v. 105, p. 37–51, 1 ago. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184517300920>>. Acesso em: 19 dez. 2018.

SALAS-MARINA, M. A. *et al.* Colonization of Arabidopsis roots by Trichoderma atroviride promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *European Journal of Plant Pathology*, v. 131, n. 1, p. 15–26, 27 set. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10658-011-9782-6>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

SCHIESTL, R. H.; GIETZ, R. D. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current genetics*, v. 16, n. 5–6, p. 339–46, dez. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2692852>>. Acesso em: 22 out. 2017.

SCHUSTER, A. *et al.* A versatile toolkit for high throughput functional genomics with Trichoderma reesei. *Biotechnology for Biofuels*, v. 5, n. 1, p. 1, 2 jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22212435>>. Acesso em: 24 out. 2017.

SCHWARTZ, H. F.; SINGH, S. P. Breeding Common Bean for Resistance to White Mold: A Review. *Crop Science*, v. 53, n. 5, p. 1832, 2013. Disponível em: <<https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/53/5/1832>>. Acesso em: 17 dez. 2018.

SCHWARTZ, H. F.; STEADMAN, J. R. White mold. *Bean production problems in the tropics*. 2. ed. [S.l.]: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1989. p. 211–230. Disponível em: <<https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/81822>>. Acesso em: 17 dez. 2018.

SHARON, E. *et al.* Biological Control of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. v. 91, n. 7, p. 687–693, 2001.

SHEN, D. *et al.* Intrinsic disorder is a common structural characteristic of RxLR effectors in oomycete pathogens. *Fungal Biology*, v. 121, n. 11, p. 911–919, 1 nov. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878614617300910>>. Acesso em: 2 fev. 2019.

SONAH, H.; DESHMUKH, R. K.; BÉLANGER, R. R. Computational Prediction of Effector Proteins in Fungi: Opportunities and Challenges. *Frontiers in plant science*, v. 7, p. 126, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26904083>>. Acesso em: 3 fev. 2019.

STECCA STEINDORFF, A. *et al.* Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. *BMC Genomics*, v. 15, 2014. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/204>>.

SUAREZ, B. *et al.* Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 65, n. 1, p. 46–55, 20 jul. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15221228>>. Acesso em: 4 fev. 2019.

TEMPLETON, M. D.; RIKKERINK, E. H. A.; BEEVER, R. E. Small, cysteine-rich proteins and recognition in fungal-plant interactions. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, v. 7, n. 3, p. 320–325, 1994.

TSUDA, K. *et al.* Dual Regulation of Gene Expression Mediated by Extended MAPK Activation and Salicylic Acid Contributes to Robust Innate Immunity in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, v. 9, n. 12, p. e1004015, 12 dez. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24348271>>. Acesso em: 18 dez. 2018.

UVERSKY, V. N.; OLDFIELD, C. J.; DUNKER, A. K. Showing your ID: intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling. *Journal of Molecular Recognition*, v. 18, n. 5, p. 343–384, set. 2005. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16094605>>. Acesso em: 3 fev. 2019.

VASCONCELLOS, R. C. C. *et al.* Meta-QTL for resistance to white mold in common bean. *PLOS ONE*, v. 12, n. 2, p. e0171685, 15 fev. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28199342>>. Acesso em: 2 jun. 2018.

VITERBO, A. *et al.* The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. *Molecular Plant Pathology*, v. 8, n. 6, p. 737–746, nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20507534>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

VITIKAINEN, M. *et al.* Array comparative genomic hybridization analysis of *Trichoderma reesei* strains with enhanced cellulase production properties. *BMC genomics*, v. 11, p. 441, 19 jul. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20642838>>. Acesso em: 31 out. 2017.

VYAS, S.; VYAS, S. Integrated control of dry root of soybean. In: LYR, H.; RUSSEL, L P.; SISLER, H. (Org.). *Modern fungicides and antifungal compounds*. [S.l: s.n.], 1995. p. 565–572.

WIEST, A. *et al.* Identification of Peptaibols from *Trichoderma virens* and Cloning of a Peptaibol Synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 23, p. 20862–20868, 7 jun. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11909873>>. Acesso em: 2 fev. 2019.

YEDIDIA, I. *et al.* Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 38, n. 11, p. 863–873, 1 nov. 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0981942800011980?via%3Dihub>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; CHET, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L. ) By the biocontrol agent *trichoderma harzianum*. *Applied and environmental microbiology*, v. 65, n. 3, p. 1061–70, 1 mar. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10049864>>. Acesso em: 16 fev. 2018.

YU, X. *et al.* From Chaos to Harmony: Responses and Signaling upon Microbial Pattern Recognition. *Annual Review of Phytopathology*, v. 55, n. 1, p. 109–137, 4 ago. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28525309>>. Acesso em: 18 dez. 2018.

ZHANG, Z.-N. *et al.* Systematic analyses reveal uniqueness and origin of the CFEM domain in fungi. *Scientific reports*, v. 5, p. 13032, 10 ago. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26255557>>. Acesso em: 19 out. 2017.



## 8. Anexo 1

Protein ID	% cisteína	Quantidade de Aminoácidos	Motivos putativos de translocação	Anotação
<b>367510</b>	11.27%	71		
<b>367947</b>	5.19%	77		
<b>811760</b>	6.32%	95		
<b>811813</b>	5.43%	129		
<b>723102</b>	4.67%	214		Cutinase
<b>788374</b>	4.14%	145		
<b>723370</b>	6.11%	131		
<b>851388</b>	4.95%	101		FAD binding domain oxidoreductase activity
<b>141349</b>	4.00%	100		
<b>778782</b>	4.90%	245		
<b>61409</b>	6.32%	95		
<b>848778</b>	10.26%	78		Fungal hydrophobin
<b>62778</b>	7.41%	135		
<b>211840</b>	4.00%	75		
<b>820464</b>	10.94%	128		
<b>779353</b>	6.12%	98		
<b>341819</b>	7.63%	131		Proteinase inhibitor I19, pacifastin
<b>153946</b>	7.84%	102	RKLH	
<b>800446</b>	6.06%	132		
<b>857721</b>	5.03%	179	KDLK KVYR	
<b>779156</b>	4.44%	180		beta-1,6-N- acetylglucosaminyltransferase , contains WSC domain
<b>300239</b>	8.82%	170	RDWH	
<b>779733</b>	4.97%	181	YVC	Nuclear receptor coregulator SMRT/SMRTER, contains Myb-like domains CFEM domain
<b>164915</b>	9.62%	104		
<b>779839</b>	5.22%	230		Transglycosylase SLT domain
<b>779442</b>	10.31%	97	HPLK	

<b>686787</b>	18.42%	38		
<b>779480</b>	5.71%	140	FGC	beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase , contains WSC domain
<b>779899</b>	9.88%	81		Fungal hydrophobin
<b>544324</b>	4.50%	111		
<b>801455</b>	16.67%	48		
<b>74041</b>	5.11%	274		beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase , contains WSC domain
<b>780732</b>	5.67%	247		
<b>801626</b>	4.72%	127		
<b>173257</b>	9.80%	102		
<b>570131</b>	4.76%	63	WKC	Uncharacterized conserved protein Protein of unknown function (DUF1242)
<b>570301</b>	7.17%	251	FLC	
<b>822645</b>	11.58%	190		
<b>779863</b>	6.11%	131		Killer toxin, Kp4/SMK-like, core
<b>850126</b>	5.31%	113	YNC	
<b>617758</b>	5.88%	102		
<b>617712</b>	5.78%	173		
<b>150841</b>	5.56%	54		
<b>813797</b>	6.43%	249		Cellulose-binding region, fungal Chitinase
<b>211106</b>	7.98%	163		Serine/threonine protein kinase
<b>167930</b>	5.94%	101	RALK RGIR	
<b>65697</b>	10.13%	79		
<b>792166</b>	10.13%	158		
<b>781782</b>	6.00%	100	RNIH	
<b>780535</b>	10.71%	84		Fungal hydrophobin
<b>695294</b>	6.25%	96	FQC WAC	
<b>222734</b>	4.74%	253	FLC	
<b>239434</b>	6.80%	103		
<b>693808</b>	8.47%	118		Killer toxin, Kp4/SMK-like, core

<b>221113</b>	5.88%	136		
<b>802562</b>	5.26%	114		
<b>780445</b>	5.88%	102		
<b>124825</b>	7.50%	80		
<b>823424</b>	11.29%	62		
<b>454114</b>	16.67%	48		
<b>699160</b>	5.00%	160		Peptidoglycan-binding LysM
<b>686259</b>	7.89%	76		
<b>813770</b>	9.16%	131		
<b>833336</b>	6.15%	130		
<b>130632</b>	7.29%	96		
<b>143972</b>	10.96%	73		
<b>852000</b>	4.62%	130		
<b>77959</b>	5.13%	117		
<b>230678</b>	7.69%	104		Killer toxin, Kp4/SMK-like, core
<b>804840</b>	12.90%	62		
<b>706917</b>	5.66%	106	RNFR	
<b>205380</b>	5.13%	117		
<b>206064</b>	6.19%	97		
<b>782365</b>	7.03%	256		Fibrillins and related proteins containing Ca <sup>2+</sup> -binding EGF-like domains RlpA-like_DPBB
<b>792474</b>	7.81%	192		
<b>218292</b>	4.35%	92		
<b>225444</b>	6.93%	231		Fungal cellulose binding domain Glycosyl hydrolase family 45 RlpA-like_DPBB Expansin/allergen_DPBB_domain
<b>780739</b>	9.38%	64	YSC	
<b>704600</b>	6.49%	154		
<b>782080</b>	5.19%	154		
<b>854968</b>	4.80%	250		Killer toxin, Kp4/SMK-like, core
<b>262911</b>	9.21%	76	RRIK WSC	
<b>279335</b>	6.35%	63		
<b>703985</b>	9.30%	43		
<b>825856</b>	9.33%	75	YAC	

<b>733814</b>	7.08%	226		Transcription initiation factor TFIID, subunit BDF1 and related bromodomain proteins
<b>805175</b>	10.34%	58		
<b>255635</b>	6.30%	127		
<b>163241</b>	10.53%	57	RKFR FRC	
<b>180233</b>	4.10%	122	HHLH RSIK	
<b>824231</b>	5.19%	135		
<b>184706</b>	4.71%	85	RYWR	
<b>804581</b>	4.60%	174		Cyanovirin-N
<b>432416</b>	4.58%	153		
<b>782769</b>	4.98%	261	KPYR	Fasciclin and related adhesion glycoproteins
<b>135555</b>	6.80%	103		
<b>835831</b>	7.48%	107		Ubiquitin C-terminal hydrolase
<b>761164</b>	8.04%	112		
<b>854466</b>	6.67%	90		
<b>222272</b>	8.45%	71		
<b>709246</b>	8.97%	78		
<b>323526</b>	6.00%	100		
<b>355074</b>	5.52%	145		
<b>351991</b>	9.73%	113		
<b>793838</b>	8.42%	95		Fungal hydrophobin
<b>783809</b>	6.57%	213		Uncharacterized conserved protein, contains YggU domain
<b>794806</b>	4.48%	67		
<b>401627</b>	4.95%	101	RKIR	Lytic transglycolase Distantly related to plant expansins missing_ipr005132; RlpA-like_DPBB
<b>401641</b>	7.46%	67	RHIR	Peptidase M, neutral zinc metallopeptidases, zinc-binding site
<b>784476</b>	14.29%	126		missing_ipr015874
<b>396602</b>	8.14%	86		
<b>423240</b>	6.17%	227	WDC	Glycosyl hydrolase family 45 RlpA-like_DPBB
<b>737794</b>	6.04%	149		

<b>860849</b>	4.55%	264		beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase , contains WSC domain missing_ipr013994
<b>456838</b>	4.39%	228		Thaumatococcus
<b>709924</b>	9.30%	43		
<b>817168</b>	7.41%	243		
<b>716896</b>	12.94%	85		
<b>420134</b>	6.84%	263		WSC_carb-bd
<b>794708</b>	5.88%	102		
<b>450851</b>	5.05%	99		
<b>444767</b>	5.71%	70		
<b>708571</b>	11.27%	71		CFEM domain missing_ipr014005
<b>559797</b>	6.67%	75		
<b>506771</b>	5.31%	113		
<b>785344</b>	4.65%	215		Cutinase Carbohydrate Esterase Family 5 missing_ipr008262
<b>761294</b>	6.82%	176		
<b>658572</b>	4.58%	131		
<b>536212</b>	7.55%	106		
<b>866084</b>	4.92%	244		Killer toxin, Kp4/SMK-like, core
<b>785999</b>	4.85%	165		beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase , contains WSC domain
<b>784390</b>	5.43%	184		beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase , contains WSC domain CFEM domain missing_ipr014005
<b>531547</b>	4.48%	223		
<b>711746</b>	5.54%	271		Adaptor protein Enigma and related PDZ-LIM proteins WSC domain
<b>711752</b>	7.63%	131		
<b>389599</b>	6.67%	60		
<b>796414</b>	6.09%	115	KRLH	
<b>440074</b>	7.34%	109		
<b>713819</b>	7.87%	89		

<b>785086</b>	5.30%	151		missing_ipr008985
<b>714188</b>	8.70%	92		
<b>433749</b>	4.64%	194		
<b>714818</b>	7.23%	83	YKC	
<b>785323</b>	7.14%	84	YVC	
<b>709590</b>	13.11%	61		
<b>516699</b>	11.21%	107		
<b>715351</b>	4.88%	123		
<b>610109</b>	5.26%	114		Cyanovirin-N
<b>21816</b>	5.67%	141	FAC	
<b>809716</b>	6.40%	125		
<b>12230</b>	6.25%	128		CFEM domain missing_ipr014005
<b>782671</b>	5.65%	248	FPC	beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase , contains WSC domain
<b>634758</b>	5.45%	55		
<b>868963</b>	5.19%	77	RIYR	Killer toxin, Kp4/SMK-like, core
<b>557917</b>	4.62%	260		Fungal chitosanase of glycosyl hydrolase group 75
<b>550251</b>	6.25%	48		
<b>632836</b>	9.57%	94		phosphopantetheine attach_site
<b>785096</b>	5.88%	102	FVC	
<b>786501</b>	6.50%	277		beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase , contains WSC domain
<b>869060</b>	6.02%	133		Ig/MHC_CS
<b>863825</b>	8.70%	115		
<b>715721</b>	5.75%	174		PAN domain missing_ipr003014 Pan_app
<b>36326</b>	4.52%	155	RALH WLC	
<b>45653</b>	5.13%	78	HVLR	
<b>809885</b>	4.26%	94		
<b>810578</b>	8.33%	96		
<b>22347</b>	9.30%	43	FSC	
<b>48918</b>	5.71%	105		
<b>743090</b>	7.56%	238		beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase , contains WSC domain

				missing_ipr013994
<b>73775</b>	5.63%	160	HPLH	
<b>798661</b>	5.19%	154		Actin regulatory protein (Wiskott-Aldrich syndrome protein)
				Fungal hydrophobin
				Cerato-ulmin_hydrophobin
<b>88576</b>	5.00%	60		
<b>60602</b>	14.81%	54	YDC	
<b>56951</b>	7.23%	83		
<b>797798</b>	6.06%	132		
<b>719507</b>	11.27%	71		CFEM domain
				missing_ipr014005
<b>722293</b>	7.89%	38	YTC	
<b>718195</b>	6.82%	132		Thaumatococcus
<b>808729</b>	8.33%	96		
<b>810880</b>	10.34%	58		
<b>769194</b>	5.24%	191		beta-1,6-N- acetylglucosaminyltransferase , contains WSC domain
<b>603901</b>	4.74%	211		Cutinase
				missing_ipr008262
				Carbohydrate Esterase Family 5

## 9. Informações complementares

### 9.1 Sequências gênicas

Sequência 1: Região genômica da Serina peptidase 747596. Éxons do gene são mostrados em vermelho e Introns em preto. As sequencias utilizadas para desenhar os *primers forward* são mostrados preenchidos com a cor verde, e as utilizadas para desenho dos *primers reverse* são mostradas preenchidas com a cor amarela. A região amplificada que flanqueia pelo lado 5' é mostrada em cor azul, e a região amplificada que flanqueia o lado 3' é mostrada em cor laranja.

5'-

```
CTCTTTTATCATAAGATTACGCCATA GGAGCAACATCCAGAATCTGAATAGGCTTTCTATTGACTCTATGTC
ACACATGCTCGCGAAAGTATGGGCCGACACAGCGCTTAATGATCATTACGGTTACTAATCTGCATTCTGC
TTTGTGGTTTGTAGGATAACTCGAGCGGGGATGATAACGGAGATTTACGCGGAAAACAGGGCTTGC GG
GACCTGAAAAATCCCCTGTGTCAATCCTGGACGGCCATCAGTAAAAATTCCAAGAGCCGATTGTTGTCAAG
GGCCAAGACTCTTGGCACCCGGCATTGAGGATGATCGATCGTGGAGATCAAATCACCATGTACTTATTACT
GCCCATACCTAAGTAGAAGCAGACCCAAACAATGTTGTAGAAAGTGCATCTTGAAGCAGATGGTGACAAA
CATTTGTGAGGTATTTATTTCCAGCATATTGAGCGGAAGTGACACAGACTTAGCCGCAATGCGAGGTCTC
TAACTGTAAGACTCAGAACTTTATTGACAATGCTTTTAGTCTTCAGCTACAAAAGCCGATGATATTCGGCCG
GTGCCGACGTGGGTTAATTGCGGGCAGATTTGATCCGCCGTTGAAGGCAGTAGTAGTAGTACTGGGAGTG
GGCGTAAACTGCAGGCTTCGATTATCCGCAGACCTTCCCGATCTGATACTCGCCTCCGTTAAAAACCCT
TGCTCAAGACCATGGAGCAGTGAATGATGTAACAGGCAGATTTGTGCGCATAATGATAGGATCAGAAG
GATCAACCCGATTTCAAATGACAGGCAATTAATTATAGAGTTAATGATAAGACTCGCCAATCGGCCTATA
GGTTTAAAGCATAGTTCTGCTACGTGTAGCACGATGAGCCACGGGAAAGATACCGATCGAATTTGATGATA
GAAGCCGCGGAAATAGTACGATTCCGCTGGTTAGTTGTGACTTAGCTAGCTGTAATCATAAAAAGAAAAAGA
ATACTAGTACTTCAATTAGTGTGGCTCATCGTATCAATAATTCCCGATTTGGAAGGAGTTCGTGTGAAAAC
TAGTACATCGGAGCTTAAGTGACCCCGAACAAACATCACAACTATTACTTCGATCGGCAATAGTATGGATC
GGCTTTGGTCCGAGATATGGTCACGTCAAGCTTACCAGAAAAGGTTGTTTTGGATAAGGCAGGTCTGACAA
TTCTCAGAACTTTTGAAATGGACTACAACAAGCGGGGAGCGCATTGACTGGGAATGAGGAAGGTGATCC
GAGTCACTCCAACCTCTGTTATCATGACATCTTGGCTAATCGTGAGGAGTTGAACAATGACCTCAACTTTGG
ACTTGTGATGGAAGCCAAGAAATACTATGTTGCCAGCAAATGACTATAAAAACCGGCCTCCCTCCGCACT
TGGATGCAGAGAAGAGCATCATCCATCGCCTGACAAGCACTCAGTCAAAAAGGAAGGATCAATATCAACAG
AACAAAGCAAGATGAAGATCAGCCTCATCGTCTCAACGGCCTCTTGGCTGGTGCCATGGCAGTGCCAAC
TGGTCCCAAGTTGTCCATGAAAAGCGAGACCAACAATGCTCGATGGATCAAGCGTGAGGCGGTGAC
CCCAACACCAAGTCCCTGTCCGAATCGCCTTGAAGCAAAGCAACTTGGACAAGGGCATGGACTATCTTC
TTGACGTGTACGTACTTCTCGCGATGCTTGATAACAGCTAAGCGGAAAGCAATCTAATGGATGACGATTAT
AGGTCTCACCAGAGTCTTCCAACACTACGGTAACCACTACACGGCCGACCAAGTTGTTGATCTTTTCGCTCC
TAGCGATGAGTCTATCAACAGCGTGAAGTCTTGGCTGGTAAATCTGGCGTGCCGGCCAGTTCATCACTG
CCTCCAAGAGCAAAGGCTGGCTTAGCTTACAACGACTTCTGGACAGCTCGAGTCGCTGCTCCACACTTC
GTTCAGCACTTATGATCACGTCGATGCTAGAAATGTCCATATTGGTACAGACGAGTACAGTCTTCCAAGG
AAATCTCTCAGCACGTTGACTTCATCACCCCTGGTGTGTTGCTTTGCTCCCGTAAAGACGTCCGCCAAGAAG
GAAAAGCGTGGCCACAAGTCTATTCGCCGCGCTTCCAAGCCCCTTCCGCTCATATTGCGCAGATTTGGC
AGCAAACCCTCGTAAGTTACGCAATGACTAGAAAAGTAAGGAATACATAGATGGAACACTGACAAGGGCTT
CAATACAGGGGCGACATCGACCTGCGGCTCTGCAATTACCCCCAGTGATCAAGTCGATGTACAACATT
ACGCCCAGAACTTCTGCTATTTCTAGCAATGCCCTGGGCGTCTTTGAGGTTGAAGATACCTATGCTCAACA
AGATCTTACTCAATTCTGGAAGTCGTTGCTACAAACATTCCCTCTACTACTGGACCTAAGGTTGATGGAAT
TGATGGTGCCAAAGCCCCTACCAGCCCTATCAACGCCGGTGGAGAATCTGACTTGGACTTCGAAATCGCC
```



ATTCTATCATCTACCCTCAGACAACAGTTCTCTACCAGTCTTCTGTTAAGAACGATGATATTTTCAACACG  
TTCTCGACGCCATTGATGGAAGCTACTGCACATTTTCTGATGATGGCGAGACCGGTGATGACCCTACTGT  
TGATGGTACAACCCGCAATGAGCAGTGCGGTGCTTTCACGCCACCAATGTCATCTCCTTCTCCTACGGCA  
CTGCCGAGGCTGACTACCCTACCTATTATCTCCAAGTATGTGACTCCTTGTAAACATTTGCCAAAAAGATTTT  
CGGTCAGCTAACTAGGTCCACAGCGTCAATGCGATGAGTTCATGAAGCTCGGTCTTCAGGGTACCAGCAT  
TGTTTTCGCCAGTGGTGACGATGGTGTGGCCGCGCTCTGGTCCTTGTCTCGGTTCAAAGCGCAACATCT  
TCACTCCTGGTGAACCTGCTAGCTGCCCTATGTTACCTCGGTGCGGTGCTACAACCTTCCATCCGGTAGC  
GTGCCTGGCGACGAGGAGACTGCTGTTACATCCTTCTCATCTGGCGGGGGCTTCAGCAACATCTGGACCA  
CCCCGAGCTACCAAGCTAGCGCTGTCGCCGCGTAAGTTATGAATGCGAATTGACTTTTTGCTCAAAGCTA  
ATAAGAGTTCCAGTTACTTCGCCAGCCACGACCCCGGCTATGCCTCGTACAACACCTCAGCTGGTGTGATC  
CCCACCACTGGCGGTATCTACAACAAAGCGGGACGTGGTTACCCCGATGTTTCTGCTGTTGGTGACAATG  
GTGTTGTTGTCAACGACGAGGAGCAAGTGCTTGAAGGCGGCACCTCTATGGCCACTCCTCTGTTGCTGGT  
ATCTTGACCCGAATCAACGAAGAGCGTATCACTGCAGGCAAGAGCCCGATCGGTTTCGCCAACCTGCAC  
TTTATGCCAACCTGCCATGTTCAACGACATCACCGTTGGCAACCAAGCCAAGGGTGGCCCCAACGGCGA  
TAGTGGTGCCAGTGCTTGCGGTAACAAGGGCTTTTCCGCCGTTGCTGGTGGGACCCAGTCACTGGTCTG  
GGAACACCAAACCTACCCTGCTCTGCTGGAGTACTTCTCGGTCTCCATAATCGGAGATACAAAAGAGTAA  
AATGAATGCATTGCTATCAGCGCAAATACAATGGCGAATGAAGGAGGCCTGAAGTATATTGTCTTGTATCT  
AGCAGTTGATTAGCAATTCAGTAAATATAGCTGAAACATTCGAAGTCAAATATTGTGCCGAATTCAAAGTC  
CAGTGAAAACATCAATAATCTAAAATGATAATCACAAAGATTGTAATAGAACTACTGGGATGCCTTTGGG  
CCATTGACGCAAAGCACCAATGGAAGTTGGTGGCTTAACCTCGAACAAAACATGTATGAAACCAGCGGAA  
TTAGGCTGTCAATCGTTATTTTACACACAACCTGCTATAAGTCTTTATATGGGAGTAAGTATAAGCGTATCTC  
AAAATACGTAATCAATTCAATAATATCGTAGGAATCGAAAGCTATAGCCATTAGACCTTTGAAGATGATAC  
AAAGAACTATATACAACATTTGTATATATATACAATACTTTTTCTGTATGTACGACTTGCTATTATATACAAG  
ATTGATGCAGGACAAAAGGATCATAGAGTCAGGTTACGTGAACCTGTGTCGTAATTTGCCTATAATCTAA  
CGGCGTGGCGGGTGGCTCGCTCAGACCGCTTGTGACAGAGCGGCGCTGGTTGACAGGGCCGGTGGGT  
TGACCAGGAGCATTGGTGTGCAAAATCGTAAAGGGTCTCATCAACAATCTCCCAGGAGATGTCAATGTGTCC  
GGCGAAGCATGCGTTGCTGTTAAGCTCACTGAGGACGGAGTAGCTGAAGTCCAGTCCAGGAGCACCGTTG  
GGTTCAGACAGTGTGGTCTTGGAGCCAGTGCCGCAACGCTGGCATCCGTCACCAATAAAGAGCGGGA  
GATCCGACTGGACACCGTTGACGGTGACGATGACACGCTTTCACAGTAATCAGCCAGGTTGCCGGCAAT  
TTGAGTGTGGTTCATGGCAACGAGGTTGTTGCTGTTGATCTGATCCAAAGAGAGACCAGTGAAAAAGTTGC  
ACTCAACGAAGCCGAGTTTTGGTTGGCAAAGCTGGTGGCGCAAAGCTTGTACCTGCTCGACATCGTAGTA  
GTAGGTTCCAAATCCAGTGCCGCTGTCAATAACGGCCTGGGAAAAGGCAGATGCGGCAAAGAGGCCGAT  
GGAAGCAAGAACTTGGCTCTTCATCTTGACTTTGGGGTGTCTTTACAGACTTTAAGGAATGAATGAATGAA  
GGAATGGAAAAGATTCACAAGGAGTGACTTGCCTGCTAGGGATTGCGGTTGAGAAAAGATGTTGGGAC  
ATTTCCAGGCCAGACCAAAGACTACTTATATACAGATGAAACAAACGGCCTGTTACAGTACAATCTTCTTGT  
GAAAATTTGACAGAAGCAACGAAGCAACGTTTACGTGAACACTAGCTAGTACCAGTATGCTGTAAAACA  
ACAGCCCAGAACATATTGAGACCCTTCAACTCCAGTGCAGTTACAGAAAAGGCATAGTCCTAGAGCTA - 3'

---

Sequência 2 Região genômica da SCRP-CFEM 779733. Éxons do gene são mostrados em vermelho e Introns em preto. As sequencias utilizadas para desenhar os *primers forward* são mostrados preenchidos com a cor verde, e as utilizadas para desenho dos *primers reverse* são mostradas preenchidas com a cor amarela. A região amplificada que flanqueia pelo lado 5' é mostrada em cor azul, e a região amplificada que flanqueia o lado 3' é mostrada em cor laranja

5'-

TGGCCAACCACGGTTGCACATGAAAACCCAGATCTGGGATTGCAAAGGCGAGAGGCAGGGCTGCTGG  
GCTTTTGGGGGCTGGGCCAATGGCAGTGATGCGTGCCGACGACGAAGAACAATTGGATCTGGTGAAGTTG  
GAGCTCTTTCGATTT**SATCAACTGGCAATTCGCG**CCACGAGGCCAATGGGGAGAAGCGAAGCTGGGCAA  
CTGGGCCCGTCGGGTCGTGTCGCGCATCCCCGTTGCTCGTTTATTACAGTAGCTGGAGAGAGAGACTCT  
TTTTTGCATTGACGGGAAGCGTGAGGTCCCAATCCGCGGCTGGATGTGAGTGAGCATTACATGTTTTC  
CTGGGGGCATGTAACCTCACCTGGGCCAACTCTGAAACTGGCCTCGTAAAAGTCGGCACAATTGATGCT  
GCAGTAGGAGTAACAGTAACAGTGACCTGACATCGACAGCAGCCATCAACACATCCAGCAGTACCTGTTA  
CAGCGCGTGTCCGAGCCAACTGCAGTCATCCCCCATAAAAAGCCAAGGCCGTGATCGCTGGGTTGCC  
CGGCTCGGCCGTGTGTAGCAGATGAGGTTAGGCCACAGCCCATCCAGCCAGCCCCCTGTTCCGGACG  
AGGTTGGCTTGCCACGCTCCAATCTTCACTAACACGCTCTGCCTGCTGCTGGAGCAAGTAAGTTTCAGTTAC  
TTGACGTTGTTAGTGATTGTCACCAAATTGTCAAGTCACTGGCACCTGGCAAGCCCCTGTAATGAATGGCC  
CGTGTGGCACAGCAACCCACCCACCAGCCTCTTGCTCTCCATGCTCTGCGTGGCTGCCAGAGAAGAAG  
TCGCGCTCCGTAGTGTATACCTGTACCTCCGTAGTGTGTATGTTTTGTCCAAGCTGGCGCCCCAGGTA  
GTACCGCTGGTAGACGCAGCATCGAGCCACGGCGGCGAGCGCACCGCCACGACTTGGCAGCCAGGTA  
TTCTATTGCGGTAAGTCTGCTCGGTCCATCGCGGTACATTCTGCCATACTTTTGCAGCCAAACCAACTCCATCA  
ACAGCATCAACAGTGGACGTGAATTGAAGCTAAACCTTGACGGCCCTTGTCGCTCTTTCGGCCCTGCTAGG  
CCGTGCTGTGCTAGCCTTGTCTTCAATTTGCACCCCGGCCGACGATCGAAGGGGAGGGGCGTGCGGC  
CCCAGCTGAGACCAGGAGCCACACACGGCTTGCACTCAG**GCTAAGGCAAGGAAAGCTCA**AGCCAAGGTT  
GTTGACTCGACCTTGACGGGACAAGGACAAGAAAGAAGGACGGACTCTCACAACAGTACATAAAGAGG  
CTTCCCTCCATCTCCGAAGCCTTCTTTTCTCCTTTCTTCTTTTCTTCTCCATCCACTCGCTCGCTTTCACAG  
TCCAGCTACATTCGTTGTCTGAACACTAAACCAAAAAACTCACAAAAAAACAACCTTAATACACCCACCCCC  
AAAACACTTCAATACCGACAAG**ATGAAGGCCGCTTTCGTTGCTGTTGCTCTCGCCGCTCTGGCCAGGCTC**  
**AGACTCGCGCTGATATCCCATCCTGCGCTCTGCCCTGCCTCGACGACGCCGTCAAGGCCAACACCAAGTG**  
**CTCCACCACCGACTACGTCTGCATCTGCAAGGACTTCAACGCTGTCCAAGGCGCTGCCACCGGCTGTGTC**  
**GTTGAGAAGTGCGGTACCGACGTTGCCATCAGTATGTTTCTCTGGTCGATCTGAGATGAAAAGGAGCTTC**  
**ATGTATTAACCAATTCGCTACAGACAAGGTCTCCCCGCCACTCAGGCTCTCTGCGCCGCCAACTCTGGCT**  
**CTGGCTCTTCCGGCTCTGGCTCTTCTCTGCTGCCAACACCACCCCGCCAGCAGACCACCTCTGCCGCT**  
**CAGTCTTCTTCTGCTGCCAGTCTTCTCTGCTGCCAGTCTCTGTCGCCAGCGCTCCCCCAGCTCTGCT**  
**CCGCCCAGACCACCTCTGCTGCCAGACCACCCCGTCTGTCGCCGTCGGCACTGGCACTGGCGTTCCTC**  
**CTCCGCTGGCAACAAGACCACCACTGGTGTCTCCACTGCCCCACCAACGGCGCTTCCACCATCCTGCC**  
**CGGCTCGCCTTCATCGCCGCTCTCTGCGCCTTTCCTGTAAAGGGTTTGACAATGAACGACGAGATTGG**  
AAGG**GTGACCATGTTGGAGGACT**TCGGATTACTGGAACGTTTTGGTGAGATGGAAGGATAACGGTGTGA  
TGAACATATGAGCTGGACCCCGACGACTTTTTTTGTTGGCTTTGGATCGTGCGCCCTTTCGAGGGAGTG  
TAATACACAAAATATAACAGATTACTGGCTTAAATGCTAATGTCTTCGGACGACTTTTTTATGATTACAAAC  
AAGCTTTTCGCGCGTTTTTGATTGTGACTTGCAATGTGATATCTATGACTGTTTTTATTCTATTTAATTAC  
CGAATTGACATGTTGTAGAATTCAATGGCTTTGAATATGGATGTTTTTGACAGCAGAACTGGAGCTGCAC  
TGAGCTACGCTACGCTGCTTACCGCTCTCATGTAAGTGCGGGCTGTGCTGGAGACACCTTACAGACTGTA  
CCAAGATGTAAGTGAACCCCGGTACCTCTACTTCCACTGAAGGAATTAACAAGACCTGCTGAGACCCGCT  
GTATCCGAGCTTCCGCGAGCGACTTGCAAGTCCAGGCCAAGTTGTGCGGCCATTTTTTTGTTCTCGTTGAC  
TAAGAGAATCATGGCCCTGGTCTGGCTAAGCGTACCAGTGAGGATGCCATTCAGGTGAAGGTACAAGGC  
CAAGTTACGGAGTCCAAGTACCTCCGAGCTTAGTAGTACCAACTACGGCGCTTTTCTAGCGGTAATCCG  
GAGTATAGTGTACAGTACTCGTACAAGCCGACGGGAGGACGTTACAGAAGGAGCTGGGCGGGTCCGGT  
GGCTCCGCTGGCTGGGATTTTATGGTTGAGGGGCGTATACTTGTTAT**GAGTACATGGTACATGGTACG** - 3'

## 9.2 Tabela de *Primers*

Tabela 2 Lista de *Primers*: Os fragmentos adicionados que são complementares ao gene de resistência à higromicina são mostrados em vermelho; e em verde são mostrados os fragmentos complementares ao plasmídeo pRS426

<i>Primer</i>	Sequência		Tamanho do <i>amplicon</i> esperado (bp)
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	
<b>Hph</b>	GTCGGAGACAGAAGA TGATATTGAAGGAGC	GTTGGAGATTTTCAGTAA CGTTAAGTGGAT	1432
<b>SEP</b> região flanque adora 5'	GTAACGCCAGGGTTTT CCCAGTCACGACGGG AGCAACATCCAGAATC TG	ATCCACTTAACGTTACT GAAATCTCCAACCCCGC TTTGTTGTAGTCCAT	1218
<b>SEP</b> região flanque adora 3'	CTCCTTCAATATCATC TTCTGTCTCCGACGTG CCGAATTCAAAGTGCA G	GCGGATAACAATTTTACAC ACAGGAAACAGCGATT GTACTGTAACAGGCCG	1210
<b>CFEM</b> região flanque adora 5'	GTAACGCCAGGGTTTT CCCAGTCACGACGGA TCAACTGGCAATTTCC GC	ATCCACTTAACGTTACT GAAATCTCCAAGTACGAGC TTTCCTTGCCTTAGC	1100
<b>Cfem</b> região flanque adora 3'	CTCCTTCAATATCATC TTCTGTCTCCGACGTG ACGATGTTTGGAGGAC T	GCGGATAACAATTTTACAC ACAGGAAACAGCCGTA CCATGTACCATGTACTC	844
<b>ORF</b> – <b>SEP</b>	GTACCAGCATTGTTTT CGCC	ATGGAAGAGTTGTAGCA CCG	2561
<b>ORF</b> – <b>SCRIP</b> <b>CFEM</b>	CCGCTTTCGTTGCTGT TGCT	AGTGGTGGTCTTGTTGC CAG	935
<b>Act</b>	AAATCCTGACCGAGC GTGGTTACT	TTGGCAGTTTCCAATTC CTGCTCG	121

<b>Glu</b>	AATCAAGCAGCTCTGC AAGCACTC	AAGTTCAGCACGTTCCCT TTGCACC	134
<b>PAL</b>	TGAAAGTACAAGGGCT GCTTAT	CCCAACTCCTCTCTCAC AAAC	105
<b>Lox</b>	TGCTTGCTGGTGTTAA TCCTTGCC	AATGCCTCTTCCACAGT GAGTCCA	154
<b>Per</b>	TTGTTATTCTTGGAGG GCCCGACT	TGGCTAAGATTGGCACT ACCCAGT	118
<b>Chit</b>	CGGCACTGTGACGAA CATCATCAA	AAGAATCCGATGCGGT CTTGAACC	84

### 9.3 Dados Brutos de expressão diferencial

		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Média Réplicas 2 e 3	Desvio Padrão Réplicas 2 e 3	Erro Amostrai Réplicas 2 e 3
P	Glu	1	1	1	1	0	0
P	Chit	1	1	1	1	0	0
P	Lox	1	1	1	1	0	0
P	PAL	1	1	1	1	0	0
P	Per	1	1	1	1	0	0
P + IP	Glu	4,6	2,11	3,95	3,03	1,301076	0,92
P + IP	Chit	7,81	2,57	5,85	4,21	2,31931	1,64
P + IP	Lox	1,76	1,77	1,28	1,525	0,346482	0,245
P + IP	PAL	9,83	1,65	5,12	3,385	2,453661	1,735
P + IP	Per	4,02	0,23	0,58	0,796667	0,247487	0,175
P + $\Delta$ thcfem 1º	Glu	0	2,08	3,21	2,645	0,799031	0,565
P + $\Delta$ thcfem 1º	Chit	0	8,23	3,69	5,96	3,210265	2,27
P + $\Delta$ thcfem 1º	Lox	0,29	1,22	0,89	1,055	0,233345	0,165
P + $\Delta$ thcfem 1º	PAL	0,11	6,06	3,97	5,015	1,477853	1,045
P + $\Delta$ thcfem 1º	Per	3164,6	0,69	0,28	0,485	0,289914	0,205

P + $\Delta$ thcfem 2 <sup>o</sup>	Glu	4,32	2	2,18	2,09	0,127279	0,09
P + $\Delta$ thcfem 2 <sup>o</sup>	Chit	4,44	4	1,5	2,75	1,767767	1,25
P + $\Delta$ thcfem 2 <sup>o</sup>	Lox	4,24	1,95	1,54	1,745	0,289914	0,205
P + $\Delta$ thcfem 2 <sup>o</sup>	PAL	1,45	3,71	1,84	2,775	1,32229	0,935
P + $\Delta$ thcfem 2 <sup>o</sup>	Per	36,84	0,295	0,06	0,1775	0,16617	0,1175

#### 9.4 Dados brutos de morfologia do feijoeiro

	Área foliar (cm <sup>2</sup> )				Tamanho total das raízes (cm)			
	Isolado		Δthcfem	Δthcfem	Isolado		Δthcfem	Δthcfem
	parental	Planta	1 <sup>ª</sup>	2 <sup>ª</sup>	parental	Planta	1 <sup>ª</sup>	2 <sup>ª</sup>
Planta 1	73,909	60	72,345	83,107	1200,61	841,69	861,956	801,221
Planta 2	53,443	71	69	84,085	1209,84	807,08	1041,23	900,584
Planta 3	60	72	49,919	69,648	1010,56	718,72	889,788	921,312
Planta 4	71,876	79	80,386	42,743	688,191	597,14	744,264	859,384
Planta 5	48,038	67	80,394	74,109	982,119	649,3	645,903	684,304
Planta 6	72,1	65	57,403	74,148	1160,88	887,13	874,76	1015,63
Planta 7	80,06	49	65,445	52,822	950,085	529,57	826,847	581,31
Planta 8	63,638	52	46,778	78,392	993,495	820,31	902,004	632,272
Planta 9	65,359	63	64,93	67,035	733,837	634,29	1137,13	568,618
Planta 10	69,977	73	47,117	38,177	971,641	1226,3	762,273	926,397
Planta 11	72,736	73	45,817	70,969	664,433	640,35	946,364	601,551
Planta 12	72	87	55,605	69,513	1096,54	868,7	976,219	611,075
Planta 13	64	56	81,112	78,792	946,943	780,8	792,943	846,751
Planta 14	75,305	54	73,137	62,473	1272,36	660,83	633,608	449,394
Planta 15	90,706	58	55,374	51,685	904,452	404,44	853,892	864,757
<b>Média</b>	69	65	63	67	985,733	737,78	859,279	750,97
<b>Desvio</b>	10,1163	10,3	12,37207	13,7175	180,184	184,55	131,439	163,714

	Volume (cm <sup>3</sup> )				Diâmetro médio (mm)			
	Isolado		Δthcfem	Δthcfem	Isolado		Δthcfem	Δthcfem
	parental	Planta	1 <sup>ª</sup>	2 <sup>ª</sup>	parental	Planta	1 <sup>ª</sup>	2 <sup>ª</sup>
Planta 1	1,584	1,52	1,28	0,903	0,4099	0,4795	0,4348	0,3788
Planta 2	1,369	1,506	1,595	1,014	0,3795	0,4875	0,4416	0,3786
Planta 3	1,45	1,185	1,399	1,04	0,4274	0,4582	0,4474	0,379
Planta 4	1,24	1,077	1,102	1,575	0,4789	0,4792	0,4342	0,483
Planta 5	1,707	0,973	1,276	1,117	0,4704	0,4368	0,5015	0,4559
Planta 6	1,887	1,442	1,251	1,606	0,4549	0,4549	0,4267	0,4487
Planta 7	1,537	0,99	1,577	1,296	0,4539	0,4878	0,4927	0,5329
Planta 8	1,581	1,473	1,586	1,674	0,4501	0,4782	0,4732	0,5807
Planta 9	1,154	1,048	1,705	1,74	0,4475	0,4587	0,437	0,6242
Planta 10	1,096	1,525	1,311	1,26	0,379	0,3979	0,4679	0,4161
Planta 11	0,8	0,957	1,706	0,955	0,3915	0,4361	0,4792	0,4496
Planta 12	1,244	1,271	1,939	1,207	0,38	0,4316	0,5028	0,5015
Planta 13	1,433	1,069	1,533	1,888	0,439	0,4175	0,4962	0,5328
Planta 14	1,571	1,255	1,417	0,927	0,3965	0,4918	0,5336	0,5124
Planta 15	1,252	0,727	1,868	1,428	0,4197	0,4784	0,5278	0,4586
<b>Média</b>	1,39367	1,201	1,503	1,30867	0,42521	0,4583	0,47311	0,47552
<b>Desvio</b>	0,26265	0,242	0,232049	0,31333	0,0331	0,0277	0,03407	0,07094

Tamanho e volume nas classes de diâmetro

**Tamanho (cm) entre os diâmetros de  
0,0 a 0,5 mm**

	<b>Isolado parental</b>	<b>Planta</b>	<b>Δthcfem 1ª</b>	<b>Δthcfem 2ª</b>
Planta 1	943,109	601	663,1619	649,486
Planta 2	998,398	582,1	794,3909	754,92
Planta 3	784,203	523,7	653,6603	743,975
Planta 4	482,122	433,8	564,6603	605,463
Planta 5	698,452	506,7	443,9461	526,322
Planta 6	878,791	674,4	673,7044	766,385
Planta 7	720,147	374	585,5043	387,303
Planta 8	751,311	580,4	665,5851	421,298
Planta 9	576,244	474,6	870,5339	356,434
Planta 10	816,626	996,2	567,1606	738,907
Planta 11	531,837	489,3	687,6416	463,833
Planta 12	903,471	663,3	683,1283	432,199
Planta 13	733,14	613,7	558,336	573,972
Planta 14	1023,65	480,2	435,6244	315,461
Planta 15	712,884	288	599,4871	633,972
<b>Média</b>	770,293	552,1	629,7683	557,995
<b>Desvio</b>	156,676	156,2	110,9125	150,364

**Volume (cm³) entre os diâmetros de  
0,0 a 0,5 mm**

	<b>Isolado parental</b>	<b>Planta</b>	<b>Δthcfem 1ª</b>	<b>Δthcfem 2ª</b>
	0,5196	0,3809	0,3488	0,321
	0,5079	0,401	0,4229	0,4059
	0,453	0,3226	0,3426	0,361
	0,3029	0,2824	0,2927	0,3738
	0,4376	0,3234	0,2708	0,336
	0,5172	0,373	0,3628	0,4656
	0,4371	0,2181	0,3362	0,2308
	0,4618	0,3293	0,3856	0,261
	0,3612	0,2656	0,4638	0,2234
	0,4512	0,4935	0,3146	0,3583
	0,2822	0,2537	0,3926	0,2376
	0,4893	0,3472	0,4058	0,227
	0,4426	0,3088	0,324	0,3348
	0,5738	0,3209	0,2884	0,1772
	0,3948	0,1783	0,3543	0,3484
	0,44215	0,3199	0,35373	0,31079
	0,07742	0,0746	0,05161	0,07799

**Tamanho (cm) entre os diâmetros de  
0,5 a 1,0 mm**

	<b>Isolado parental</b>	<b>Planta</b>	<b>Δthcfem 1ª</b>	<b>Δthcfem 2ª</b>
Planta 1	231,073	210,4	165,1899	137,376
Planta 2	188,746	193,4	201,0668	127,584
Planta 3	192,519	175,9	202,242	157,569
Planta 4	181,238	140,3	153,7637	213,752
Planta 5	251,513	127,9	166,1024	130,902
Planta 6	240,07	171,1	172,8401	213,388
Planta 7	199,812	125,4	192,3891	150,648
Planta 8	205,417	201,5	190,7655	147,649
Planta 9	129,048	130,6	220,0089	140,871
Planta 10	141,186	196,4	156,8062	149,916
Planta 11	122,337	125,7	202,7051	106,601
Planta 12	178,144	174,5	232,5828	127,6
Planta 13	187,528	142,9	186,7929	205,478
Planta 14	225,509	147,8	150,0019	102,856
Planta 15	170,563	98,45	185,4583	193,85
<b>Média</b>	189,647	157,5	185,2477	153,736
<b>Desvio</b>	37,2882	32,75	23,5823	35,2652

**Volume (cm³) entre os diâmetros de  
0,5 a 1,0 mm**

	<b>Isolado parental</b>	<b>Planta</b>	<b>Δthcfem 1ª</b>	<b>Δthcfem 2ª</b>
	0,8434	0,8379	0,636	0,4962
	0,6738	0,7356	0,7978	0,4502
	0,7081	0,6861	0,7589	0,565
	0,7023	0,5374	0,5892	0,856
	0,9539	0,4886	0,6641	0,5032
	0,93	0,6607	0,6454	0,8086
	0,7934	0,4759	0,765	0,6139
	0,7703	0,7811	0,7595	0,5931
	0,4893	0,5244	0,856	0,608
	0,514	0,7415	0,622	0,5724
	0,4248	0,4872	0,7965	0,4065
	0,6076	0,6653	0,9229	0,5077
	0,7177	0,5404	0,7466	0,8602
	0,8112	0,583	0,6281	0,399
	0,6401	0,3725	0,7731	0,7592
	0,70533	0,6078	0,73074	0,59995
	0,14865	0,1286	0,09287	0,14907

**Tamanho (cm) entre os diâmetros de  
1,0 a 1,5 mm**

**Volume (cm³) entre os diâmetros de  
1,0 a 1,5 mm**

	Isolado parental	Planta	$\Delta$ thcfem 1ª	$\Delta$ thcfem 2ª	Isolado parental	Planta	$\Delta$ thcfem 1ª	$\Delta$ thcfem 2ª
Planta 1	21,1157	24,18	25,4249	11,242	0,2398	0,2785	0,2937	0,1258
Planta 2	20,4281	23,17	37,9656	13,2196	0,2255	0,2656	0,4378	0,149
Planta 3	26,9564	15,34	28,3457	16,0165	0,3077	0,1688	0,3182	0,1788
Planta 4	20,0611	19,23	21,8928	32,0504	0,2242	0,2138	0,2513	0,3621
Planta 5	26,6595	13,47	30,5392	21,2121	0,298	0,1482	0,3434	0,2425
Planta 6	31,2929	32,71	24,2605	28,3033	0,3519	0,3661	0,2707	0,3147
Planta 7	24,1271	23,71	39,3986	33,1871	0,2646	0,2592	0,448	0,3785
Planta 8	30,0544	30,96	36,2117	38,2754	0,3353	0,3459	0,4058	0,446
Planta 9	21,4678	23,12	38,2058	45,2229	0,2453	0,2598	0,4307	0,5221
Planta 10	12,5691	27,82	28,9684	29,0847	0,1432	0,3164	0,3272	0,3355
Planta 11	9,6146	22,11	42,5641	23,1425	0,1057	0,247	0,489	0,273
Planta 12	13,2767	25,58	45,228	38,8235	0,1484	0,2867	0,515	0,4464
Planta 13	20,7487	20,6	38,1751	48,3445	0,2403	0,2362	0,4405	0,5468
Planta 14	18,9913	24,65	38,8236	23,2346	0,2082	0,282	0,4369	0,2674
Planta 15	16,8325	14,79	49,9062	29,8546	0,1943	0,1633	0,5775	0,3333
<b>Média</b>	20,9464	22,76	35,06068	28,7476	0,23549	0,2558	0,39905	0,32813
<b>Desvio</b>	6,04667	5,349	7,865252	10,6714	0,06794	0,0612	0,09153	0,12293

**Tamanho (cm) entre os diâmetros de 1,5 a 2,0 mm**

	Isolado parental	Planta	$\Delta$ thcfem 1ª	$\Delta$ thcfem 2ª
Planta 1	4,2216	4,445	6,1626	2,6835
Planta 2	2,0481	5,939	6,3572	3,84
Planta 3	5,5686	2,396	4,1388	3,5708
Planta 4	3,7652	2,502	2,9338	6,2418
Planta 5	4,6059	0,954	4,0144	4,2201
Planta 6	6,6747	6,625	3,4531	5,7033
Planta 7	4,8412	4,693	6,5426	7,9441
Planta 8	5,4304	5,605	7,2786	13,6914
Planta 9	4,9738	5,126	7,1048	13,0945
Planta 10	1,1584	4,672	6,7949	5,7609
Planta 11	0,5346	2,943	9,1157	5,8783
Planta 12	1,4792	4,433	10,5615	9,3992
Planta 13	4,9821	2,864	6,7104	13,4472
Planta 14	3,6448	6,304	7,8008	4,6037
Planta 15	3,4103	2,283	11,7991	5,2971
<b>Média</b>	3,82259	4,119	6,717887	7,02506
<b>Desvio</b>	1,73209	1,64	2,413742	3,57696

**Volume (cm<sup>3</sup>) entre os diâmetros de 1,5 a 2,0 mm**

	Isolado parental	Planta	$\Delta$ thcfem 1ª	$\Delta$ thcfem 2ª
	0,0966	0,1004	0,1441	0,0628
	0,0462	0,1362	0,1432	0,0869
	0,125	0,0553	0,0922	0,0828
	0,0835	0,0575	0,0682	0,1425
	0,1055	0,0202	0,0898	0,0977
	0,1561	0,1507	0,0771	0,1262
	0,109	0,1096	0,1487	0,183
	0,1247	0,1297	0,1667	0,317
	0,1161	0,1151	0,1589	0,3132
	0,0261	0,1033	0,1555	0,1263
	0,011	0,0652	0,2057	0,137
	0,0344	0,1021	0,2385	0,2082
	0,1153	0,0643	0,1529	0,3052
	0,0832	0,145	0,1752	0,1048
	0,0756	0,0511	0,273	0,1168
<b>Média</b>	0,08722	0,0937	0,15265	0,16069
<b>Desvio</b>	0,04023	0,0379	0,0554	0,08355

**Tamanho (cm) entre os diâmetros de 2,0 a 2,5 mm**

**Volume (cm<sup>3</sup>) entre os diâmetros de 2,0 a 2,5 mm**



	Isolado parental	Planta	$\Delta$ thcfem 1ª	$\Delta$ thcfem 2ª	Isolado parental	Planta	$\Delta$ thcfem 1ª	$\Delta$ thcfem 2ª
Planta 1	0,9075	1,481	1,6655	0,4331	0,0321	0,0581	0,0636	0,0158
Planta 2	0,2236	1,843	1,2539	0,7877	0,0084	0,068	0,0461	0,0276
Planta 3	1,1727	1,336	1,2558	0,1805	0,0427	0,048	0,0468	0,0073
Planta 4	0,6924	1,077	0,9406	1,7898	0,0246	0,0388	0,0342	0,0669
Planta 5	0,6999	0,181	1,0194	1,1638	0,0261	0,0066	0,038	0,0437
Planta 6	2,6049	1,392	0,4656	1,3169	0,1018	0,0548	0,0168	0,0496
Planta 7	0,9588	1,077	2,8349	1,4635	0,0362	0,0408	0,1067	0,0536
Planta 8	1,1643	1,638	1,7253	6,0414	0,0431	0,0614	0,062	0,2288
Planta 9	1,2255	0,663	1,0015	7,348	0,0451	0,0241	0,0379	0,2847
Planta 10	0,1013	0,832	2,0433	2,1761	0,0038	0,0302	0,0742	0,0813
Planta 11	0,1097	0,353	3,2606	1,636	0,0037	0,0126	0,1188	0,0589
Planta 12	0,168	0,723	3,3076	2,4586	0,0056	0,0263	0,1208	0,0862
Planta 13	0,5048	0,647	2,2777	3,8603	0,0187	0,0241	0,0836	0,1456
Planta 14	0,516	1,494	1,3575	2,3786	0,0185	0,0584	0,0496	0,0885
Planta 15	0,7614	0,796	4,2808	1,3821	0,0263	0,0285	0,1642	0,0532
<b>Média</b>	0,78739	1,035	1,912667	2,29443	0,02911	0,0387	0,07089	0,08611
<b>Desvio</b>	0,61275	0,471	1,042707	1,94468	0,02381	0,0182	0,0393	0,07498

**Tamanho (cm) entre os diâmetros de 2,5 a 3,0 mm**

	Isolado parental	Planta	$\Delta$ thcfem 1ª	$\Delta$ thcfem 2ª
Planta 1	0,1695	0,169	0,1822	0
Planta 2	0	0,345	0,1977	0,1476
Planta 3	0,1434	0,098	0,1455	0
Planta 4	0,2468	0,078	0,0724	0,0865
Planta 5	0	0,106	0,218	0,4415
Planta 6	0,9402	0,518	0,0359	0,4436
Planta 7	0,199	0,292	0,1771	0,6764
Planta 8	0,1185	0,226	0,3308	2,9131
Planta 9	0,2595	0,096	0,2714	3,5701
Planta 10	0	0,358	0,4394	0,3783
Planta 11	0	0	1,0252	0,2493
Planta 12	0	0,191	1,3021	0,2137
Planta 13	0,0394	0,12	0,6062	1,445
Planta 14	0,0485	0,249	0	0,5041
Planta 15	0	0,121	2,4507	0,1689
<b>Média</b>	0,14432	0,198	0,496973	0,74921
<b>Desvio</b>	0,2319	0,131	0,630883	1,04282

**Volume (cm<sup>3</sup>) entre os diâmetros de 2,5 a 3,0 mm**

	Isolado parental	Planta	$\Delta$ thcfem 1ª	$\Delta$ thcfem 2ª
	0,0104	0,0089	0,0105	0
	0	0,0178	0,0111	0,0082
	0,0075	0,0057	0,0081	0
	0,0133	0,0053	0,0036	0,0044
	0	0,0053	0,0135	0,0253
	0,0537	0,0304	0,0021	0,0272
	0,0105	0,0169	0,0109	0,037
	0,0067	0,0126	0,0178	0,1649
	0,0165	0,0054	0,0155	0,2052
	0	0,021	0,0249	0,0214
	0	0	0,0574	0,0133
	0	0,011	0,0696	0,0116
	0,0023	0,0066	0,0339	0,0849
	0,0029	0,0135	0	0,0286
	0	0,0062	0,1458	0,0093
<b>Média</b>	0,00825	0,0111	0,02831	0,04275
<b>Desvio</b>	0,01328	0,0076	0,0368	0,05978

**Tamanho (cm) entre os diâmetros de 3,0 a 3,5 mm**

**Volume (cm<sup>3</sup>) entre os diâmetros de 3,0 a 3,5 mm**

	Isolado parental	Planta	$\Delta$ thcfem 1ª	$\Delta$ thcfem 2ª	Isolado parental	Planta	$\Delta$ thcfem 1ª	$\Delta$ thcfem 2ª
Planta 1	0,0119	0,018	0,1596	0	0,0009	0,0013	0,0125	0
Planta 2	0	0,076	0	0,0844	0	0,0057	0	0,0065
Planta 3	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 4	0,0661	0,045	0	0	0,0049	0,0043	0	0
Planta 5	0,1892	0	0,064	0,0422	0,0149	0	0,0051	0,0032
Planta 6	0,436	0,252	0	0,069	0,0359	0,0207	0	0,0065
Planta 7	0	0,32	0	0,0885	0	0,0264	0	0,0071
Planta 8	0	0	0	1,1216	0	0	0	0,0957
Planta 9	0,5588	0	0	1,7581	0,0456	0	0	0,1381
Planta 10	0	0	0,0605	0,0394	0	0	0,0045	0,003
Planta 11	0	0	0,0513	0,0893	0	0	0,0043	0,0068
Planta 12	0	0	0,0717	0,3376	0	0	0,0058	0,0283
Planta 13	0	0	0,045	0,142	0	0	0,0033	0,0112
Planta 14	0	0,067	0	0,3557	0	0,0055	0	0,0308
Planta 15	0	0	0,3756	0,2321	0	0	0,028	0,0189
<b>Média</b>	0,08413	0,052	0,05518	0,29066	0,00681	0,0043	0,00423	0,02374
<b>Desvio</b>	0,17058	0,096	0,096066	0,478	0,01395	0,0079	0,00721	0,03848

**Tamanho (cm) entre os diâmetros de 3,5 a 4,0 mm**

	Isolado parental	Planta	$\Delta$ thcfem 1ª	$\Delta$ thcfem 2ª
Planta 1	0	0	0,0091	0
Planta 2	0	0,179	0	0
Planta 3	0	0	0	0
Planta 4	0	0,099	0	0
Planta 5	0	0	0	0
Planta 6	0,0752	0,162	0	0,0183
Planta 7	0	0,063	0	0
Planta 8	0	0	0,0355	1,2516
Planta 9	0,0597	0	0	0,1708
Planta 10	0	0	0	0,0236
Planta 11	0	0	0	0,0858
Planta 12	0	0	0,0366	0,0436
Planta 13	0	0	0	0,0267
Planta 14	0	0,039	0	0
Planta 15	0	0	0,1344	0
<b>Média</b>	0,00899	0,036	0,014373	0,10803
<b>Desvio</b>	0,0231	0,06	0,0343	0,30892

**Volume (cm<sup>3</sup>) entre os diâmetros de 3,5 a 4,0 mm**

	Isolado parental	Planta	$\Delta$ thcfem 1ª	$\Delta$ thcfem 2ª
Planta 1	0	0	0,001	0
Planta 2	0	0,019	0	0
Planta 3	0	0	0	0
Planta 4	0	0,0112	0	0
Planta 5	0	0	0	0
Planta 6	0,0073	0,0184	0	0,0018
Planta 7	0	0,0066	0	0
Planta 8	0	0	0,0039	0,1336
Planta 9	0,0069	0	0	0,0174
Planta 10	0	0	0	0,0028
Planta 11	0	0	0	0,0091
Planta 12	0	0	0,0039	0,0044
Planta 13	0	0	0	0,0026
Planta 14	0	0,0042	0	0
Planta 15	0	0	0,0137	0
<b>Média</b>	0,00095	0,004	0,0015	0,01145
<b>Desvio</b>	0,00241	0,0066	0,00352	0,03297

**Tamanho (cm) entre os diâmetros de 4,0 a 4,5 mm**

Isolado parental	Planta	$\Delta$ thcfem 1ª	$\Delta$ thcfem 2ª
------------------	--------	--------------------	--------------------

**Volume (cm<sup>3</sup>) entre os diâmetros de 4,0 a 4,5 mm**

Isolado parental	Planta	$\Delta$ thcfem 1ª	$\Delta$ thcfem 2ª
------------------	--------	--------------------	--------------------

Planta 1	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 2	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 3	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 4	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 5	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 6	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 7	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 8	0	0	0,0717	0	0	0	0,0103	0
Planta 9	0	0	0	0,1484	0	0	0	0,021
Planta 10	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 11	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 12	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 13	0	0	0	0,0359	0	0	0	0,0055
Planta 14	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 15	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Média</b>	0	0	0,00478	0,01229	0	0	0,00069	0,00177
<b>Desvio</b>	0	0	0,017885	0,03746	0	0	0,00257	0,00532

**Tamanho (cm) entre os diâmetros maiores que 4,5 mm**

**Volume (cm<sup>3</sup>) entre os diâmetros maiores que 4,5 mm**

	Isolado parental	Planta	Δthcfem		Isolado parental	Planta	Δthcfem	
			1ª	2ª			1ª	2ª
Planta 1	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 2	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 3	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 4	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 5	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 6	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 7	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 8	0	0	0	0,0302	0	0	0	0,0063
Planta 9	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 10	0	0	0	0,1111	0	0	0	0,0206
Planta 11	0	0	0	0,0359	0	0	0	0,0064
Planta 12	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 13	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 14	0	0	0	0	0	0	0	0
Planta 15	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Média</b>	0	0	0	0,01181	0	0	0	0,00222
<b>Desvio</b>	0	0	0	0,02881	0	0	0	0,00536