

Universidade de Brasília

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

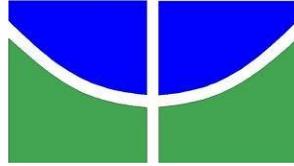
**Estudo da interação entre *Trichoderma harzianum* e *Phaseolus vulgaris* utilizando a técnica de transformação aleatória por *Agrobacterium tumefaciens* (AMT).**

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

**Brasília, DF**

**Dezembro de 2018**



**Estudo da interação entre *Trichoderma harzianum* e *Phaseolus vulgaris* utilizando a técnica de transformação aleatória por *Agrobacterium tumefaciens* (AMT).**

**Dissertação de Mestrado**

Banca Examinadora

---

*Prof. Dr. Marcelo Henrique Soller Ramada*

---

*Profa. Dr<sup>a</sup>. Cíntia Marques Coelho*

---

*Prof Dr. Tatsuya Nagata (suplente)*

---

*Prof. Dr<sup>a</sup>. Eliane Ferreira Noronha*  
*(Presidente)*

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Eliane F. Noronha, por toda a compreensão desse processo.

A Fran, pela paciência e doçura, Débora, pela fibra e perspicácia, Mariana, Jovane e Gabi, pelo ânimo e boas idéias – e a pelo auxílio nas diferentes etapas. Vocês me fizeram experimentar o que é equipe.

Ao Pedro Hamann, sempre disposto a ajudar, e a Rosana.

Aos meus amigos e colegas Bia e Nicholas, que me inspiram a admirar e respeitar a ciência e pelos bons momentos juntos, que não me deixam desistir.

Aos colegas Andreza, Alonso, Antonielle, Caio, Helder, Jovane, Jessica, Julianna, Raíssa; Raul, Sadia; pelas horas agradáveis e apoio constante.

A Luciana, a melhor secretária do mundo.

A Marisia e Margarete, pelo suporte.

Às minhas amigas do peito Rosane e Silviene, por me conhecerem melhor do que eu.

Ao meu filho, Arthur.

Gratidão!

## Resumo

Espécies de *Trichoderma* já são utilizadas mundialmente no controle biológico de fungos fitopatogênicos em diferentes culturas. Além de sua atividade micoparasita, *Trichoderma spp* também se associa com plantas hospedeiras de forma simbiote, podendo promover seu crescimento, induzir sua resposta de defesa e resistência contra subsequentes infecções fúngicas. *Trichoderma spp* colonizam as raízes de plantas hospedeiras alterando o padrão de expressão de genes e consequentemente o seu proteoma. Esta alteração pode ser mediada por estruturas presentes na parede celular destes fungos (MAMPs), por moléculas liberadas pela modificação da parede celular fúngica ou da planta hospedeira (DAMPs) ou pela ação de proteínas que são secretadas durante a interação. No presente trabalho, a técnica de transformação aleatória por *Agrobacterium tumefaciens* foi utilizada para a geração de uma biblioteca de transformantes de *Trichoderma harzianum* TR274 e identificar genes que possam ter papel na sua interação com feijoeiro. Mudanças no padrão de produção de conídios, crescimento e de produção de proteases foram critérios inicialmente utilizados para a triagem dos transformantes. Dez transformantes apresentaram valores de atividade proteolítica inferiores ao obtido para o isolado selvagem (parental). Dois destes, T49 e T136, foram posteriormente utilizados em experimentos de co-cultivo com *Phaseolus vulgaris* (feijoeiro comum) para avaliar alterações de parâmetros morfométricos e susceptibilidade de feijoeiro ao patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Foram detectadas mudanças significativas no comprimento, peso seco e volume de raiz para plantas cultivadas na presença de *T. harzianum* selvagem e transformantes em comparação com plantas cultivadas na ausência destes. Foi observada uma maior suscetibilidade de feijoeiro à infecção por *S. sclerotiorum* para as plantas cultivadas na presença dos transformantes (T49 e T136) sugerindo que, embora não tenha sido possível a identificação de genes relativos a proteases, o fenótipo apresentado guarda estreita relação no estabelecimento da simbiose.

## Abstract

*Trichoderma* species are already used worldwide in the biological control of phytopathogenic fungi in different cultures. In addition to its mycoparasite activity, *Trichoderma* spp also associates with host plants symbiotically, and can promote plant growth, induce its defense response and resistance against subsequent fungal infections. *Trichoderma* spp colonize roots of host plants and alter host gene expression pattern and consequently its proteome. This modification can be mediated by structures present in the cell wall of these fungi (MAMPs), by molecules released by the modification of the fungal cell wall or host plant (DAMPs) or by action of proteins secreted during interaction. In the present work, the technique of random transformation by *Agrobacterium tumefaciens* (AMT) was used to generate a library of *Trichoderma harzianum* TR274 transformants seeking to identify genes that may play a role in the interaction with common bean. Changes in the pattern of conidia production, growth and protease production were criteria initially used for screening. Ten transformants showed lower values of proteolytic activity than those of the wild (parental) isolate. Two of these, T49 and T136, were later tested in cocultivation experiments with common bean to evaluate changes in plants' morphometric parameters and susceptibility to the pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. Significant changes were detected in length, dry weight and root volume for plants grown in the presence of transformants compared to plants grown in the absence of *T. harzianum*, as opposed to the wild type. In addition, a higher susceptibility of common bean to *S. sclerotiorum* infection was observed for the plants grown in the presence of the transformants (T49 and T136) suggesting that, although it was not possible to identify the genes related to proteases, the screened phenotype keeps a close relation in the establishment of symbiosis.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	VIII
2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	11
2.1 CONTROLE BIOLÓGICO.....	11
2.2 GÊNERO <i>Trichoderma</i> .....	12
2.3 INTERAÇÃO PLANTA- <i>Trichoderma</i> spp.....	15
2.4- IMUNIDADE EM PLANTAS E INDUÇÃO DA RESPOSTA IMUNE POR <i>Trichoderma</i> ssp. ....	17
2.5 PROTEASES NA INTERAÇÃO SIMBIÓTICA .....	27
2.6 <i>Phaseolus vulgaris</i> E DOENÇAS FÚNGICAS .....	30
2.7 TRANSFORMAÇÃO INSERCIONAL ALEATÓRIA MEDIADA POR <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> .....	31
3. OBJETIVO GERAL .....	35
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	36
4. 1 <i>Fungos filamentosos: obtenção e manutenção</i> .....	36
4.3 Triagem da biblioteca de transformantes .....	37
4. 4 Bioensaios: cultivo de feijoeiro comum em associação com <i>T. harzianum</i> (isolado parental e transformantes) .....	39
4.5 <i>Teste de suscetibilidade</i> .....	40
4.6 <i>Análise dos transformantes para identificação do gene nocauteado</i> .....	40
4.6.1 Localização da região genômica adjacente ao T-DNA .....	40
4.6.2 Clonagem e amplificação .....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
5.1 <i>Triagem da biblioteca de transformantes</i> .....	47
5. 2 <i>Determinação dos parâmetros morfométricos do feijoeiro em co-cultivo com</i> <i>T.harzianum</i> .....	50
5.3 <i>Teste de susceptibilidade à S. sclerotiorum</i> .....	52
5.4 <i>Identificação do gene nocauteado nos transformantes</i> .....	54
6 –CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	57

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
DADOS SUPLEMENTARES .....	77

## LISTA DE FIGURAS

Fig 1. Modelo Zig-Zag do sistema imune em plantas segundo.....	20
Fig 2. Vias de ativação e desenvolvimento de resistência sistêmica nos vegetais .....	22
Fig. 3. Controle biológico promovido por <i>Trichoderma</i> spp .....	24
Fig 4. Plasmídeo Ti de <i>Agrobacterium.tumefaciens</i> .....	32
Fig 5. Mapa do vetor pFAT-gfp usado na transformação .....	37
Fig 6. Técnica de TAIL-PCR.....	41
Fig 7. Mapa da construção pCR 4-TOPO+amplicon da reação terciária .....	46
Fig. 8. Média da da atividade proteolítica (U/ml) .....	47
Fig. 9. Determinação da atividade proteolítica (U/ml/g).....	49
Fig. 10 Média dos parâmetros morfométricos.....	51
Fig. 11. Teste de susceptibilidade de feijoeiro à <i>S.sclerotiorum</i> .....	53
Fig. 12. Análise da clonagem dos produtos da TAIL-PCR.....	55
Fig 13. Sequências recuperadas da clonagem em vetor 4TOPO.....	55

## 1. INTRODUÇÃO

Controle biológico é a utilização de um organismo para controle de outro. O uso de fungicidas sintéticos em lavouras, apesar de causar danos ao ambiente e à ecologia dos solos (promovendo a seleção de patógenos mais resistentes) e ter um comprovado grau de toxicidade ao consumidor dos cultivares, ainda domina largamente o mercado agrícola. Uma das razões da preferência destes aos agentes de controle biológico é a falta de previsibilidade do grau de efetividade da aplicação destes últimos em culturas diversas, dadas as linhagens dos organismos e condições do campo serem diferentes em cada região do mundo e também espécies vegetais cultivadas.

Dentre os agentes de controle biológico, *Trichoderma* spp. tem especial destaque. *Trichoderma* spp é um gênero de fungos filamentosos saprófitos que desempenham um papel de simbiote com as mais diversas espécies vegetais. O resultado dessa relação de simbiose nas plantas se verifica como aumento do vigor, crescimento, alteração na estrutura radicular e maior resistência a outros microorganismos, especialmente fungos fitopatogênicos. Esse gênero ainda apresenta atividade micoparasítica e, por essas razões, tem um histórico como agente de controle biológico em co-cultivo com plantas.

Isolados de algumas linhagens dessa espécie têm impacto comprovado na promoção do crescimento de raízes e no aumento da biomassa de plantas colonizadas, além de, em certo grau, promover nelas a indução de resistência sistêmica. *Trichoderma harzianum*, além ser uma das espécies mais empregadas atualmente em preparações comerciais para controle biológico no mundo, é uma das mais comuns no Brasil.

O estudo dos processos envolvidos no controle biológico objetiva a reprodutibilidade de resultados para o emprego de *Trichoderma* spp. Além de trabalhos sobre mecanismos de micoparasitismo e antibiose de *Trichoderma* contra outras espécies fúngicas, estudos com o enfoque na elucidação de mecanismos de indução de resistência sistêmica nas plantas vêm crescendo em proporção.

Diversas moléculas já tiveram seus papéis descritos na cadeia de eventos que culmina na preparação, ou *priming*, do vegetal para uma maior resistência a posteriores tentativas de invasão por patógenos. No entanto, o processo é complexo, envolve mais de uma via de sinalização e depende de inúmeros fatores, como condições climáticas, perfil genético de linhagens de ambos simbiontes e até mesmo quantidade de esporos de

*Trichoderma* spp. presentes no solo. Ainda assim, a simples identificação das classes de compostos envolvidos nesse processo já propicia a inúmeras possibilidades de manipulação genética para obtenção de linhagens mais eficazes no controle biológico. A seleção de fenótipos com características específicas, para posterior correlação com resultados, pode abrir linhas de aprofundamento dos estudos e enriquecer a compreensão de como se dão os processos biológicos nesse cenário.

Dentre as diversas técnicas moleculares utilizadas para a identificação de genes relacionados a processos biológicos há algumas mais ou menos adequadas, a depender do escopo do estudo. Mutações sítio-dirigidas, por exemplo, se destinam ao estudo de funções de uma proteína específica. Já as mutações aleatórias são úteis para o estudo de fenótipos de interesse com causas diversas a serem selecionados por triagem, o que pode contribuir para a elucidação de vias metabólicas. Técnicas de transformação, que incorporam DNA conhecido na célula, são muito empregadas para fungos filamentosos. Na transformação aleatória o intuito da incorporação de material genético é a interrupção de sequências do DNA do transformante e pode ou não envolver vetores. Por exemplo, a técnica de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utiliza o plasmídeo Ti dessa bactéria para incorporação em uma região específica no genoma alvo, sendo uma das técnicas de maior eficácia.

Proteínas, mais particularmente enzimas, são os agentes dos processos metabólicos, desempenhando as reações anabólicas e catabólicas que permitem o funcionamento dos organismos. Estão envolvidas também em reações de sinalização, que modulam todas as funções celulares e culminam na transcrição e regulação da expressão gênica.

Enzimas relacionadas à característica saprofítica do gênero *Trichoderma*, como as glicohidrolases, vêm sendo exploradas industrialmente na degradação de biomassa. No caso da característica simbiote, ocorre uma troca intensa de sinais biológicos na interação entre indivíduos e espécies, o que justifica o estudo de diferentes classes de enzimas. Dentre essas, as que participam no processamento específico de proteínas são de particular interesse.

Como as vias sintéticas e de sinalização operam em homeostase entre síntese e degradação de proteínas, que regulam, por sua vez, a produção de outras moléculas, enzimas que atuam diretamente sobre as proteínas podem ter um impacto profundo nos

processos biológicos de *Trichoderma* spp., o que se reflete nos mecanismos que estabelecem a relação simbiótica, que pode resultar em promoção do crescimento e indução de resistência a patógenos no vegetal hospedeiro.

O foco deste trabalho é a investigação desses mecanismos a partir da estratégia de transformação aleatória, utilizando-se do maquinário de *Agrobacterium tumefaciens*, de uma variedade de *Trichoderma harzianum* e triagem pelo fenótipo de secreção diminuída de proteases. Com isso, busca-se uma perspectiva sobre a interação que resulta no desenvolvimento da imunidade e promoção do crescimento das plantas em co-cultivo com este fungo.

No Brasil, uma das culturas mais importantes afetadas por doenças fúngicas é o feijão (*Phaseolus vulgaris*). O feijão, uma leguminosa de imensa importância socioeconômica, é uma das principais fontes nutricionais dos brasileiros. Contudo, sua produção está aquém do seu potencial em grande parte devido à presença de fitopatógenos. No Brasil, dentre os sete maiores fitopatógenos do feijoeiro, seis são fungos (dentre eles o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do “mofo branco”). Por esta razão, foi escolhido como modelo vegetal (feijoeiro), e, como desafio patogênico, o fungo necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum*, pela importância econômica que estes últimos representam.

## 2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CONTROLE BIOLÓGICO

Mesmo trazendo muitas consequências indesejáveis, por sua efetividade os defensivos agrícolas sintéticos são predominantemente utilizados em detrimento de outros tipos de controle de doenças e pragas. Ainda assim, seu desempenho não é muito eficiente sobre doenças fúngicas, que correspondem a aproximadamente 70% das doenças que assolam grandes cultivos (Carris; Little; Stiles, 2012). Como observado por Savci (2012), o manejo intensivo de agroecossistemas para aumentar a produtividade e reduzir as doenças causadas por fungos levou à diminuição da biodiversidade do solo, aumento das doenças das plantas e redução da produtividade das culturas, resultando em efeitos prejudiciais às culturas de subsistência e econômicas.

Uma fração pequena, mas promissora, do mercado de combate a doenças e pragas é baseada em biofungicidas que desempenham o controle biológico sem os efeitos indesejados dos fungicidas sintéticos. A ampla definição de controle biológico proposta por Cook e Baker (1983) é a redução da quantidade de inóculo ou da atividade de produção de doença de um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem. Essa ampla definição inclui o uso de patógenos menos virulentos, cultivares mais resistentes do hospedeiro e antagonistas microbianos que interferem na sobrevivência do patógeno ou redução da doença causada por estes.

Como o controle biológico é resultado de muitos tipos diferentes de interações entre os microrganismos, pesquisadores vem se concentrando na caracterização de mecanismos que ocorrem em diferentes situações experimentais e de campo. Em todos os casos, os patógenos são antagonizados pela presença e atividade de outros micro-organismos. Diferentes modos de ação de controle biológico de doenças fúngicas em plantas incluem micoparasitismo, definido como o ataque direto de um fungo a outro, por mecanismos que incluem secreção de enzimas líticas e penetração direta do hospedeiro por estruturas apressórias. (Kubicek *et al.*, 2001; Howell, 2003; McIntyre *et al.*, 2004); antibiose: secreção de toxinas que podem, em baixas concentrações, suprimir o crescimento ou matar outros microrganismos, como bactérias e fungos; competição por nutrientes e recursos, como por fontes de carbono, oxigênio, espaço e, mesmo, luz. A competição por micronutrientes raros mas essenciais, como o ferro, também tem se mostrado importante no controle biológico de doenças; indução de resistência na planta hospedeira:

condicionamento do sistema de defesa do vegetal por meio de mudanças bioquímicas que culminam no aumento da resistência contra a infecção subsequente por uma variedade de fitopatógenos. A indução das defesas do hospedeiro pode ser de natureza local e/ou sistêmica, a depender do tipo, fonte e quantidade de agentes estimulantes (Howell, 2003, Harman *et al.*, 2004).

## 2.2 GÊNERO *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma*, filo Ascomycota, é composto por fungos filamentosos de vida livre, ubíquos em solo e matéria orgânica em decomposição. Têm conidiação abundante, crescimento rápido e, sendo saprófitos, apresentam capacidade de metabolizar uma vasta gama de substratos vegetais. Como característica, o micélio tem inicialmente coloração branca e crescimento rápido e se desenvolve em tufo. A coloração da colônia ocorre de acordo com a tonalidade e quantidade de conídios presentes, podendo apresentar variações que vão do verde escuro ao verde amarelado. Os conídios são estruturas de reprodução unicelulares de forma subglobosa, ovoide ou elipsoide. Essas estruturas são comumente observadas no ápice das células conidiogênicas, ou fiálides. As fiálides têm forma de cantil, com o centro dilatado e o ápice afilado, formando ângulo com os conidióforos (Waller, 1993; Schuster e Schmoll, 2010).

A classificação de fungos deste gênero baseada em critérios morfológicos é difícil, devido à variabilidade de características morfológicas intra e interespecíficas. Um número crescente de teleomorfos em *Hypocrea* tem sido associado a anamorfos de *Trichoderma*, mas a maioria das cepas de *Trichoderma* são classificadas como fungos imperfeitos porque não foram associados a um estado sexual (Gams e Bissett, 1998). Samuels *et al.*, (2006) e Druzhinina *et al.* (2005) estabeleceram protocolos de identificação moleculares das espécies por *DNA barcoding* além de ITS (*intra tag sequence*), o que resultou na descrição de marcadores filogenéticos para a descrição de 35 espécies distintas dentro do gênero *Trichoderma*. O uso destes novos marcadores filogenéticos moleculares refinou significativamente a taxonomia em estudos de diversidade por análise filogenética, e o desenvolvimento de novos marcadores ainda é um campo de pesquisa ativo. Atualmente, mais de 260 espécies foram classificadas no gênero *Trichoderma* (Bissett *et al.*, 2015; Druzhinina *et al.*, 2018).

*Trichoderma* spp. empregam várias estratégias de sobrevivência e proliferação, utilizando-se de um arsenal metabólico notável que lhes confere resistência a muitos compostos tóxicos e capacidade de disponibilização de vasta gama de nutrientes, como carboidratos complexos (Kredics *et al.*, 2014). Espécies de *Trichoderma* são consideradas como os fungos mais prevalentes em solo, mas em estudo de metagenoma (Friedl e Druzhinina, 2012) verificou-se que de fato apenas uma pequena porção desse gênero é adaptada a este *habitat*. Cerca de 20% das espécies foram detectadas em ambientes de solo e rizosfera, com a maioria restante encontrada em outros nichos ecológicos.

Além de habitarem madeira em decomposição, fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidos por sua capacidade de parasitar outros fungos. Certas espécies e cepas adaptadas são capazes de colonizar a rizosfera e mesmo o interior de tecidos vegetais, podendo estas associações levar à promoção do crescimento vegetal ou à indução da resposta de defesa e resistência sistêmica a infecções fúngicas (CarrerasVillaSenor; Sanchez-Arreguin; Herrera-Estrella, 2012). Boa parte de suas linhagens são definidas como organismos avirulentos oportunistas simbiotes de plantas (Harman *et al.*, 2004).

A característica saprofítica desse gênero lhe confere um conjunto de hidrolases bastante vasto. A secreção dessas enzimas por espécies de *Trichoderma* é tida como chave para colonização de substratos diversos, mas também para ativação da cascata de defesa da planta hospedeira (Hermosa *et al.*, 2012). Celulases, quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases e proteases estão dentre as hidrolases secretadas, o que explica versatilidade ecológica desse gênero em diversos nichos (Landowski *et al.*, 2015; Atanasova, Druzhinina, 2010; Harman *et al.* 2004).

Inicialmente, conhecia-se apenas a atividade das proteases nos fungos filamentosos como enzimas exodigestivas na aquisição de nutrientes (Rao *et al.*, 1998). Porém, estudos subsequentes indicaram que essas proteases desempenham função na evasão imune durante as interações com seus hospedeiros, possibilitando o estabelecimento da simbiose (van der Hoorn, 2008; Naumann *et al.*, 2011, 2015).

A habilidade de parasitar fungos fitopatogênicos foi primeiramente descrita por Weindling em 1930. Devido a essa atividade, fungos deste gênero têm sido utilizados como agentes de controle biológico para doenças em plantas. Há cerca de vinte anos linhagens de *Trichoderma* spp. vêm sendo comercializadas em preparações para uso em controle biológico e promoção do crescimento de plantas (Howell, 1998). É o fungo mais

utilizado em preparações para controle biológico, isoladamente ou em associação com outras espécies. É apresentado em grânulos, conídios, pó molhável ou mesmo em *pellets* para aplicação em árvores. A espécie *T. harzianum* é a mais utilizada devido à sua forte atividade micoparasítica e promoção do crescimento vegetal. *Trianum*, um preparado de *T.harzianum* T22, traz como benefícios descritos o aumento da resistência das plantas a estresse abiótico e estresse causado por patógenos, em condições subótimas de nutrição e irrigação, além de aumentar a absorção de nutrientes pela planta e resultar em crescimento das raízes. É registrado na Holanda como biofortificante e vendido em diversos países, incluindo o Brasil. *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Pythium*, *Phomopsis*, *Rosellinia* e *Plasmodiophora* estão entre os gêneros de fungos sujeitos ao controle por essas preparações (EMBRAPA, 2011).

Dentre os mecanismos de controle biológico exercidos por *Trichoderma* spp., as atividades diretas não parasíticas sobre fungos fitopatogênicos são bastante conhecidas, como as capacidades de produzir e/ou resistir a metabólitos que impedem a germinação de esporos (fungistases), de matar células fúngicas (antibiose) ou de modificar a rizosfera, por exemplo acidificando o solo para que os patógenos não possam crescer (Benitez *et al.* 2004). Ocorre alta modulação, em *Trichoderma*, da expressão de enzimas degradadoras de parede celular tais como quitinases, glucanases e proteases, e outros compostos tóxicos antibióticos, peptaibols (Lorito *et al.* 1996a; Szekeres *et al.* 2005; Howell, 2003 e 2006). *Trichoderma* spp. também inibe, nos fungos patogênicos, enzimas necessárias para infecção e o parasitismo propriamente dito (Chett, 1996, Howell, 2003, Harman *et al.*, 2010).

A partir de estudos demonstrando que linhagens de *T. virens* silenciadas para habilidade micoparasítica retêm a capacidade de inibir doenças fúngicas em plantas de algodão (Howell, 1987; Howell, Stipanovic, 1995), vem sendo demonstrada a relevância de outros mecanismos de simbiose, como a revigoração e indução das respostas de defesa e resistência nas plantas (Djonovic *et al.*, 2007; Viterbo, 2011; Uhlikova *et al.*, 2016). A maioria das pesquisas no campo do controle biológico concentra-se no complexo *Trichoderma harzianum sensu lato*, *T. atroviride*, *T. virens*, *T. asperellum* e *T. asperelloides* (Druzhnina *et al.*, 2010).

O controle biológico indireto se dá pelo estabelecimento de uma simbiose com o hospedeiro vegetal. Dentre as mudanças observadas na planta estão o aumento da taxa de

germinação de sementes e a modificação da estrutura radicular para melhora da captação de nutrientes. Com isso, a planta apresenta um aumento do vigor e do crescimento e maior tolerância à seca, além do estímulo hormonal do crescimento (Shoresh *et al.*, 2010; Harman, 2011; Bae *et al.*, 2011, Stocco *et al.*, 2015). Em adição aos efeitos diretos sobre os patógenos e da capacidade de promover o crescimento, *Trichoderma* spp. também pode estimular os mecanismos de defesa das plantas, como a indução de resistência sistêmica. Os mecanismos moleculares que sustentam este efeito benéfico altamente desejável e da promoção do crescimento não são ainda totalmente esclarecidos (Lorito *et al.*; 2010, Pieterse et al, 2017)

Além do controle da doença, também foi observado que a fertilidade dos solos tratados com *Trichoderma* pode ser significativamente melhorada, o que aumenta a atratividade desses fungos para um uso geral na produção agrícola (Savci *et al.*, 2012). Poder contar com *Trichoderma* spp. como uma alternativa ao uso de fungicidas químicos sintéticos é interessante do ponto de vista ecológico e econômico. No entanto, para se aumentar o controle sobre os resultados, é necessário precisar seus mecanismos.

### 2.3 INTERAÇÃO PLANTA-*Trichoderma* spp.

A rizosfera é rica em exudatos de compostos de carbono como ácidos orgânicos e sacarose, tidos como quimiotáticos para simbiontes. Esta última é importante particularmente para *Trichoderma* spp. que, diferentemente de micorriza, utiliza sacarose (Bais *et al.*, 2006). Sugere-se que isso seja vantajoso para biotróficos, já que essa é uma distinção evidente entre material vivo e morto, pois os tipos de açúcar predominantes nessas condições são diferentes (sacarose e celulose, respectivamente) (Vargas, Kenerley, 2012). Os carboidratos, além de fonte de carbono, são moléculas sinalizadoras importantes utilizadas por planta e fungo, tornando a rizosfera propícia para a comunicação entre os partícipes (Badri e Vivanco, 2009; Vargas *et al.*, 2011; Pangesti *et al.*, 2013).

Uma vez presente na rizosfera, boa parte das espécies de *Trichoderma* tem capacidade rizocompetente. Algumas espécies utilizam estruturas morfológicas utilizadas também no micoparasitismo, semelhantes aos apressórios, para colonizar toda a superfície radicular. A interação se dá em diferentes níveis na região das raízes, e o

estabelecimento da relação simbiótica requer a colonização dos espaços intercelulares das primeiras camadas do córtex da raiz, com a penetração do tecido radicular geralmente limitada à segunda camada (Harman e Shores, 2007). Estes fungos comportam-se como endófitos, colonizando a epiderme radicular e as camadas corticais externas e liberando moléculas bioativas. *Trichoderma* spp. utiliza hidrolases, dentre elas proteases, na penetração no tecido radicular (Brotman *et al.*, 2008).

A colonização causa uma infecção assintomática das raízes e promove mudanças no metabolismo de plantas hospedeiras. Após seu estabelecimento, o fungo desencadeia alterações na formação de raízes, principalmente adventícias e laterais, o que ocorre em resposta a fatores endógenos da planta como o fitormônio auxina e a condições ambientais como luz e nutrientes. As auxinas, como o ácido indol-acético, também são produzidas pelo gênero *Trichoderma*, o que reforça a promoção do crescimento da raiz, levando assim a extensão da superfície para colonização. O aumento da estrutura radicular pode aumentar drasticamente o diâmetro total e a superfície absorptiva, e, com isso, a captação de nutrientes e água (Casimiro *et al.*, 2003; López-Bucio *et al.*, 2003; Péret *et al.*, 2009).

Esse resultado da interação aumenta a resistência da planta a estresses abióticos, como desequilíbrio hídrico, alta salinidade e temperatura extrema. Ainda, nutrientes do solo, como nitrogênio e fósforo, são transferidos para a planta na rizosfera, pois sofrem redução e são solubilizados e disponibilizados pelas hifas de *Trichoderma* spp. antes da absorção pelas raízes (Richardson *et al.*, 2009; Tallapragada e Gudini, 2011). Embora o efeito possa ser particularmente marcante em termos de promoção do crescimento radicular, a interação promove também o crescimento da parte aérea, no comprimento e espessura do caule, área foliar, teor de clorofila e floração, pela modulação da expansão e proliferação celular (Bailey, 2006; Alfano, 2007). Ainda, ocorre estímulo da expressão de genes relativos à fotossíntese e, como resultado, da produção aumentada de carboidratos, com conseqüente aumento da taxa de hidrólise da sacarose (Contreras-Cornejo *et al.*, 2011; Vargas *et al.*, 2009; Brotman *et al.*, 2012).

Os perfis genéticos das espécies envolvidas na simbiose têm relação direta com o grau da interação desenvolvida. A depender da variedade de planta e da espécie e linhagem de *Trichoderma*, o fungo impacta na taxa de germinação, floração e crescimento vegetativo, com grande predominância benéfica para o vigor da planta (Bailey, 2006).

Raramente uma combinação *Trichoderma*-planta tem efeito negativo sobre o vegetal observado (Mahato e Neupane, 2017), o que permite definir a relação como simbiote.

Diferentes linhagens de *T. harzianum*, em interação com milho, provocaram efeitos positivos, como aumento do metabolismo fotossintético e crescimento das raízes, ou negativos, como inibição do crescimento da parte aérea, a depender da variedade do cultivar testada (Harman e Shores, 2007; Shores e Harman, 2010; Saravanakumar *et al.*, 2017; Mahato e Neupane, 2017). Propágulos de *T. harzianum* mostraram aumento de 30% em taxa de germinação em milho oito dias após a semeadura; com três semanas, 95% de aumento na área radicular, e aumento significativo na parte aérea das folhas (Yedidia *et al.*, 2001, Vargas *et al.*, 2009). Adams *et al.* (2007) tiveram o resultado de 40% de aumento de mudas de árvores de *Salix Fragilis* inoculadas com *T. harzianum* em comparação com controle e 20% quando comparado a ectomicorriza, em cinco semanas. A biomassa total foi mais do que o dobro do controle e houve aumento de 50% em relação à interação ectomicorriza.

A simbiose promove crescimento e indução de resistência, que embora interligados, se dão por diferentes sinais moleculares de *Trichoderma* spp. Linhagens de *Trichoderma* eficazes em promover crescimento podem não o ser quanto à indução de resistência (Harman *et al.*, 2008; Azarmi *et al.*, 2011; Tuci *et al.*, 2011). A determinação do porquê dessas diferenças ocorrerem pode ajudar a desenhar linhagens que reúnam todas as características desejadas. Para tanto, é necessária uma compreensão dos mecanismos que a planta utiliza na regulação do crescimento e na resposta de defesa. Como a resposta a estresse tem relação estreita com o crescimento, com muitos hormônios intrincadamente envolvidos em ambos os processos, entender o estabelecimento da relação simbiote requer a compreensão da fisiologia de ambos os partícipes e da regulação mútua que desempenham (Aloni *et al.*, 2006; Hentrich *et al.*, 2013).

#### 2.4- IMUNIDADE EM PLANTAS E INDUÇÃO DA RESPOSTA IMUNE POR *Trichoderma* ssp.

As relações entre plantas e potenciais patógenos são caracterizadas por um complexo de interações em que um organismo busca sobrepujar-se ao outro (de Wit, 2007). A ativação de respostas de defesa da planta é desencadeada pelo

reconhecimento, por receptores, de organismos invasores. Esses receptores podem estar localizados na membrana e responder a estímulos extracelulares ou serem intracelulares e detectar elicitores derivados do invasor (Lapin e Van den Ackerveken, 2013).

Há dois tipos distintos de receptores imunes vegetais: os Receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern Recognition Receptors* - PRRs) e as proteínas de resistência R. Os PRRs contêm domínios extracelulares LRR (repetições ricas em leucina, *Leucine Rich Repeats*), domínios transmembrana e intracelulares. Já as proteínas de resistência R, receptores normalmente citosólicos, têm domínio NB-LRR (ligantes de nucleotídeos com repetições ricas em leucina, *Nucleotide-Binding Leucine Rich Repeats*,) (Tör et al., 2009; Couto e Zipfel, 2016).

Os receptores PRRs são responsáveis pela defesa inata ou basal e localizados na matriz extracelular ou na membrana plasmática. Reconhecem padrões moleculares conservados associados a patógenos ou microrganismos (*Pathogen or Microbial-Associated Molecular Patterns* - PAMPs ou MAMPs). Essas moléculas (PAMPs /MAMPs) são epítomos comuns em micro-organismos; no caso de fungos,  $\beta$ -glucanases, ergosterol ou quitina. Além dos PAMPs/MAMPs, também são reconhecidos os DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*, padrões moleculares associados a danos), substâncias endógenas produzidas ou liberadas por células vegetais mortas ou danificadas por infecções, lesões celulares assépticas (sem infecção), traumas, toxinas, entre outras causas (Nürnberg e Kemmerling; 2009; Boller e He, 2009). A ligação a essas moléculas inicia diversos eventos que visam à eliminação dos micro-organismos, desencadeando um processo de imunidade conhecido por PTI (*PAMP Triggered Immunity*, imunidade disparada por PAMPs) (Jones e Dangl, 2006).

A interação do PAMP/MAMP/DAMP com os receptores do tipo PRR ativa uma cascata de sinalização que envolve MAP-quinases (*mitogen activated protein*, proteína ativada por mitogênio). A produção de ROS é uma das primeiras respostas celulares após o reconhecimento do invasor (Di Matteo et al., 2003). As ROS podem ter papel na cascata de sinalização pela alteração rápida do potencial de oxirredução da célula, e são também ativas diretamente contra patógenos, pois são oxidantes fortes, interrompendo seus processos biológicos por oxidação lipídica, proteólise, ligação cruzada de proteínas (principalmente em resíduos de metionina e cisteína) e oxidação de açúcares de parede celular de fungos (Ray et al., 2012; Tsuda e Katagiri, 2010).

A PTI normalmente confere resistência de amplo espectro que restringe a colonização tecidual por patógenos. Essa linha de defesa vegetal inclui a ativação da defesa basal, como o reforço da parede celular e a síntese e o acúmulo de metabólitos antimicrobianos como fitoalexinas, espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS) e proteínas PR (*Pathogen Related*). Proteínas PR incluem enzimas antimicrobianas, como quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases, peroxidases, proteases e inibidores de proteases (PI) (Boller e Felix, 2009).

Alguns patógenos podem superar a PTI tornando as plantas suscetíveis à infecção. Para neutralizar a PTI e estabelecer a infecção em hospedeiros suscetíveis, os agentes patogênicos liberam fatores de virulência, que são proteínas efetoras, na célula hospedeira, bloqueando a cascata de sinalização por MAP-quinases. A doença então é o resultado desta susceptibilidade desencadeada por efetores (ETS, *Effector-Triggered Susceptibility*).

Plantas resistentes a determinados patógenos possuem receptores do tipo R, que são proteínas de resistência que reconhecem produtos de genes de virulência de patógenos e desencadeiam uma segunda linha de defesa, com resposta mais rápida e mais intensa do que a PTI. As proteínas R incluem proteínas imunes em sua maioria intracelulares e codificadas por genes de resistência, sendo essa uma das maiores famílias de receptores em plantas (Tör et al., 2009; Han e Jung, 2013)

O reconhecimento de efetores por proteínas R correspondentes resulta em um nível mais elevado de resistência denominado de imunidade desencadeada por efetores (ETI, *Effector-triggered Immunity*), que está frequentemente associada à resposta de hipersensibilidade (HR). Nessa resposta ocorre a morte programada de células no local da infecção conjugada a uma explosão oxidativa (produzindo ROS), ao estabelecimento de defesas mecânicas e ao influxo instantâneo de  $\text{Ca}^{2+}$ . O  $\text{Ca}^{2+}$  provoca descarga rápida do estoque de vesículas que estocam citocininas e espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, sugerindo uma resposta inespecífica que impede a multiplicação do patógeno e evita a doença (Henry et al., 2012; Zhang et al., 2012). Essa dinâmica de resposta foi descrita em 2006 por Jones e Dangl como um modelo em zig-zag (Fig ).

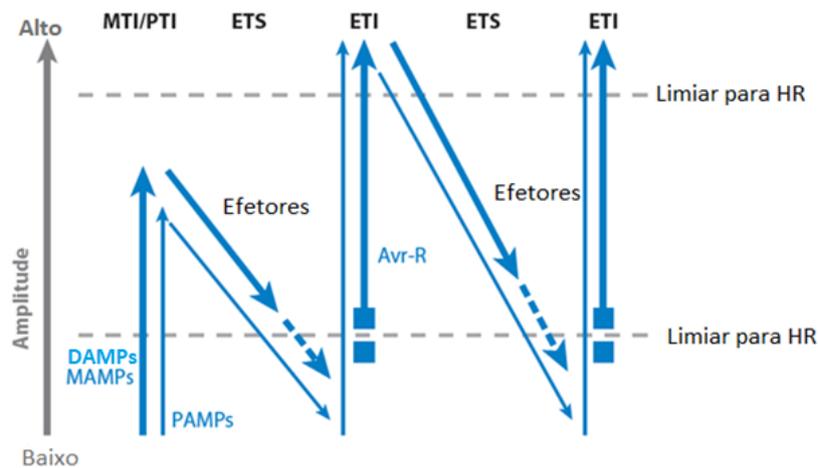


Fig 1. Modelo Zig-Zag do sistema imune em plantas segundo Jones e Dangl (2006). A linha de baixo mostra o limiar para resposta de hipersensibilidade-HR na PTI a partir do reconhecimento de PAMPs/MAMPs/DAMPs via PRRs. Patógenos de sucesso produzem efetores que interferem com a PTI, resultando em ETS. Se um efector for reconhecido por uma proteína NB-LRR, ou Avr-R a ETI é ativada, atingindo o segundo limiar para resposta HR, mais rápida e intensa.

Efetores podem ser reconhecidos direta ou indiretamente, sendo interações diretas entre efetores e proteínas R a exceção e não a regra. A interação indireta, também conhecida como modelo de guarda, envolve o reconhecimento de efetores via perturbação de alvos hospedeiros “monitorados” por uma proteína R, levando à modificação conformacional que ativa a cascata de sinalização (Tor, 2009; Coll *et al.*, 2011). Quando reconhecidos pelos receptores R, os produtos de genes de virulência deixam de ser efetores e passam a ser considerados fatores de avirulência (Avr) (Henry *et al.*, 2012).

Ao passo que a ETI opera contra patógenos que secretam efetores no citoplasma do hospedeiro, o reconhecimento de efetores extracelulares por determinadas proteínas R desencadeia respostas que são um pouco diferentes daquelas observadas durante aquela resposta. Isso levou à sua diferenciação com a definição do termo *Effector-Triggered Deflection* (ETD, deflexão disparada por efetores). A ETD opera contra patógenos extracelulares que secretam efetores no apoplasto. A ETD, embora tão intensa quanto, é um pouco mais lenta que a ETI e nem sempre leva à HR, que provoca morte celular (Stotz *et al.*, 2014).

Ao contrário do que ocorre com os patógenos fúngicos biotróficos e hemibiotróficos, a indução de morte celular é benéfica para os fungos necrotróficos, já que eles extraem seus nutrientes das células hospedeiras mortas. A resposta extracelular mais controlada de ETD é um meio de resistência à necrotróficos, pois não causa necrose tecidual (Lorang *et al.*, 2012). Entretanto, todos os três mecanismos de resistência (PTI,

ETI e ETD) se sobrepõem parcialmente, o que os torna menos distintos um do outro do que se acreditava (Thomma *et al.*, 2011; Stotz *et al.*, 2014).

A partir da resposta local, a planta acumula outros compostos que ativam mecanismos de defesa sistêmica para proteger tecidos sadios em outros locais do vegetal. Esta resistência de longa duração e amplo espectro se apresenta de duas maneiras: resistência sistêmica adquirida ou SAR (*Systemic Acquired Resistance*) e resistência sistêmica induzida ou ISR (*Induced Systemic Resistance*), esta considerada mais branda do que a SAR (Pieterse *et al.*, 2014).

Entre outros fatores, a ativação das respostas de defesa envolve a regulação do equilíbrio de fitormônios como ácido salicílico (SA), etileno (Et) e ácido jasmônico (JA), a depender do organismo invasor e dos efetores envolvidos. A resposta a patógenos biotróficos ou patógenos avirulentos geralmente tem como molécula sinalizadora o SA e induz a SAR, ao passo que indutores de necrose (não patogênicos e simbioses como os do gênero *Trichoderma*, além de possivelmente necrotróficos) ativam preferencialmente a cascata de sinalização que envolve JA/Et, correlacionada com a ISR (Walters *et al.*, 2013; Muthamilarasan e Prasad, 2013; Bashir *et al.*, 2016). Ambas envolvem a cascata de sinalização de diferentes proteínas relacionadas a patogênese, mas os diferentes fitormônios ativam fatores de transcrição específicos resultando na modulação da expressão de enzimas e metabólitos que caracterizam cada via (Figura 2). Há a participação de quitinases, glucanases, enzimas oxidativas (hidroxiperóxido liase, peroxidase e fenilalanina amônio liase) e proteases. Essas enzimas desencadeiam a produção de compostos de baixo peso molecular como fitoalexinas e outros metabólitos secundários. Também controlam diretamente a infecção por degradarem as paredes celulares de fungos e oomicetos, o que resulta em fragmentos elicitores que reforçam os processos de indução de resposta (Harman, 2008; Pieterse *et al.*, 2009, Deller *et al.*, 2011). As vias de sinalização são complexas e intrincadas e os fatores de transcrição envolvidos atuam interdependentemente (Song *et al.*, 2014).

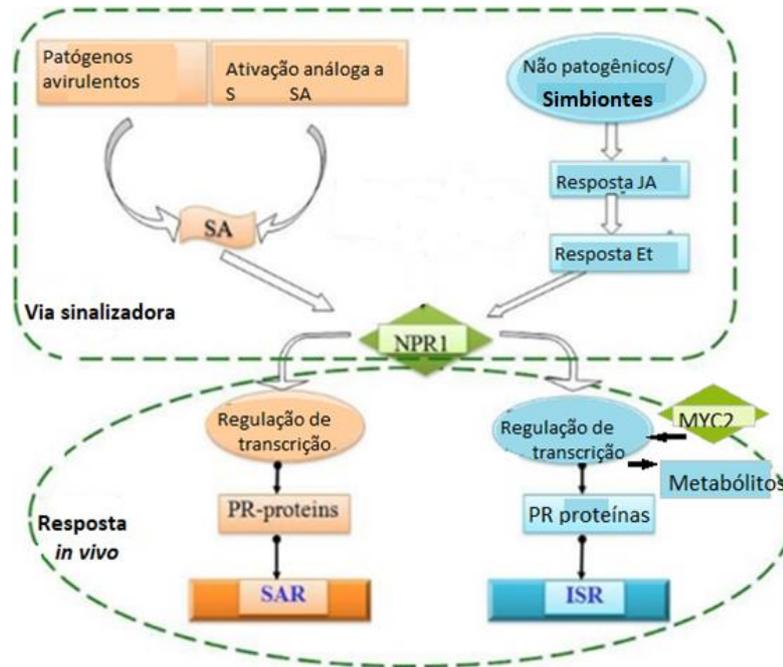


Fig 2. Vias de ativação e desenvolvimento de resistência sistêmica nos vegetais: SAR, e ISR. NPR1- MYC2- são alguns dos fatores de transcrição (FC) envolvidos. SA ativa mais fortemente enquanto JA, após ativação inicial, tem em MYC2 o principal FC. Adaptado de Chan, 2012.

A indução da resistência imune em plantas por *Trichoderma spp* é desencadeada por diferentes classes de moléculas sinalizadoras, como proteínas, incluindo as codificadas por genes de avirulência (*Avr*), peptídeos, enzimas, pequenas moléculas como oligossacarídeos provenientes da degradação de paredes celulares e metabólitos secundários, como os derivados de metionina e de lipídios (Hermosa *et al.*, 2012). A Tabela 1 mostra MAMPs/efetores que foram descritos em *Trichoderma spp*.

Tuci *et al.* (2010) corroboraram os resultados de Djonovic *et al.* (2006) que relataram que a presença de *Trichoderma* aciona o sistema de resistência sistêmica dependente de JA/Et ou o dependente de ácido salicílico (SA) a depender, principalmente, da taxa de colonização. Crutcher *et al.* (2015), constataram que mesmo as linhagens dos organismos podem diferir na taxa de colonização requerida como estímulo dessas diferentes formas de resistência.

**Tabela 1. MAMPs/efetores de *Trichoderma* spp (Adaptado de Hermosa *et al.*, 2012).**

MAMP/efetor	Espécie	Atividade	Referência
<b>Proteínas</b>			
Xilanase Xyn2/Eix	<i>T. viride</i>	Estimula a biossíntese e a resposta hipersensível do TE nos tecidos foliares do tabaco	Rotblat <i>et al.</i> (2002)
Celulases	<i>T. longibrachiatum</i>	Celulases ativadas e desnaturadas pelo calor desencadeiam as defesas do melão pela ativação das vias de sinalização SA e ET, respectivamente.	Martínez <i>et al.</i> (2001)
Cerato-plataninas Sm1/Epl1	<i>T. virens</i> / <i>T. atroviride</i>	Ortólogas SSCP tipo hidrofobina que podem induzir expressão de respostas de defesa em algodão e milho	Djonović <i>et al.</i> (2006), Seidl <i>et al.</i> (2006)
Swollenina TasSwo	<i>T. asperelloides</i>	Proteína tipo expansina com um domínio de ligação à celulose capaz de estimular respostas locais de defesa em raízes e folhas de pepino e proporcionar proteção local contra <i>B. cinerea</i> e <i>P. syringae</i>	Brotman <i>et al.</i> (2008)
Endopoligalacturonase ThPG1	<i>T. harzianum</i>	Envolvido na colonização ativa da raiz do tomateiro e na defesa do tipo ISR em <i>Arabidopsis</i>	Morán-Diez <i>et al.</i> (2009)
<b>Metabólitos secundários</b>			
Alameticina (20mer peptaibol)	<i>T. viride</i>	Elicitação da biossíntese de JA e SA em feijão de lima	Engelberth <i>et al.</i> (2001)
Trichokonina (20mer peptaibol)	<i>T. pseudokoningii</i>	Induz a produção de ROS, o acúmulo de compostos fenólicos no local de aplicação e a resistência a vírus em plantas de tabaco através de múltiplas vias de sinalização de defesa	Luo <i>et al.</i> (2010)
18mer peptaibols	<i>T. virens</i>	Elicitação de defesas sistêmicas de pepino contra <i>P. syringae</i>	Viterbo <i>et al.</i> (2007)
6-Pentil- $\alpha$ -pirona, harzianolida e harzianopiridona	Diversas	Baixa concentração no metabolismo ativa mecanismos de defesa e regula o crescimento de plantas em ervilha, tomate e canola	Vinale <i>et al.</i> (2008)

Uma característica em comum das respostas de resistência sistêmica induzida é a preparação, ou *priming*, aprimorada para defesa. Em plantas preparadas, as respostas de defesa não são ativadas diretamente, mas são prontamente disparadas sistemicamente após o ataque de patógenos ou outras condições de estresse, resultando em uma resistência mais rápida e mais intensa (Van *et al.*, 2008). *Trichoderma* spp. é capaz de desencadear uma regulação positiva de longa duração de marcadores iniciais do gene SA em plantas não desafiadas por patógenos; quando essas plantas são infectadas por um patógeno como *B. cinerea*, o pré-tratamento com *Trichoderma* pode modular a expressão rápida de genes de defesa induzidos pela via de transdução de sinal do JA/ET caracterizando a ISR (Tucci *et al.*, 2011). Por exemplo, a colonização da raiz de

*Arabidopsis* por *T. asperellum* induz ISR por uma cascata de sinalização que também envolve SA, e ambas as vias de sinalização, SA e JA/Et, se combinam na ISR desencadeada por filtrados de cultura livres de células de *Trichoderma* (Yoshioka *et al.*, 2011).

A ativação das vias que induzem resistência, seja IRS ou SAR, tem um alto custo energético para a planta (Perazzolli *et al.*, 2011). Quando inoculadas com *Trichoderma* spp., a forte alteração da demanda modifica a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos, especialmente das vias glicolítica e respiratória, ou seja, envolvidas com aquisição energética (Shoresh 2010, Palmieri *et al.*, 2012).

Todas as classes de metabólitos podem estar envolvidas no estabelecimento e manutenção das relações de interação e nas vias de resposta a estresse que resultam em *priming* pelo simbionte. Na planta, é estimulada a produção de compostos de baixo peso molecular que possuem atividade antimicrobiana como fitoalexinas, normalmente produzidas em resposta a um ataque de patógenos (Harman *et al.*, 2010). A figura 3 ilustra, além da indução de resposta imune, os mecanismos identificados na interação simbiótica com *Trichoderma* spp.

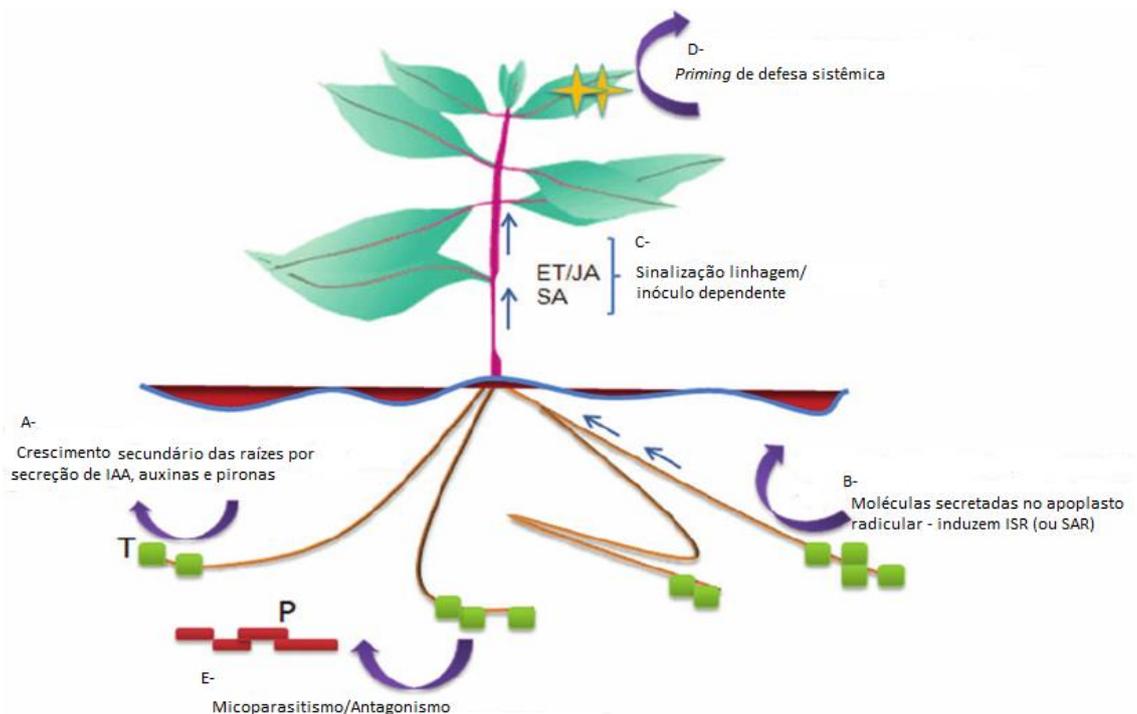


Fig. 3. Controle biológico promovido por *Trichoderma* spp. T- *Trichoderma*, P- patógeno. A- Promoção do crescimento por IAAs e pironas; B-MAMPs induzem resposta da planta; C-Vias de sinalização hormonal de

resposta; D- *priming* de resistência sistêmica; E- Atividade direta contra patógenos. Adaptado de Hermosa *et al.*, 2012.

Vários genes e proteínas com provável participação nessa interação já foram identificados (Segarra *et al.*, 2007; Shores and Harman, 2008; Bae *et al.*, 2011; Moran-Diez *et al.*, 2012; Brotman *et al.*, 2013). Estudos usando cromatografia líquida e gasosa acoplada à espectrometria de massa mostraram que a interação planta-*Trichoderma* reprograma o transcriptoma e proteoma do hospedeiro e modifica a expressão de mais de 160 proteínas, dentre 2000 compostos da planta, redesenhando o perfil metabólico via regulação positiva e negativa da taxa de transcrição gênica (Bailey *et al.*, 2006; Keurentjes *et al.*, 2006; Schauer and Fernie, 2006; Meyer *et al.*, 2007; Alfano *et al.*, 2007; Segarra *et al.*, 2007; Shores, Harman, 2008; Brotman *et al.*, 2012; Morán-Diez *et al.*, 2012, 2015; Palmieri *et al.*, 2012, Nogueira-Lopes, 2018). Proteínas associadas a estresse e à resistência a patógenos são altamente ativadas, dentre elas as quitinases, sacarose e metionina sintases,  $\beta$ -glicosidases, peroxidases e proteínas com sítio de ligação com motivos ricos em leucina (LRPs), sendo essas últimas associadas ao desenvolvimento do perfil de resistência a doenças, podendo levar à indução de resistência localizada ou sistêmica (Yedidia e Chet, 2005, Harman, Shores, 2007).

Usando-se como modelo de planta a *Arabidopsis*, que tem o genoma extremamente pequeno e apresenta um conjunto de reguladores e transportadores já identificados, o rastreamento de qualquer alteração no transcriptoma – da planta e do fungo – e a identificação de proteínas induzidas ou suprimidas a partir da interação são bastante facilitados. A interação com *Trichoderma* aumenta na planta os níveis de expressão de quitinases (CHT), peroxidases (PER), fenilalanina amônio liase (PAL) e hidroxiperoxido liase (HPL), todas envolvidas no aumento da produção de proteínas PR (Yedidia *et al.*, 2000, 2003, Brotman *et al.*, 2012). Abordagens proteômicas usando eletroforese em gel bidimensional e espectrometria de massas trouxeram informações adicionais ao perfil de proteínas modulado por *Trichoderma* spp. na interação, especialmente relacionadas às mudanças de resposta sistêmica. Ferramentas moleculares têm possibilitado a inferência mais precisa sobre os estímulos hormonais e a resposta fisiológica em termos sinérgicos e antagônicos, localização tecido-específica e sistêmica e detalhamento das vias de sinalização na resposta imune (Shores *et al.*, 2010).

Embora o modelo de *Arabidopsis* seja extremamente útil, as diferentes características das espécies vegetais demandam estudos específicos. A fim de se

investigar o perfil de interação simbiote com *Trichoderma* spp., utilizar plantas que fogem ao modelo de *Arabidopsis* requer estudo e adaptação. Por exemplo, no trabalho de Palmieri *et al.*, 2012 e 2014, realizaram estudos proteômicos a fim de identificar mudanças na expressão de proteínas em vinhas e em *T. harzianum* após a interação. Foi detectada a expressão diferencial de 34 proteínas desses organismos usando o *software Mapman* para destacar mapas metabólicos da interação com *T. harzianum*, *Plasmopara viticola*, um patógeno biotrófico, e *P. viticola* com as vinhas, delineando as modulações no perfil funcional do proteoma da planta. Foi demonstrada intensa resposta à interação a partir de aumento no número de proteínas classificadas no *Gene Ontology* como de resposta a estímulo, sinalização, geração diferencial de precursores metabólicos e de energia, entre outras. Na comparação da interação com *P. viticola* sozinha e com *T. harzianum* foi detectado *priming* evidente para resposta local e sistêmica, a partir da pronta reação contra o patógeno em plantas previamente aspergidas com *T. harzianum*. Brotman *et al.*, (2013) também usaram *Mapman* para elucidar o significado biológico das alterações a partir de sua sequência na cadeia de eventos que estabelecem a interação simbiótica, assim como Kanehisa (2012) com modelo depositado na KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

Por outro lado, na interação com a planta hospedeira, o fungo também tem seu perfil metabólico modificado em quase todas as classes de moléculas, dentre proteínas, metabólitos secundários e peptídeos (Harman *et al.*, 2004 e 2008; Perazzolli *et al.*, 2012). Lamdan *et al.* (2015) identificaram 32 proteínas em secretoma de *T. virens* com raízes de milho, dentre estas, aspartil proteases. Nogueira-Lopez *et al.* (2018) encontraram 43 proteínas secretadas por *T. virens* no apoplasto em interação com milho, e as funções moleculares predominantes foram oxiredutase (41%), CAZimas (enzimas ativas em carboidratos) (13%) e liases (10%). Silva (2014), que analisou secretoma de interação entre *T. harzianum* e feijoeiro, identificou 23 proteínas de diversas classes expressas significativamente pelo fungo, entre elas uma serino e uma aspartil protease, sugerindo que estas proteases sejam necessárias na interação.

## 2.5 PROTEASES NA INTERAÇÃO SIMBIÓTICA

As proteases, relacionadas à regulação metabólica das proteínas e seu processamento, já foram identificadas como induzidas em *Trichoderma* spp. em contato com plantas hospedeiras. A identificação de proteases pode enriquecer o conhecimento sobre a relação de simbiose (Hedstrom, 2002; Silva, 2014; Chi *et al.*, 2016).

Proteases são responsáveis por vários processos biológicos além das vias sintéticas e catabólicas, como clivagem de peptídeos sinalizadores, transdução de sinais, hidrólise de componentes estruturais, regulação da taxa de renovação das proteínas intracelulares e apoptose. Podem atuar produzindo DAMPS, a partir do processamento de outras proteínas e peptídeos envolvidos na sinalização da interação com plantas, promovendo a indução da imunidade sistêmica (Hedstrom, 2002, Kredics *et al.*, 2005; Chi *et al.*, 2016; Muszewska *et al.*, 2017).

Estudos em *Trichoderma* spp. tradicionalmente ligam a expressão desse tipo de enzima à atividade micoparasítica, mas resultados mostram o aumento de sua expressão a partir da interação com o hospedeiro vegetal. O fato da expressão de proteases ser aumentada no contato apenas com a planta permite deduzir a participação no estabelecimento da interação simbiote (Flores *et al.*, 1997; Viterbo, 2004; Chacón *et al.*, 2007, Harman *et al.*, 2010; Silva, 2014), e faz sentido elucidar que papéis essa classe de enzimas possam ter no desenvolvimento da resposta imune sistêmica e na alteração metabólica que beneficia os simbiossiontes. Por exemplo, Lamdan *et al.* (2015) descobriram que pequenas proteínas secretadas ricas em cisteínas (SSCRPs) têm secreção diminuída por *T. virens* na interação com milho; mutantes *knockout* para essa proteína elicitora tiveram mais sucesso na ISR. Desse trabalho pode inferir-se um mecanismo de *Trichoderma* spp. de inibição da atividade elicitora, utilizando proteases para regulação da resposta imune.

Mais de 400 proteases do gênero *Trichoderma* estão depositadas na base de dados MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops>). Os genes que codificam estas enzimas perfazem cerca de 4% de proteínas dos seus genomas. Entre os fungos, esse número está entre os mais expressivos (Kredics *et al.*, 2003; Druzhnina *et al.*, 2012, Rawlings *et al.*, 2012).

Em *Trichoderma* spp., serinoproteases estão envolvidas no metabolismo do fungo e formação das estruturas *appressoria*, portanto, no micoparasitismo e na colonização

radicular (Druzhinina *et al.*, 2012). A identificação dessas enzimas pode subsidiar a elucidação de seus papéis não só na fisiologia do fungo mas também da relação de *Trichoderma* com o meio e na interação com plantas.

Dentre os resultados obtidos em estudos, a superexpressão de *tvsp1*, que codifica uma serinoprotease de *T. virens*, conferiu resistência contra *Rhizoctonia solani* (Flores, Herrera-Estrella, Chet, 1997 *apud* Pozo *et al.*, 2004). PRB1 é sua homóloga em *T. atroviridae*. Viterbo, Harel e Chet, 2004, em estudo com raízes de pepino, encontraram *papB*, um gene para aspartil protease, sendo prontamente expresso por *T. asperellum* a partir do contato com tecidos radiculares. A conclusão destes autores é que ambas as proteases encontradas desempenham papel no estabelecimento da interação simbiótica. Segundo Fanelli *et al.* (2018), há identidade das enzimas com as de *T. harzianum* de 85 e 68% respectivamente. Samolski *et al.* (2009) encontraram uma aspartil protease expressa por *T. harziaunum* em contato apenas com raiz de tomateiro. Já Fan *et al.* (2014) observaram aumento de secreção por *T. harzianum* de uma subtilisina 6 horas após contato com raiz de álamo pulverizada. Nosso grupo de trabalho encontrou resultados semelhantes, analisando secretoma de interação de *T. harzianum* TR274 com feijoeiro comum. Foram encontradas uma aspartil e uma serino protease que não foram secretadas quando o fungo foi crescido sozinho (Silva, 2014). Lamdan *et al.* relatam aspartil e subtilisinas-*like* em secretado de interação com milho (2015). No entanto, ainda não há descrição do papel destas enzimas na modulação do crescimento e da resposta de defesa de plantas hospedeiras em interação com este fungo.

Embora o papel exato das proteases ainda não tenha sido elucidado na interação *Trichoderma* spp. com hospedeiros vegetais, estudos podem fornecer evidências de como os muitos fungos filamentosos as utilizam. Algumas das proteases pesquisadas têm ação sobre CAZimas de plantas, diminuindo sua defesa e possivelmente comprometendo a sinalização desses organismos (Gazzarrini e McCourt, 2001). Por exemplo, *Fusarium solani f. sp. phaseoli* é capaz de modificar as quitinases durante a infecção do feijão para facilitar a colonização do hospedeiro (Lange *et al.*, 1996). Uma subtilisina secretada por *F. solani f. sp. eumartii* modificou quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases de batata (Olivieri *et al.*, 2002). Em outro estudo, foi demonstrado que os fungos patogênicos do tomate, *B. cinerea* e *Verticillium. dahliae* secretam proteases que clivam o CBD, ou CBM (*carbohydrate-binding domain* ou *module*, domínio ou módulo de ligação a carboidratos) de quitinases

do tomate, em ação sinérgica de uma serino e uma metaloprotease, com redução da atividade antifúngica da enzima alvo (Karimi Jashni *et al.*, 2015).

Proteases fúngicas, portanto, podem ser importantes fatores de virulência que alteram a defesa basal da planta por mecanismos diferentes. A secreção de proteases por fungos para modificar, degradar ou inibir proteínas de defesa basais pode ter desempenhado um papel importante durante a coevolução com suas plantas hospedeiras (Hörger, van der Hoorn, 2013). No caso de *Trichoderma* spp., que em geral não é patogênico, o alcance de um equilíbrio no estabelecimento da colonização e o controle no grau de desencadeamento de defesa podem promover o *priming* imunológico do hospedeiro (Harman *et al.*, 2010, Guzmán-Guzmán, 2017).

Considerando sua natureza simbiote oportunista, a elucidação da participação de proteases no estabelecimento da interação da planta com *Trichoderma* spp. na indução de resposta sistêmica preencheria uma lacuna importante nos estudos de controle biológico promovido por esses fungos. No entanto, existem alguns problemas que dificultam a análise funcional de proteases secretadas como, por exemplo, a redundância de proteases. Tentativas para determinar a função de avirulência de genes de protease usando uma única abordagem de gene *knockout* tendem a não retornar resultados por causa da redundância funcional presente em famílias de proteases multigênicas de eucariotos (Di Pietro *et al.*, 2001). Por exemplo, a supressão de um gene codificador de protease pode resultar em supra-regulação de proteases relacionadas com uma função similar (Plummer *et al.*, 2004). Outra questão diz respeito à especificidade das proteases. Embora algumas proteases possam ter uma gama de alvos, a maioria das proteases tem especificidades de substrato muito distintas, o que torna o processo de investigação de cada papel bastante exaustivo (Hedstrom, 2002; Yike, 2011; Hamin Neto *et al.*, 2018). Ainda, há a complexidade da regulação das proteases. Os fungos podem regular diferentemente seus genes de proteases secretadas nos níveis transcricional, traducional e pós-traducional como, por exemplo, produzindo proteases que clivam domínios necessários para ativação de substratos e, conseqüentemente, interrompendo algum processo (Naumann e Wicklow, 2013).

Uma estratégia interessante para a investigação dessa classe de moléculas é a de seleção fenotípica a partir de mutações aleatórias. Apesar da grande possibilidade de interferência por vias não relacionadas diretamente a genes específicos para proteases, a interação com um fenótipo selecionado para atividade proteolítica pode proporcionar

inferências sobre a importância dessa característica no processo de simbiose, abrindo novas perspectivas de estudo processo complexo que é a interação simbiótica.

## 2.6 *Phaseolus vulgaris* E DOENÇAS FÚNGICAS

O gênero *Phaseolus*, pertencente à família *Fabaceae*, é um gênero originário do continente americano e abrange aproximadamente 55 espécies. O feijão é uma das leguminosas de consumo humano mais consumidas no mundo, além de um alimento tradicional e a principal fonte de proteína vegetal dos brasileiros - em especial de baixa renda. O amido armazenado nos grãos representa cerca 65% da sua composição total, e o teor de proteínas é de aproximadamente 20%, com o restante representado por minerais e fibras. Quando comparado a fontes de proteína de origem animal, apresenta menor custo por aporte desse nutriente (Bassinello, 2007).

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), espécie bem adaptada às condições climáticas do Brasil, é uma das mais cultivadas, em três safras anuais: águas (outubro a janeiro), seca (fevereiro a maio) e inverno (junho a setembro). O levantamento de safra de grãos realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) para a safra de 2013/2014 mostra que o plantio do feijão atingiu uma área equivalente a 3,0 milhões de hectares com uma produção nacional estimada de 3,8 milhões de toneladas, 1.080 kg/ha (CONAB, 2016). No entanto, o cultivo por área ainda apresenta pouco rendimento no Brasil (FAO, 2010), sendo que a maior parte desta produção é utilizada para atender o mercado interno (CONAB, 2016). De acordo com a Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento de São Paulo (SEAB), o consumo médio alimentar de feijão no Brasil teve uma estimativa per capita em 2011/12 de 14,94 kg/hab/ano (SEAB, 2012).

O Brasil é o maior consumidor mundial do feijão comum e um dos maiores produtores (EMBRAPA, 2009) e os estados do Paraná, Minas Gerais e Goiás são os maiores produtores do país (CONAB, 2017). Dentre as variedades de feijão, o cultivar Pérola, lançado em 1994 pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), é recomendado para cultivo nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Bahia e Distrito Federal devido a suas características produtivas, como ciclos de colheita e condições ideais de cultivo. (EMBRAPA, 2004).

O feijoeiro comum é uma espécie suscetível a inúmeras doenças, a maior parte fúngicas, o que limita a produtividade e afeta a qualidade dessa cultura (Reis *et al.*, 2000, apud Silva, 2014). No Brasil, o feijoeiro tem seis fungos patogênicos de importância epidemiológica e que são transmitidos por sementes. Destacam-se *Fusarium oxysporum*, f.sp.*phaseoli* (murcha de Fusarium), *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* (podridão radicular seca), *Macrophomina phaseolina* (podridão cinzenta da haste), *Rhizoctonia solani* (*Thanatephorus cucumeris*) (“podridão radicular” e “mela” do feijoeiro) e *Sclerotinia sclerotiorum* (mofo branco) (Lobo Junior, 2014). Dentre as doenças mais presentes no Cerrado, o mofo branco causa as maiores perdas em termos totais (Ito e Parisi, 2010).

Os primeiros relatos de mofo branco no Cerrado em soja foram feitos há 20 anos. O patógeno causador é um fungo necrotrófico Ascomycota, *S. sclerotiorum*, que tem mais de 400 plantas hospedeiras, sendo que somente as gramíneas são consideradas como não-hospedeiras. Sua disseminação se dá principalmente por sementes infectadas. O patógeno sobrevive no solo por tempo indefinido por meio de estruturas de resistência, escleródios, que aumentam a cada plantio de espécie hospedeira. Uma vez introduzido na área seu controle é difícil, pois tem alta taxa de formação de estruturas de resistência que permanecem viáveis por muitos anos no solo devido ao pigmento melanina, que é de difícil degradação. Não há cultivares de feijão comum resistentes ao mofo branco (Ito e Parisi, 2010).

## 2.7 TRANSFORMAÇÃO INSERCIONAL ALEATÓRIA MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens*

A bioquímica e a genômica funcional do processo de defesa têm sido estudadas em muitas espécies de *Trichoderma* devido à sua importância como agente de controle biológico na agricultura. Enzimas, proteínas e efetores envolvidos na interação têm sido identificados, sendo que poucos têm seu papel exato descrito na simbiose *Trichoderma* spp. - planta hospedeira (Eriston *et al.*, 2016; Kubicek *et al.*, 2011). Um modo de investigação do papel dos genes e seus produtos é a supressão da expressão genética por interrupção dos mesmos (Fávaro, 2011). A transformação aleatória mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (AMT) é uma das técnicas que podem contribuir para uma maior compreensão do processo simbiótico, sendo que foi descrita para fungos filamentosos por De Groot *et al.* (1998).

*A. tumefaciens* é uma bactéria Gram-negativa de solo que traz um plasmídeo Ti (*Tumor inducing*) com 150 a 250 kb, constituído por duas regiões chave: uma região denominada T-DNA (*Transfer DNA*), com os genes tumorais de auxina e citocinina, e outra que contém o trecho regulatório *vir* (Figura 5). O trecho *vir* codifica as proteínas envolvidas no processamento e transferência de parte do material genético plasmidial, o T-DNA, para o genoma do hospedeiro. A região *vir* tem a transcrição ativada por compostos fenólicos da planta, como, por exemplo, acetoseringona (Li et al., 2017).

O T-DNA apresenta duas regiões de flanqueamento que contém repetições diretas imperfeitas com aproximadamente 25 pb cada, denominadas bordas esquerda e direita, LB e RB (figura 4). O primeiro passo da metodologia consiste na remoção dessa região do plasmídeo Ti. O T-DNA é, então, manipulado para remoção dos oncogenes. Inclui-se, entre as regiões de inserção, genes marcadores de seleção, geralmente o *hph* para resistência à higromicina e a proteína fluorescente verde GFP (*Green Fluorescent Protein*) (Fitzgerald et al., 2004; Li et al., 2007). Pode haver também a inclusão de genes de interesse. O T-DNA é inserido em um segundo plasmídeo, um vetor binário (de Groot et al., 1998; Gouka et al., 1999).

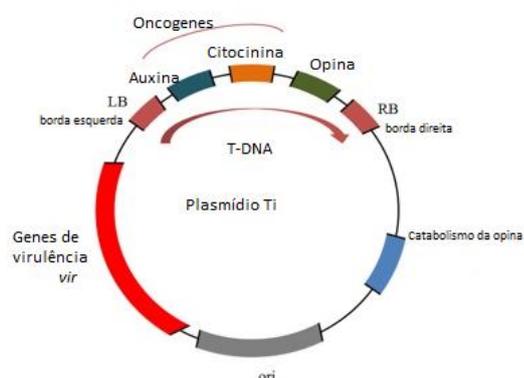


Fig 4. Plasmídeo Ti de *Agrobacterium.tumefaciens*. RB e LB, *right e left bord* ou bordas direita e esquerda, são as regiões de flanqueamento do T-DNA despojadas dos oncogenes e inseridas em um vetor binário. A região *vir* codifica as proteínas de transferência Adaptado de de Groot et al. (1998).

A necessidade desse segundo vetor vem da dificuldade da manipulação do plasmídeo de *A. tumefaciens*, que se torna instável com a inserção de genes marcadores (Li et al., 2017). O vetor binário é clonado e reinserido na *A. tumefaciens* juntamente com o plasmídeo Ti desarmado, isto é, sem região de oncogenes, mas com a região *vir*

para expressão das proteínas necessárias para a transferência. A combinação desses dois vetores em *A. tumefaciens* readquire a capacidade de infecção de células para a integração de forma aleatória do T-DNA modificado no genoma alvo (Michielse *et al.*, 2005a; Li *et al.*, 2017). Os transformantes resultantes são mitoticamente estáveis. A técnica tem ampla cobertura, sendo eficaz para muitas espécies e tendo alto rendimento. Geralmente resulta na inserção aleatória de cópias simples no genoma, possibilitando a correlação quanto ao fenótipo resultante no estudo via mutagênese insercional aleatória (Sugui *et al.*, 2005; Martin, 2009; Khang, 2005).

Fatores importantes na eficiência da transformação incluem a linhagem de *A. tumefaciens*, por suas diferentes taxas de expressão de proteínas *vir* (especialmente *virG* e *virA*, que captam a sinalização fenólica do hospedeiro) (Park e Kim, 2004) e taxas de divisão celular do tecido a ser transformado, muito embora, nesse caso, haja diferenças marcantes quanto à relevância por espécie, assim como com perfil auxotrófico para bases nitrogenadas (Sullivan *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2003; McClelland *et al.*, 2005).

Esse método de transformação tem a vantagem de ser passível de rastreamento preciso do *locus* de inserção do T-DNA no gene interrompido. Isso possibilita a identificação de possíveis genes do fungo atingidos pela transformação, com consequente supressão do produto. A técnica desenvolvida por Liu e Whittier (1995), TAIL-PCR (*Thermal Asymmetric Interlaced Polymerase Chain Reaction*), utiliza *primers* (iniciadores) aleatórios baseados em algoritmos de sequências curtas prováveis em qualquer genoma. A técnica utiliza temperaturas de anelamento diferentes – assimétricas – para o par de *primers* específico/aleatório (AD), alternando alta e baixa estringência. Para que a assimetria seja garantida, a temperatura de anelamento dos *primers* específicos deve ser pelo menos 10°C maior que a dos aleatórios e a temperatura de anelamento dos ciclos de alta estringência deve ser superior em 1 a 5°C em relação à do *primer* específico (Liu & Whittier, 1995). Isso permite a amplificação das regiões adjacentes ao T-DNA, que tem a sequência conhecida. Quando o anelamento aleatório ocorre em uma distância suficiente dos *primers* específicos, ocorre a amplificação exponencial dos trechos adjacentes ao T-DNA.

Identificar sequências relacionadas à expressão de fenótipos ou mesmo de produtos específicos de um gene pode fornecer informações acerca de perfis fenotípicos quanto a quaisquer características investigadas, como, por exemplo na simbiose, que

resulta em crescimento e indução de resposta sistêmica na planta hospedeira. O rastreamento do *locus* de inserção do T-DNA e a sequência interrompida possibilita a identificação de possíveis genes do fungo atingidos pela transformação, com consequente supressão do produto. Identificar sequências relacionadas à expressão de fenótipos, ou mesmo de produtos específicos de um gene, pode fornecer informações acerca de perfis fenotípicos quanto a quaisquer características investigadas, como na simbiose que resulta em crescimento e indução de resposta sistêmica na planta hospedeira. Autores investigaram um transformante de *T. harzianum* que teve o gene de uma proteína até então sem função conhecida, *Thc6*, aleatoriamente deletado por AMT. Utilizando superexpressão, complementação e silenciamento do gene deletado, comprovaram seu envolvimento na expressão de genes responsivos a JA na planta estudada, o milho (Fan *et al.*, 2015).

### 3. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho identificar genes com papel na interação entre *T. harzianum* TR274 e feijoeiro-comum utilizando a técnica de AMT.

#### 3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Triagem da biblioteca de transformantes de *T. harzianum* TR 274 para fenótipo diminuído de atividade proteolítica e seleção de dois transformantes para os experimentos de interação com feijoeiro comum.
- Avaliação de características morfométricas de feijoeiro comum em cocultivo com os transformantes selecionados
- Avaliação da suscetibilidade de feijoeiro comum ao mofo branco, causado pelo patógeno *S. sclerotiorum*, na ausência ou presença de *T. harzianum* TR 274 (parental e transformantes)
- Identificação dos genes que foram nocauteados nos mutantes selecionados.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 *Fungos filamentosos: obtenção e manutenção*

O isolado de *T. harzianum* TR274, utilizado como modelo deste trabalho, foi cedido pelo Dr. Murillo Lobo Júnior, curador da coleção de *Trichoderma* spp. da EMBRAPA arroz e feijão – GO. Inicialmente, o isolado TR274 foi repicado em meio Batata Dextrose Ágar, preparado de acordo com as especificações do fabricante (Kasvi, São Paulo - Brasil) e cultivado por sete dias em câmara de germinação (Tecnal TE-4013, São Paulo – Brasil) a 28°C com ciclos de 12 horas de iluminação. Para preservação do isolado, três discos do micélio (10 mm Ø) cultivado por sete dias em meio BDA, foram removidos e estocados em tubos de criopreservação contendo solução de glicerol 50% (v/v) em freezer a -80°C. *T. harzianum* TR274 cultivado em meio BDA foi mantido em câmara fria a 4°C por até sete dias.

O fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* foi obtido da biblioteca de fungos do laboratório de Enzimologia do IB/UnB, mantido sob as mesmas condições descritas para *T.harzianum* TR274.

### 4.2 *Obtenção, manutenção e repique da biblioteca de transformantes*

A biblioteca de mutantes obtida pela transformação de *T. harzianum* TR274 utilizando-se a técnica de AMT foi cedida pela Dra. Leia Fávoro da EMBRAPA Agroenergia. A transformação foi realizada utilizando o vetor pFAT-gfp (Figura 5), contendo o T-DNA desarmado, e gene de resistência à higromicina para seleção dos transformantes. A biblioteca consiste em 168 transformantes que foram nomeados como T1 a T168. Os transformantes foram inoculados em meio BDA adicionado de higromicina (50 µg/mL) e incubados em câmara de germinação como descrito para o isolado parental. A criopreservação foi realizada como descrito no item 4.1.

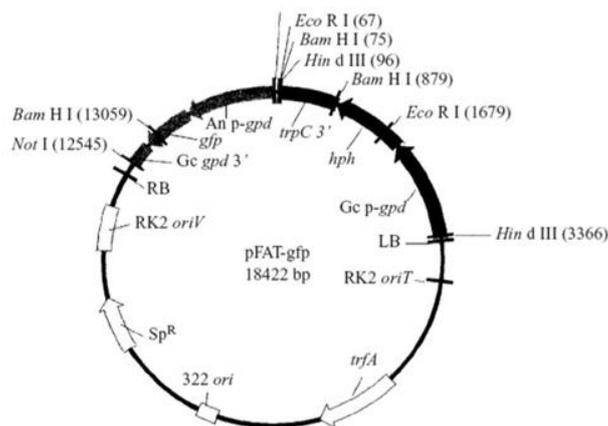


Fig 5. Mapa do vetor pFAT-gfp usado na transformação do isolado *T. harzianum* TR274. RB e LB- bordas direita e esquerda do T-DNA; hph – gene de resistência à higromicina B de *E. coli*. Adaptado de Fitzgerald et al., 2003, apud Fávaro, 2009.

#### 4.3 Triagem da biblioteca de transformantes

Como uma primeira abordagem para triagem dos transformantes a serem utilizados nos bioensaios de interação, foi avaliada a sua mudança no padrão de esporulação, crescimento e na produção de atividade proteolítica. Proteases, ácidas e alcalinas, são secretadas pela espécie modelo deste trabalho em interação com feijoeiro comum (Silva, 2014) e foi utilizada como um parâmetro para seleção de transformantes que poderiam apresentar fenótipo alterado de interação com a planta hospedeira.

A avaliação da atividade proteolítica da biblioteca de transformantes e da linhagem selvagem foi inicialmente realizada de forma qualitativa pelo cultivo dos isolados em meio BDA suplementado com caseína 1% (*m/v*). Um disco de micélio da cultura de cada um dos transformantes e do isolado parental foi inoculado em placas contendo meio BDA-caseína, contendo higromicina (50 µg/mL) no caso do cultivo dos transformantes, e estas foram incubadas à temperatura ambiente por oito dias. Os transformantes que apresentaram menor taxa de crescimento em relação ao isolado parental foram classificados como apresentando o fenótipo protease menos, e então selecionados para os próximos experimentos.

Os isolados T11, T25, T26, T40, T49, T50, T112, T113, T135 e T136 foram cultivados em meio líquido para avaliação quantitativa da produção de proteases. Para cultivo em meio líquido, um disco de micélio das culturas do isolado parental e transformantes foi inoculado em frascos cônicos contendo arroz parboilizado autoclavado (100 g de arroz adicionado de 100 mL de água destilada), e estes incubados em câmara

de germinação como descrito no item 3.1. Após 10 dias de cultivo, os esporos foram coletados com uma etapa de lavagem do arroz com solução salina estéril 0,9% (*m/v*). A contagem de esporos foi realizada utilizando microscópio óptico e câmara de Neubauer.

O total de  $10^6$  esporos/mL foram inoculados em frascos cônicos contendo 50 mL de meio líquido (Meio mínimo-g/L:  $K_2HPO_4$  (0,5 g);  $(NH_4)_2SO_4$  (0,5g);  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,5 g);  $FeCl_2 \cdot 1H_2O$  (10 mg);  $CaCl_2$  (10 mg);  $MnCl_2$  (0,1 mg);  $ZnSO_4$  (0,01 mg); solução de vitaminas, 2,0 mL) suplementado com glicose 0,01% (*m/v*) (para possibilitar a germinação) e caseína 1% (*m/v*) ou glicose 1% (*m/v*). Os frascos foram então incubados à temperatura ambiente em incubadora orbital (Tecnal TE-424, São Paulo – Brasil) com agitação constante de 120 rpm. O experimento foi realizado em triplicatas, três cultivos para cada um dos transformantes e para o isolado parental.

Após três dias de cultivo, as culturas foram filtradas por filtração a vácuo utilizando papel filtro número 5 (Whatman, Darmstadt – Alemanha), os filtrados foram centrifugados a  $10'000 g$  a  $4^\circ C$  por 10 minutos e o sobrenadante coletado como fonte de enzimas para o experimento de determinação de atividade enzimática. O micélio obtido após a filtração foi seco em estufa a  $80^\circ C$  e utilizado para pesagem da massa micelial, este procedimento foi realizado até atingir valor de massa constante. Os ensaios enzimáticos para determinação da atividade proteolítica foram realizados como descrito por Hutadilok-Towatana *et al.* (1999), utilizando azocaseína como substrato. Brevemente, 75  $\mu L$  do sobrenadante foram adicionados a 125  $\mu L$  de solução do substrato azocaseína 0,5% (*m/v*) de Tris-HCl 100 mM pH 8,0 ou acetato de sódio 100 mM pH 4,0. A reação foi realizada a  $40^\circ C$ , após 20 minutos foram adicionados de 600  $\mu L$  de ácido tricloroacético 10% (*p/v*) para parar a reação, os tubos contendo as reações enzimáticas foram centrifugados a  $4200 g$  à temperatura ambiente por 5 minutos. Uma alíquota de 600  $\mu L$  de cada uma das reações foi pipetada e transferida para outro tubo de ensaio e a estes foram adicionados 700  $\mu L$  de NaOH (1 M). A liberação de produto foi determinada pela leitura de absorbância a 440 nm. Para cada amostra biológica o ensaio enzimático foi realizado em triplicata. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar em 0,1 o valor da absorbância a 440nm por minuto de reação.

#### *4. 4 Bioensaios: cultivo de feijoeiro comum em associação com T. harzianum (isolado parental e transformantes)*

O experimento de co-cultivo foi realizado em casa de vegetação à temperatura ambiente e com iluminação natural, utilizando o substrato para plantas PRATA (Bioplant, Brasil) e rega diária. O substrato foi autoclavado a 120 graus celsius por 40 minutos e em seguida distribuído em sacos plásticos para jardinagem, correspondente a 2/3 do volume destes.

As sementes de feijão cultivar Pérola, gentilmente cedidas pelo Dr. Murilo Lobo Júnior (EMBRAPA Arroz e Feijão-GO), foram esterilizadas com solução de hipoclorito de sódio a 3% por 7 minutos, lavadas com água autoclavada e transferidas para os sacos de jardinagem contendo substrato. Os sacos de jardinagem semeados foram separados em quatro grupos como descrito a seguir: a) com substrato apenas semeado; b) que foram semeados e posteriormente inoculados com conídios do isolado parental ( $10^6$  esporos/mL); c) semeados e inoculados com conídios do transformante T49 e d), semeados e inoculados com conídios do transformante T136. O experimento foi realizado em triplicata com um total de cinco plantas para cada uma das condições de cultivo.

Após 14 dias de crescimento as plantas foram coletadas para medição da parte aérea, área foliar, raiz, volume da raiz, e peso seco radicular. O solo foi removido das raízes cuidadosamente sob fluxo de água. Para a medição da parte aérea, realizada manualmente em superfície plana, foi considerado do primeiro nó da raiz até a gema das primeiras folhas. A área foliar da maior folha de cada planta foi calculada usando o software ImageJ sobre imagens obtidas em scanner de mesa. O comprimento das raízes, a partir do primeiro nó até a extremidade mais calibrosa, foi medido conforme descrito para a parte aérea. O volume das raízes foi calculado por deslocamento de fluido em proveta (Hughes, 2005). Para aferição do peso seco as raízes foram secas em estufa a 70°C, envoltas em papel, e pesadas diariamente, até atingirem peso estável, o que ocorreu em após 72h. Para cada condição e parâmetro, foram medidas 15 plantas. A partir das medições de cada característica, foi calculada a média e o desvio padrão.

De cada um dos parâmetros morfométricos foi feita análise de variância estatística (ANOVA), para um fator, com  $p < 0.05$ , entre as condições utilizando-se do pacote do software SigmaPlot. Nos parâmetros nos quais a análise de variância foi significativa, as condições foram comparadas duas a duas por teste de Tukey (Snedecor e Cochran, 1989).

#### 4.5 *Teste de suscetibilidade*

A suscetibilidade de feijoeiro comum ao mofo branco, doença causada pelo fungo *S. sclerotiorum* foi avaliada utilizando o teste *in vitro* de folha destacada.

Quatro folhas provenientes das plantas cultivadas em cada uma das condições experimentais acima descritas foram coletadas, lavadas com solução de hipoclorito a 2%, enxaguadas com água autoclavada e colocadas em placas de Petri individuais contendo papel filtro umedecido com água autoclavada. Três discos da cultura de *S. sclerotiorum* foram inoculados sobre cada folha, as placas foram tampadas e incubadas em câmara de germinação com fotoperíodo de 12 horas a 28°C. O experimento foi acompanhado por três dias para observação da extensão da lesão foliar (Twizeyimana *et al.*, 2007).

#### 4.6 *Análise dos transformantes para identificação do gene nocauteado*

##### 4.6.1 Localização da região genômica adjacente ao T-DNA

Para identificar os genes nocauteados nos transformantes foi utilizada a técnica de *Thermal Assymetric Interlacing* - TAIL-PCR, descrita por Liu e Whittier em 1995. A técnica se baseia no uso de *primers* degenerados ou aleatórios, gerados a partir de algoritmos que predizem prováveis sequências, de aproximadamente 20pb, presentes em qualquer genoma. Utilizando a diferença de temperatura de anelamento entre os *primers* aleatórios e o específico da região conhecida, e uma sequência de reações - primária, secundária e terciária - que empregam superciclos de temperatura assimétrica de anelamento, é possível a amplificação de fragmentos nos quais o par de *primers*, o específico e o aleatório, se ligam. O princípio da técnica está ilustrado na Figura 6.

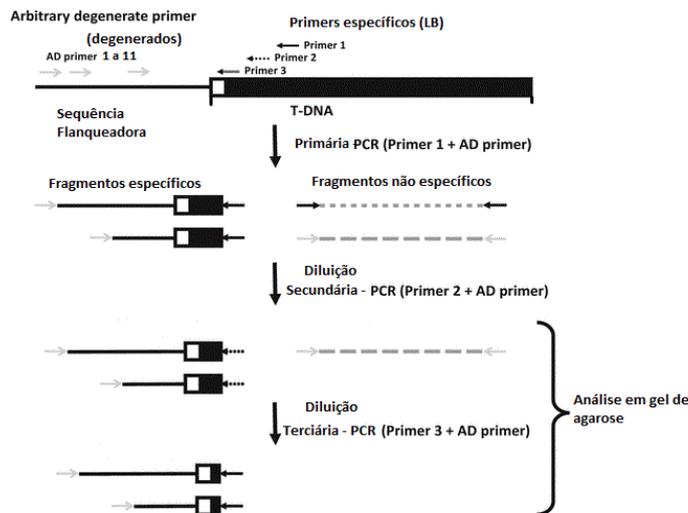


Fig 6. Técnica de TAIL-PCR, mostrando a aproximação gradual da região de flanqueamento pelos primers específicos (LB). Os primers degenerados, de anelamento aleatório no genoma, geram segmentos de tamanhos diversos. Adaptado de Pogorelko e Fursova, 2008.

Os transformantes foram cultivados em meio líquido (TLE) (Bactopetona 1,0 g/L - 1, Uréia 0,3 g L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0 g L<sup>-1</sup>, NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,4 g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,3 g L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,2 g l<sup>-1</sup>, 2% (v/v) de solução de elementos traços, pH 5,0) por cinco dias a 28° C sob agitação a 120 revoluções/minuto. Após o crescimento, as culturas foram filtradas e o micélio recuperado para utilização na extração de DNA genômico. A extração de DNA total dos transformantes foi realizada utilizando-se o protocolo de extração alcalina de Raeder e Broda (1985, adaptado por Sambrook e Hussel, 2001). A parede celular foi lisada com nitrogênio líquido em almofariz. Foram transferidos para tubos de 2ml 100 mg de micélio triturado adicionando 1 mL do Tampão de Extração (200nM Tris-HCl 200mM, NaCl 5M 250mM, EDTA 25mM, SDS 1%, H<sub>2</sub>O miliQ esterilizada) homogeneizados imediatamente e incubados durante 1 hora a 65°C, em banho-maria, agitando por inversão a cada 20 minutos, após foi adicionado a cada tubo 1 ml volume de fenol, vortexado e centrifugado por 10 minutos a 4.000g a 4°C. Este procedimento foi repetido para melhor extração. Foram coletados 900 µL do sobrenadante e transferidos para tubo de 2 mL, adicionados 450 µL de fenol e 450 µL de clorofórmio e centrifugados por 10 minutos a 4.000g a 4°C, desprezando a fase aquosa, repetindo por por três vezes todo esse procedimento. Ao final, foram coletados 700 µL da fase aquosa e transferida para um novo tubo de 2 mL e adicionados 700 µL de solução de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1, homogeneizando em *vortex*. Centrifugados por 10 minutos a 4.000g a 4°C, repetindo uma vez. Em seguida, 600 µL da fase aquosa da amostra foram transferidos para tubos de 1,5 mL, adicionados 360 µL de isopropanol, homogeneizados

por inversão para precipitação dos ácidos nucleicos, e centrifugados 30 minutos a 4.000g, a 4°C, descartando o isopropanol. Foi adicionado cuidadosamente etanol 70% e descartado em seguida, deixando os precipitados secarem em tubo aberto, em capela de fluxo laminar, por duas horas, ressuspensando os ácidos nucleicos em 100 µL de água MiliQ esterilizada.

A quantificação de DNA e a qualidade da preparação foram analisadas por espectrofotometria utilizando o aparelho Nanodrop 1000 (Thermo-Fischer Scientific, Estados Unidos da América) com a razão das absorbâncias 260nm/280nm, sendo aceitável entre 1,8 e 2,0. Para as reações de TAIL-PCR, as amostras de DNA genômico de cada transformante quantificadas foram diluídas, em água ultrapura esterilizada, para uma concentração de 20 ng/µL. Para a montagem das reações para amostras de cada fungo transformante, em triplicata para cada um dos pares de *primers* LB/AD (tabela 2), foi preparada uma solução matriz (*mix*) com composição e concentrações descritas na tabela 3.

A reação primária foi realizada utilizando 0,2 µM do *primer* LB1 e 1 µL de DNA genômico a 20 ng/µL. Para os *primers* degenerados AD2, AD3, AD5 e AD11 foram utilizados 10 µM, e para o AD1, e AD6 e AD7, 1,3 µM (tabela 4) com o *mix* de reagentes. A etapa secundária da TAIL-PCR foi executada usando-se o produto da amplificação da reação, diluído em 1:49 (1µL:49 µL), os mesmos *primers* degenerados e 0,2 µM do *primer* LB2. Utilizando-se o produto da etapa secundária diluído 1:9, para a etapa terciária, substituiu-se o *primer* LB2 pelo LB3 (0,2µM), utilizando apenas os *primers* degenerados AD5 para o T49 e AD11 para o T136. A concentração e os volumes dos *primers* aleatórios se encontram na tabela 4, os quais foram adicionados a cada microtubo de 200 uL correspondente. As reações de amplificação em termociclador (T-100 (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos da América)) foram feitas conforme os programas de ciclagem específicos para cada etapa descrita por Liu e Whittier (1995), constantes nas tabelas S6, S7 e S8. A temperatura mínima de anelamento na etapa terciária foi adaptada para se aproximar das *Tms* dos *primers* AD selecionados na etapa secundária.

**Tabela 2. Sequência de primers utilizados na TAIL-PCR por tipo de alvo, T-DNA border (específico) ou aleatório e temperatura de anelamento (Tm°) em graus Celsius.**

Alvo	Primer	Sequência	Tm° (C)	Referência
T-DNA border	LB1	GTCAGCTCCGGCACCTTATCCTTG	63,3	1
	LB2	CCTCGTTACATCAGCTCGCAGCTAC	67,0	1
	LB3	CGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC	61,4	1
Aleatório	AD11 Pari	NCASGAWAGNCSWCAA	51,1	2
	AD5 Pari	WGCNAGTNAGWANAAG	50,2	2
	AD2 Ses	TGWGNAGSANCASAGA	49,0	3
	AD3 Liu	WGTGNAGWANCANAGA	43,7	4
	AD1Liu	NGTCGASWGANAWGAA	39,9	4
	AD6 Ama	WGCNAGTNAGWANAAG	44,0	5
	AD7 Ama	AWGCANGNCWGANATA	47,7	5

1. Favaro, 2009; 2. Parinov *et al* (1999); 3. Sessions *et al* (2002); 4. Liu e Whittier, 1995; 5. Meinke *et al.*, 2009

**Tabela 3. Reagentes e concentrações utilizados para as reações primárias, secundárias e terciárias de TAIL-PCR.**

Reagentes	Concentração na reação primária	Concentração na reação secundária	Concentração na reação terciária	Volume em uL
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	-	-	4,00
Tampão	1 X	1 X	1 X	1,60
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	2 mM	2 mM	1,60
dNTP	200 µM	200 µM	200 µM	0,04
Primer LB	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM	variável
Primer AD	variável	variável	variável	0,12
Taq polimerase	0,8 U	0,6 U	0,6 U	1,00
Produto da reação anterior diluído	20 ng de DNA genômico	1:50	1:50	1,00
Total				20,00

**Tabela 4. Concentração e volume dos primers AD utilizados nas reações de TAIL-PCR.**

Primer	Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Volume por reação		
		Primária	Secundária	Terciária
AD2_Ses	3,0	0,60	0,36	-
AD5_Par	10,0	2,00	2,00	5,00
AD11_Par	10,0	2,00	2,00	5,00
AD6_Ama	1,3	0,26	0,26	-
AD7_Ama	1,3	0,26	0,26	-
AD1_Liu	4,0	0,80	0,40	-
AD3_Liu	2,0	0,40	0,30	-

Os produtos das amplificações foram analisados em gel de agarose a 1,7% (*m/v*) para a reação secundária e 1,2% (*m/v*) para a reação terciária, com voltagem de 100 V e corrente 120 A. como descrito por Sharp *et al.*, 1973. Para visualização da molécula de DNA o gel foi corado por 2 min com solução de brometo de etídio a 2,5 $\mu\text{L/L}$  e visualizados em transiluminador UV T4941 (Sigma Aldrich, Estados Unidos da América) a 312 nm. As bandas correspondentes foram eluídas do gel e purificadas utilizando o kit Wizard SV (Promega Co., Estados Unidos da América) seguindo instruções do fabricante, para posterior clonagem.

#### 4.6.2 Clonagem e amplificação

Os produtos de PCR obtidos como acima descrito foram normalizados para 20 ng/ $\mu\text{L}$  e clonados no vetor pCR o kit TOPO TA Cloning (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts - Estados Unidos da América) (fig 8). O sistema de ligação foi então utilizado para transformação de *E. coli* Top 10 congeladas em meio SOC (triptona 2% (*m/v*), extrato de levedura 0.5% (*m/v*), NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glicose 20 mM) (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts - Estados Unidos da América) seguindo as instruções disponibilizadas pelo fabricante, com 1  $\mu\text{L}$  do produto de PCR, 0,25  $\mu\text{L}$  do vetor para 500  $\mu\text{L}$  do meio contendo 12  $\mu\text{L}$  de células competentes. A eletroporação (Bio-Rad GenePulser Xcell, Califórnia – Estados Unidos da América) foi feita em cubeta de 1mL a 1250V. Após a eletroporação as células de *E.coli* Top 10

foram coletadas da cubeta e transferidas para meio LB-líquido (triptona 1% (m/v)), extrato de levedura 0,5% (m/v), NaCl 1% (m/v)) e incubadas por 2 horas a 28°C a RPM. Em seguida uma alíquota de 200uL foi inoculada em placas de *Petri* contendo meio LB-sólido (adição de ágar 2% (m/v) ao meio líquido) contendo canamicina (50 µg/mL). As colônias emergentes foram coletadas e inoculadas em meio LB-líquido contendo canamicina (50 µg/mL), e cultivadas por 12 horas a 37°C sob agitação de 200 rpm. Esta cultura, posteriormente, foi utilizada para extração de DNA plasmidial utilizando o kit Wizard SV Plus Miniprep (Promega Corporation, Wisconsin – Estados Unidos da América) seguindo as orientações do fabricante.

Para confirmar a clonagem do fragmento da PCR terciária, a região de inserto do vetor pCR 4-TOPO foi amplificada por PCR utilizando *primers* que anelam nas regiões M13: F'(5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') e R', que, neste vetor, flanqueiam essa região (fig.8). O produto foi separado em gel de agarose a 1,2 % (m/v) com voltagem de 100 V e corrente 120 A por 40 minutos. Foi estimado seu tamanho, usando o marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder GeneRuler (Thermo Scientific, Estados Unidos da América). As bandas que apresentaram *amplicons* com inserto (isto é, maiores do que a região M13) foram purificadas com o kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen) conforme o manual do fabricante e enviadas para sequenciamento na empresa Eurofins (São Paulo – Brasil) pelo método de Sanger, com os *primers* M13.

Os dados de sequenciamento foram utilizados para gerar a região consenso utilizando o Software Geneious versão R11 (Biomatters, Auckland –Nova Zelândia), e a região flanqueada pelos sítios de *EcoRI* (Figura 7) (5'-GAATTC-3') foi selecionada para a pesquisa em banco de dados.

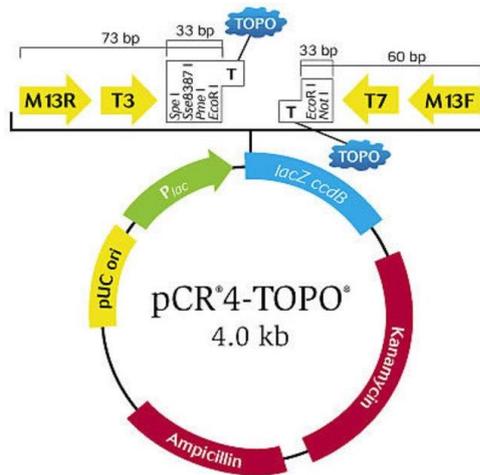


Fig 7. Mapa da construção pCR 4-TOPO+amplicon da reação terciária, mostrando região de inserção do amplicon (entre as topoisomerasas –T), e os sítios de restrição EcoR1 (adjacentes a T) utilizados para análise do fragmento clonado. Figura obtida do manual fornecido pelo fabricante.

As sequências de nucleotídeos foram comparadas com sequências depositadas nos bancos de dados do NCBI por meio das ferramentas online Basic Alignment Search Tool, BLASTn e BLASTx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Esta análise também foi realizada na plataforma online JGI MycoCosm (<https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>) utilizando o banco de dados de *Trichoderma* spp. e TR274 como referência (Steindorff *et al.*, 2016).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Triagem da biblioteca de transformantes

Com relação ao crescimento em meio sólido, os transformantes não cresceram. Já para o cultivo em meio líquido contendo glicose ou caseína como fonte de carbono o isolado parental e os transformantes (T11, T25, T26, T40, T49, T50, T112, T113, T135, T136) apresentaram crescimento. A atividade proteolítica sobre azocaseína em U/mL está apresentada na figura 8 (valores listados na tabela suplementar 4S) e foi em seguida normalizada pela massa de micélio de cada amostra.

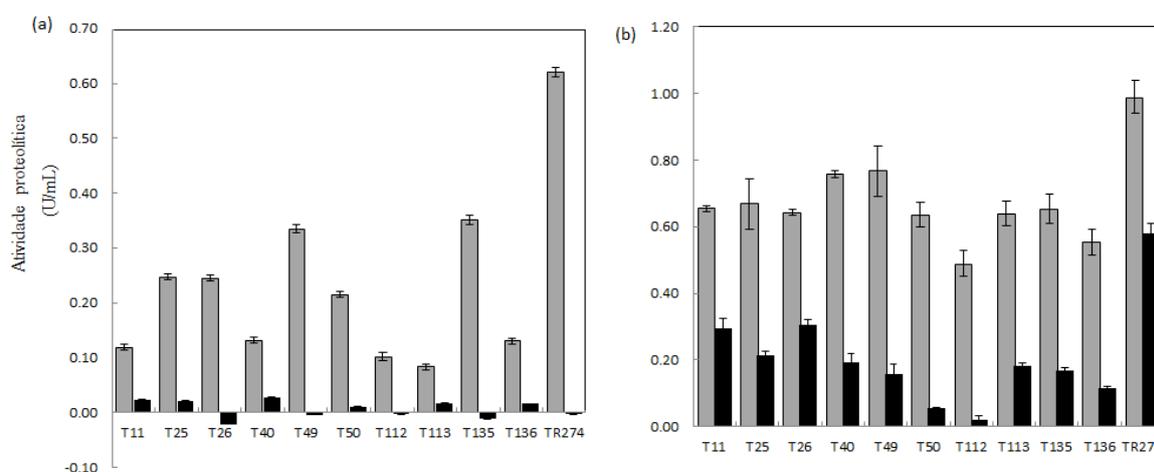


Fig. 8. Média da da atividade proteolítica (U/ml) do isolado parental e transformantes cultivados em meio suplementado com caseína (em cinza) ou glicose (em preto) como fonte de carbono. pH 8 (a) e pH 4 (b). As barras indicam o desvio padrão.

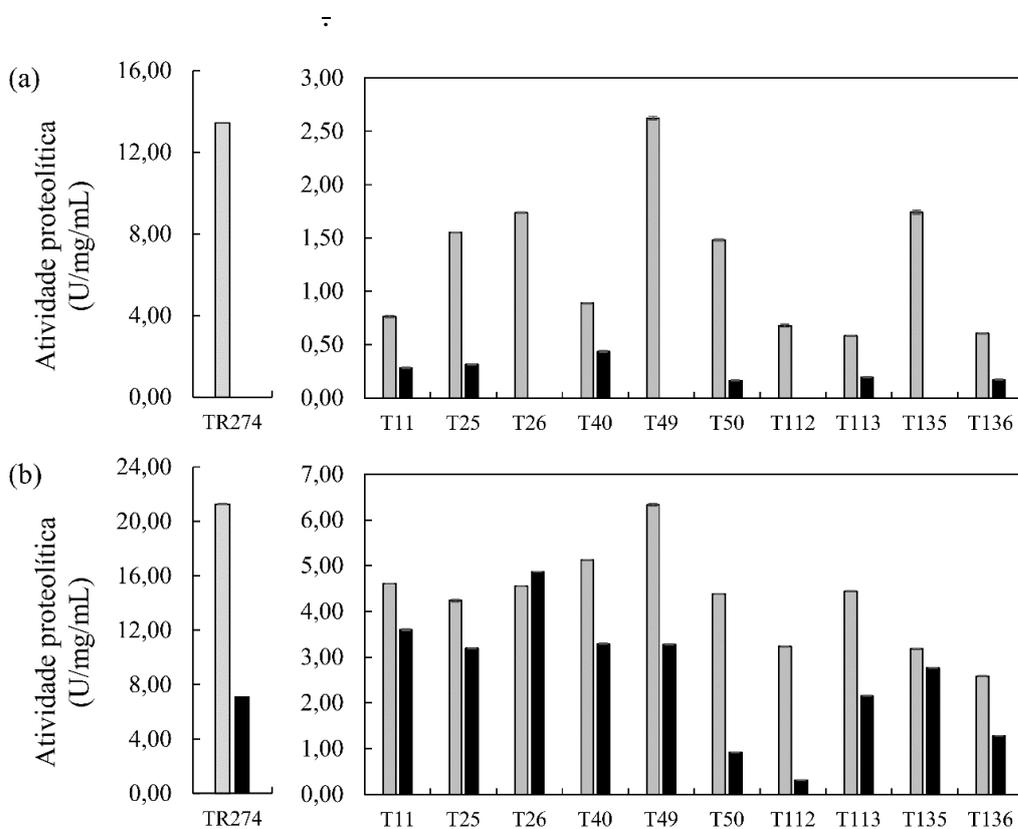
Os valores de massa micelial para o cultivo em glicose apresentaram valores próximos, variando de 0,05 a 0,084g (Figura 9 c). Nesta condição de crescimento não foi detectada atividade de proteases alcalinas para o isolado parental. Foi detectada atividade de proteases ácidas, e o isolado parental apresentou atividade específica de 7,15 U/mL/g de micélio, valor 1,47 vezes maior que o valor de atividade obtido para o transformante com maior valor de atividade, o T26 (4,89 U/mL/g).

Maiores valores de massa micelial foram verificados para o cultivo contendo caseína como fonte de carbono, com exceção do valor de massa para o isolado parental. (Figura 9 c). O valor de atividade de proteases alcalinas para os transformantes foi inferior ao obtido para o isolado parental (13,44 U/mL/g de micélio). Representando extremos, o transformante T49 apresentou atividade de 2,62 U/mL/g de micélio e T136 apresentou o

menor valor 0,60 U/mL/g de micélio (Figura.9 a). Uma vez que o crescimento micelial acidifica o meio, a produção de proteases alcalinas pode estar sendo inibida com o crescimento, o que foi verdadeiro para todas as amostras, inclusive a parental (Rosling *et al.*, 2004 ).

Para a atividade de proteases ácidas em pH 4, o isolado parental apresentou valor de atividade de 21,27 U/mL/g de micélio. O valor foi 3,36 e 8,23 vezes maior que os valores das atividades mais alta e mais baixa encontradas nos transformantes (T49, com 6,33 e T136, com 2,58 U/mL/g de micélio) (Figura 9 b). Houve indução, condizente com a acidificação do meio esperada inicialmente. A produção proteases observada é esperada em condições de estresse (Delgado-Jarana *et al.*, 2002). Confirmando a suposição da triagem em placa, a indução de proteases nos transformantes foi diferente do que linhagem parental, para ambas as faixas de pH. A figura 9 mostra escalas diferentes para ilustrar a atividade detectada para a parental e transformantes.

Os transformantes que apresentaram o conjunto de maiores e menores atividades proteolíticas foram T49, e T136 respectivamente, conforme figura, foram selecionados para o co-cultivo com *P.vulgaris*.



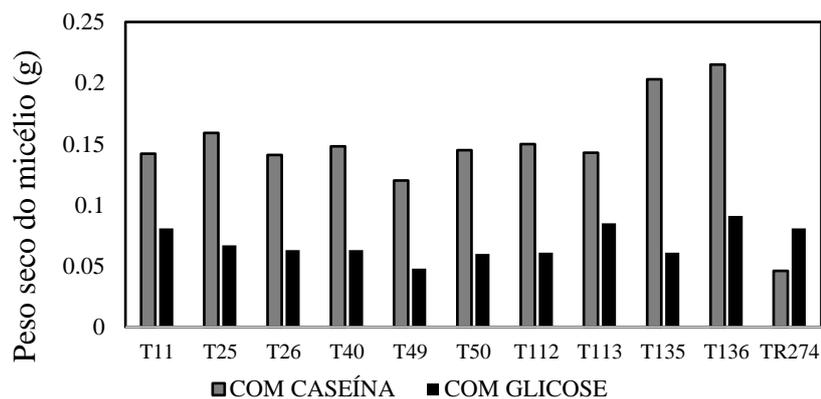


Fig. 9. Determinação da atividade proteolítica (U/ml/g) do isolado parental e transformantes, normalizada pela respectiva massa de micélio. Notar a grande diferença de escala em relação à linhagem parental. pH 8 (A) e pH 4 (B); C -Peso seco do micélio (g), com suplementação com glicose (preto) ou caseína (cinza).

Maior volume de crescimento pode acontecer em condições de deprivação de carbono. Entretanto, o volume se dá pelo processo intenso de conidiação, e que foi observado macroscopicamente foi a formação de micélio. Deprivação de carbono e estresse podem induzir também a produção de ROS, que podem aumentar a susceptibilidade de proteínas a ação de proteases, além de promoverem diretamente a sua degradação (Delgado-Jarana et al, 2002; Casas-Flores et al. 2006; Carreras-Villaseñor, 2012, Davies et al., 1987). Isso poderia justificar o aumento de massa micelial observado para os transformantes a partir da quebra das proteínas não por ação de proteases mas por ataque oxidativo.

Embora os transformantes apresentem atividade proteolítica, o valor de atividade é marcadamente inferior ao obtido para o isolado parental, indicando assim que o gene deletado está relacionado com o fenótipo de redução da secreção de proteases em condições ácida e alcalina. Proteases são secretadas por *Trichoderma* em interação com plantas hospedeiras, podendo estar envolvidas em colonização e catabolismo de estruturas e compostos da planta (Druzhinina *et al.*, 2012). Desta forma os transformantes caracterizados como protease menos podem apresentar uma modificação que afete a interação entre o fungo e planta hospedeira e do estabelecimento da simbiose, com consequente alteração na promoção do crescimento e na indução de resposta local e sistêmica.

## 5. 2 Determinação dos parâmetros morfológicos do feijoeiro em co-cultivo com *T.harzianum*

Foi observada diferença estatística (cálculos no material suplementar) nos valores de volume, comprimento e peso seco de raízes entre as plantas cultivadas na presença do isolado parental e dos transformantes (Figura 10 a, b, c). O isolado parental levou a um aumento de todos os parâmetros de raiz, enquanto os transformantes não, particularmente o T136, que prejudicou seu desenvolvimento, sugerindo que a deleção dos genes nos transformantes afetou em parte a habilidade de estimular o crescimento radicular, se tornando desvantajoso para ambos os organismos, já que o aumento da raiz aumenta a superfície de colonização pelo fungo. Aumento do volume de raízes de plantas hospedeiras por espécies de *Trichoderma* já foi demonstrado para os modelos de interação (Shoresh e Harman, 2010). Trabalhos anteriores utilizando isolados de espécies de *T. harzianum* têm demonstrado que essa espécie é capaz de promover crescimento na planta hospedeira. Pereira *et al.* (2014) mostraram que em co-cultivo com feijoeiro comum o isolado *T. harzianum* ALL 42 promoveu o crescimento da planta, os autores verificaram aumento na área radicular e foliar. A propriedade de espécies de *Trichoderma* de promover crescimento em plantas hospedeiras têm sido atribuída, entre outras à capacidade do fungo de melhorar a taxa fotossintética e respiratória da do vegetal (Hermosa et al., 2012), estímulo de fitormônios como auxinas, responsáveis em grande parte pelo aumento da superfície radicular, que por sua vez se torna mais apta à captação de nutrientes e água (Wang et al., 2018). Não foi observada diferença significativa nos parâmetros de área foliar e comprimento da parte aérea para nenhuma das condições de co-cultivo (Figura 10 c, d).

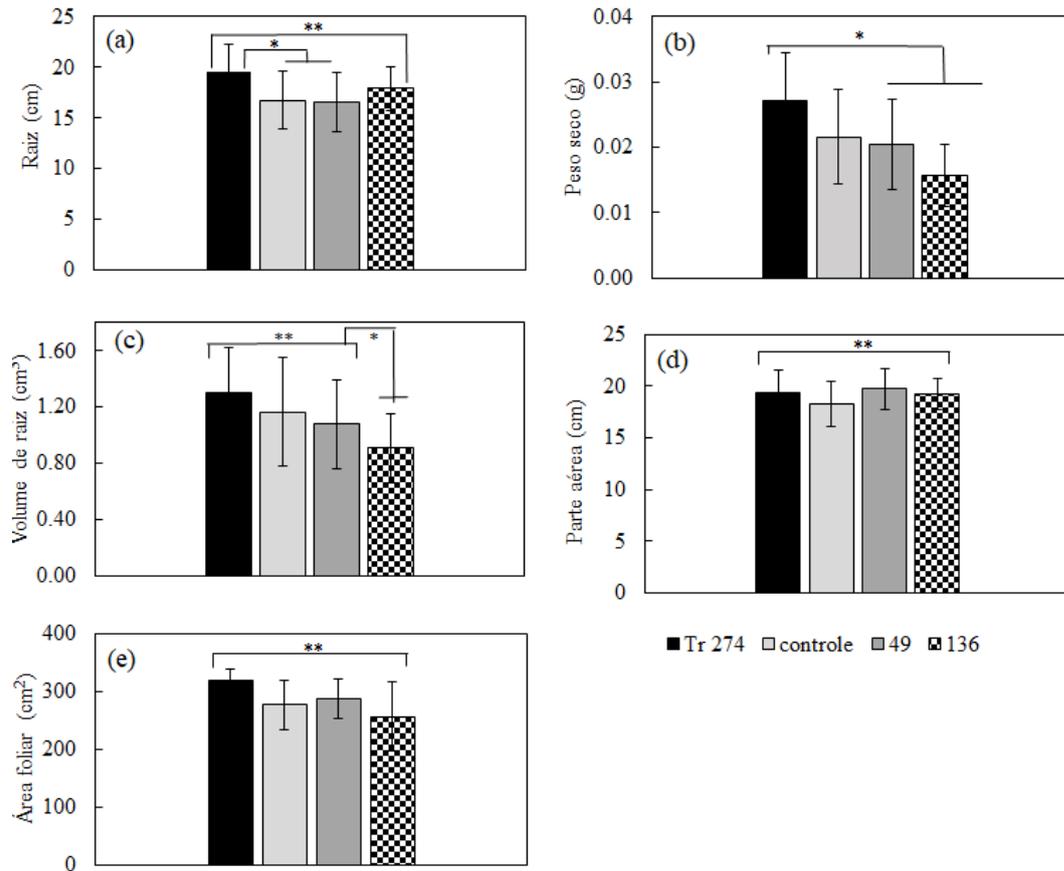


Fig. 10 Média dos parâmetros morfológicos: A- comprimento de raiz em cm; B- peso seco das raízes em g; C volume de raiz em cm<sup>3</sup>, D- comprimento da parte aérea em cm, E- área foliar em cm<sup>2</sup>. Asteriscos indicam diferença estatística para p<0.05.

Embora não tenha sido observada diferença em relação à parte aérea, o feijoeiro em interação com o transformante T49 exibiu raízes menores, enquanto com T136 houve diferença no volume e peso seco, mas não no comprimento. Como o comportamento de transporte dos hormônios varia conforme a estrutura da planta (Muday, Rahman, Binder, 2012; Li *et al.*, 2017) e a atividade depende das suas concentrações relativas nos tecidos (Sofo *et al.*, 2012), a promoção e o padrão do crescimento radicular (principal, lateral, pelos radiculares) pode ou não guardar relação com o crescimento da parte aérea ou folhas. Isso se observa mesmo em linhagens selvagens de *Trichoderma* (Nieto-Jacobo *et al.*, 2017). Portanto, a promoção de crescimento não é uma característica universal entre as espécies de *Trichoderma* que estabelecem interações simbióticas com plantas.

A interação entre *Trichoderma* spp e plantas hospedeiras pode levar à alteração nos níveis dos fitormônios SA, JA e etileno, que controlam o nível de auxinas, citocininas e ácido abscísico, hormônios relacionados ao perfil de crescimento de vegetal. Os efeitos desses hormônios sobre o crescimento não são antagônicos quanto o são na indução de

resposta imune, mas mostram características distintas, conforme referenciados na tabela 5. O efeito final na promoção ou não do crescimento de plantas hospedeiras está relacionado ao balanço na produção do JA e o AS, fitormônios considerados dominantes nos perfis de desenvolvimento (Aloni *et al.*, 2006; Pieterse *et al.*, 2012).

Como estes dois hormônios também atuam em resposta a estresse e invasões, há normalmente uma relação negativa entre resposta de defesa e promoção de crescimento em plantas, o que foi demonstrado em *Arabidopsis thaliana*. Guo *et al* (2018) propuseram que a resposta de defesa mediada pelo hormônio JA demanda gasto energético e está associada à redução na sua taxa de crescimento, considerando a indução da defesa como elemento de estresse.

**Tabela 5. Efeitos hormonais em crescimento e resposta de defesa em plantas. Negrito: resultados observados no presente estudo na interação de feijoeiro com os transformantes.**

Hormônio sinalizador	Raiz	Crescimento	Resposta imune	Necrose	Estimula
AS	Reduz (1) ou Aumenta (2)	Reduz (1)	<b>SAR</b>	<b>Aumenta (7, *)</b>	Citocininas; Ácido abscísico
Etileno	<b>Reduz + Pelos(3, *)</b>	Reduz (5)	IRS	<b>Aumenta (8,*)</b>	IAA
JA	Reduz + Lateral (4)	Variado (6)	IRS	Reduz (8)	IAA

\*Presente Estudo; 1. Wildermuth e Jones, 2009; Rivas-San Vicente e Plasencia, 2010; 3. Song *et al.*, 2016; 4. Wasternack e Hause, 2013; 5. Růžička *et al.*, 2007; 6. Wasternack e Hause, 2013; 7. O'Donnel *et al.*, 2001; 8. Jennings, 2000.

### 5.3 Teste de susceptibilidade à *S. sclerotiorum*

As folhas de plantas de feijoeiro em co-cultivo com os transformantes apresentaram uma reação necrótica muito mais extensa que a observada para as folhas de plantas cultivadas na ausência de interação ou com isolado parental. Nestas duas últimas condições, as folhas apresentaram, com grande predominância, lesões visíveis mais moderadas e sem sinais do patógeno (Figura 11). Desta forma, conclui-se que a deleção nos transformantes testados altera a interação do *T. harzianum* TR274 com o feijoeiro levando a um aumento de sua suscetibilidade à infecção pelo necrotrófico *S. sclerotiorum*.

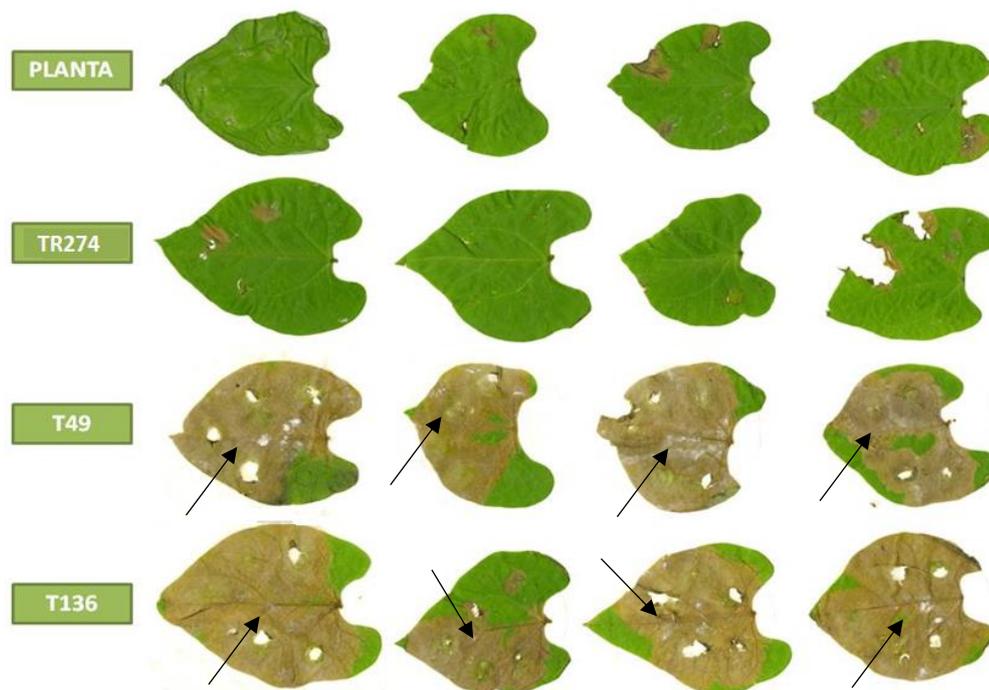


Fig. 11. Teste de susceptibilidade de feijoeiro à *S.sclerotiorum* utilizando folhas destacadas expostas a discos de ágar com o patógeno. Resultado da exposição por 3 dias. A amostra “planta” refere-se ao controle sem interação com *T. harzianum* As setas indicam o mofo-branco.

Espécies de *Trichoderma* se associam com a planta hospedeira e essa interação leva a um estado basal de defesa da planta, resultado conhecido como *priming*. Desta forma, a planta hospedeira em associação com *Trichoderma* spp. apresenta resistência mais efetiva a invasões e infecções subsequentes (Conrath 2011; Lorito, 2010). Neste caso, a resposta de defesa caracterizada pela necrose é bastante controlada, não sendo apresentada pela planta hospedeira. No entanto, nos feijoeiros cultivados na presença dos transformantes, não foi observada essa regulação que caracteriza e eficiência desse tipo de resposta, sugerindo que o *priming* não ocorreu da forma característica.

Uma questão a se considerar é que microrganismos em relação simbiótica com a planta hospedeira atuam desencadeando e inibindo a resposta de defesa da planta, e o equilíbrio entre estes estímulos possibilita que estes colonizem e se estabeleçam em seus tecidos (Nogueira-Lopez, 2018). Desta forma, os resultados de suscetibilidade sugerem uma alteração neste balanço e uma resposta de defesa intensa que levaram à resposta de hipersensibilidade da planta hospedeira. A reação de necrose foliar em resposta ao contato com *S. sclerotiorum* denota um desequilíbrio no mecanismo disparador e de contenção da necrose em resposta a um patógeno necrotrófico. Isso denota um *priming*, uma vez

que difere da reação natural da planta, mas deletério, promovido pela interação com os transformantes.

Segundo Jennings (2000), esse perfil de necrose é compatível com dominância de SA e etileno e incompatível com alta atividade de JA. O etileno, quando associado ao perfil de resposta do SA, reprime a via do JA, promovendo a propagação da necrose, enquanto que JA contém essa propagação, garantindo a resposta típica contra necrotroficos, IRS, que não está sendo apresentada pelos feijoeiros co-cultivados com os transformantes. Isso sugere modificação na indução do perfil fitormonal da planta pelos transformantes, em relação ao esperado para a linhagem parental conforme constatado pelo nosso grupo de trabalho (Silva, 2014).

Ainda na questão do equilíbrio entre estímulo e atenuação da resposta, em estudo de interação com milho, houve constatação da diminuição da expressão de SSCRP, que atuam como elicitores de defesa na planta, por *T.harzianum*. Em interação com mutantes *knock-out* para Sm1, foi verificada maior indução de IRS, o que sugere uma estratégia de controle da intensidade da reação da planta pelo fungo (Crutcher, 2015), possibilitando a simbiose. O perfil de baixa atividade proteolítica no secretado dos transformantes pode denotar que moléculas elicitoras, ou efetoras de natureza proteica de *Trichoderma* não estão sendo reguladas pelo fungo, por exemplo por clivagem no ambiente extracelular de maneira a se equilibrar com a resposta da planta, passando a estimular a resposta não mais como simbiote, mas como um patógeno, agindo sinergia com um necrotrofico como *S. sclerotiorum*.

#### 5.4 Identificação do gene nocauteado nos transformantes

A reações de TAIL-PCR apresentaram produtos de amplificação nas reações secundária e terciária, um produto de aproximadamente 700 pb para o transformante T136 e um de aproximadamente 1300 pb para o transformante T49 utilizando os pares de *primers* LB referentes à etapa mais AD11 ou AD5, respectivamente (resultado não mostrado). A clonagem destes produtos em pcR4TOPO foi confirmada por PCR sendo observado produtos de tamanho esperado observado na figura 12, que inclui a amplificação das regiões entre M13 F' e R', de aproximadamente 150 pb e listadas na figura complementar 5.

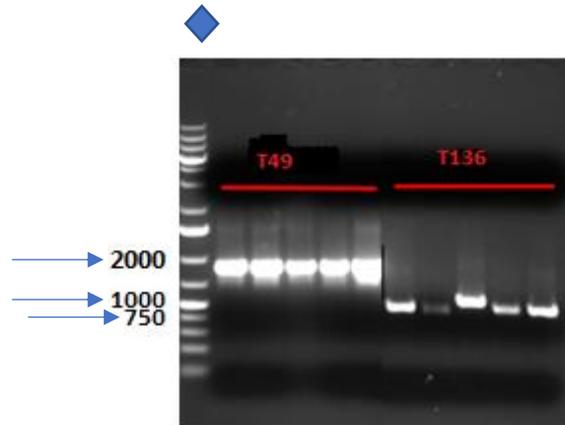


Fig. 12. Análise da clonagem dos produtos da TAIL-PCR. Marcador molecular (GeneRuler 1kb Plus) no primeiro poço, indicado pelo diamante. Os transformantes T49 e T136 correspondem aos poços 2 a 6 e 7 a 11, respectivamente. As setas indicam as banda de DNA com 1000 pb e 500 pb.

As seqüências dos *amplicons* (Figura 13) não apresentaram identidade com nenhuma seqüência dos bancos de dados JGI MycoCosm ou NCBI BLASTx e BLASTn. O sequenciamento do fragmento de T136 mostrou claramente a região de anelamento do primer LB3, enquanto que a de T49, não, o que deixa dúvidas sobre a especificidade da amplificação, pois certamente trata-se de um transformante, confirmado por amplificação de um trecho do pFat pelo grupo da Dra. Leia Fávoro (EMBRAPA Agroenergia, DF).

T49

GAATTCGCCCTTATGCCAACTGAAGTTGCCTAGAATTTGAGGATACTGACTTTTCGACAGGCGTCGATTGCGAGGTATGATGTTTCAACTCCCATT  
AATCACCAGCACTCTACCTTAGAACGAATGGACGATCCAACAACAAGGATAAATGGCAATTCTGTATTCTGGGTGACTTTCTGTCTGGTTGGCC  
AGCCACTAGGCGCATTGCTGTACTTTTTGCCTGGCAGGCAAAATACGGTAGTGTTAGCAAGTTGGCAGCTAGTCCATGACCATGGTTGCATGCC  
GTTGAAACGAGACCAGTCAGATGAAAGCTGTCGGCAACGTGAAATATAATGACTAGAATGTTGCTCGAATAAATTTCCATTTAATAGAGTGTC  
GGGCTGGAGTCTGGCCGAGATACGATTAGGCCACCTATCATTAGTTTGGGGTCTCTCGACAGCCGACCCCGGCCATAGTACAGCTATAAGG  
GTACCCGCTGACATCATCCATGTATTTATTTCTGAGCTTCAACAACATAACAGCTACTTCACACTTTACACTCCATTGCAACACATACCAACTCA  
ATCAATTCACCATGGTTTCAATCACCGTCCCGAGAAGTATGGGTACGTATTCTCTCTCTTATCTATGAGCGTTCTACGCTTCAGCACGTTTACC  
GATTCAATCGATTAATCACTAACATGATAATCTACAGCACCGTTCATCGCTGTGCGCTCGGC GGAATCCCTCTACTCTCATGGATCCAGGGCATTG  
TCGTGACTAGTCTACGCAAACCTGCCAAAGTGCCTTATCCGCAACACTATGCGACGGCCGAAACAATGCAAGGAGAACGTACGTCCCTCCATCCC  
TTTTCCAAATGAAGCTCGGAGTGTAGTAGTACTGACGAAGGGCGAATTC

T136

GAATTCGCCCTTGACAGAAAAGGCGTCAAGCAGATCACGCTTTTCGACAGCGTCGGATTTGCGATCGAGGATTTTTGGCCTGCGCTACGTCGCGC  
GACCGCGTTGAGGGATCAAGCCACAGCAGCCACTCGACCTTCTAGCCGACCCAGACGAGCCAAGGGATCTTTTGGAAATGCTGCTCCGTGCTC  
AGGCTTTCGACGTTTGGGTGGTTGAAACAGAAAGTCAATATCGCACGGAATGCCAAGCACTCCCGAGGGGAAACCTGTGGTTGGCATGCACATAC  
AAATGGACGAACGATAAACTTTTACGCGCTTTTAAATATCCGATTATTCTAATAAACGCTCTTTTCTCTTAGGTTTACCCGCCAATATATCCTGT  
CAAACACTGATAGTTTAACTGAAGGGCGGAAACGACAATCTGATCATGAGCGGAGAATTAAGGGAGTCAGGTTATGACCCCGCCGATGACG  
CGGGACAAAGCCGTTTACGTTTGGAACTGACAGAACCGAACGTTGAAGGAGCCACTAGCCGCGGTGGCGGCGCTACAACCCACCCGCGTTG  
GCAGGAAAAAGGCGAAGACTTCACTTTGCGATGGAGGAAGTGTGTGATGGGTAGGCATAATCTATTTATAGACGTCATAAGGACATAT  
TGTGGTGTAAACAATTGACGCTTAGACAACCTAATAACACATTGCGGACGTTTTTAAATGTAAGTGAATGCGCCGGCCAGGCGCCAGAAAGCTTT  
GGCGTGGCCATTGTGCATGGTGGCAGTGGTGTGCGGACATTGTTGATGTGACAGGGGGGTAGCTGCGAGCTGATGTAACGAGGAAAGGGC  
GAATTC

Fig 13. Seqüências recuperadas da clonagem em vetor 4TOPO. As regiões em vermelho são os sítios de restrição *EcoRI*, contidos em M13. Em verde, local de anelamento do primer LB3. Em azul, fragmento do vetor pFat.

A inserção pode não ter se dado em uma sequência codificadora de proteína. Por exemplo, poderia ser em uma região promotora ou ainda na sequência que codifica a sinalização de transporte e secreção, que podem ser menores e, portanto, mais difíceis de se conseguir um alinhamento considerável dentro dos parâmetros dos bancos. Além disso, em decorrência da inserção, o alinhamento se torna ainda mais difícil pelo fato de a região estar interrompida.

Talvez por isso não seja incomum em estudos com transformantes que, correspondendo a um fenótipo alterado, não seja encontrado um gene responsável. Fan *et al.*, (2014), em estudo com 450 transformantes de *T.harzianum* por *A. tumefaciens*, triados para perfil de alteração da indução de resistência em milho ao fungo patogênico biotrófico *Curvularia luneta*, identificou seis mutantes promissores. Quatro destes transformantes mostraram inserções do T-DNA em regiões não codantes e deleções nas bordas do T-DNA. Apenas dois apresentaram interrupção de genes e retornaram resultados quando confrontados com bancos de dados genéticos.

Ainda, pode ter ocorrido de os *amplicons* conterem apenas uma parte muito curta de uma sequência codificadora. Nesse trabalho foi utilizado o *primer* LB nos pares com os *primers* AD nas reações, mas não o *primer* RB como componente específico de iniciação. Portanto, a região adjacente à inserção do T-DNA não teve sua sequência completa. Dessa forma, não foi possível a obtenção de dados mais robustos para o alinhamento, o que repercutiu no resultado obtido.

Mesmo para um organismo com genoma depositado em banco de dados como *Trichoderma harzianum* pode-se obter cobertura baixa ou não se indicar identidade, devido principalmente a falhas técnicas, como incorporação de material genético do vetor, por exemplo.

## 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os transformantes T49 e T136 apresentaram perfil metabólico com alteração fenotípica para proteases secretadas, que pode advir de vários fatores, tais como alteração de transcrição, interrupção de ciclo sintético, compensação metabólica, dentre outros. A modificação genética dos transformantes T49 e T136 provavelmente alterou as características de sua interação com feijoeiro e esta mudança pode ter ocorrido por uma mudança na produção de moléculas envolvidas na indução (MAMPs, DAMPs e hormônios) e inibição da resposta adequada de defesa da planta hospedeira. Como mencionado, a relação positiva ou negativa entre defesa e crescimento de plantas hospedeiras depende do tipo e intensidade da resposta de defesa.

Uma vez que não foi identificado um gene responsável pelo fenótipo, é preciso considerar o que pode estar acontecendo na fisiologia do fungo. Quanto à relação entre aumento de suscetibilidade a mofo branco e diminuição da produção de proteases, Guzmán-Guzmán e colaboradores (2016) identificaram em proteases alcalinas sequências de domínios conservados em proteínas efetoras de patógeno. Isso pode sugerir que proteases com estes domínios em *T. harzianum* poderiam atuar como efetores inibindo a PTI em plantas hospedeiras, o que justificaria uma resposta de defesa mais intensa e maior suscetibilidade desencadeada pelos transformantes.

A técnica de AMT é uma ferramenta eficaz para o estudo de perfis metabólicos em organismos quando não se conhecem genes específicos. No presente trabalho, utilizando a abordagem de transformação AMT, foi possível identificar modificações genéticas relacionadas a mudanças na interação entre os transformantes de *T. harzianum* TR274 e feijoeiro. No entanto, uma vez que a análise de interação simbiótica é um processo extremamente complexo, mais análises serão necessárias para identificar quais rotas envolvidas na promoção de crescimento e modulação de resposta de defesa foram efetivamente afetadas. Como por exemplo, a investigação da expressão de genes marcadores da planta relacionados a diferentes vias de síntese dos compostos ligados à ativação de defesa, como produção de fitormônios e resistência a patógenos, além de investigação da expressão de genes relacionados à interação nos próprios transformantes.

Outra questão crucial é a identificação dos genes que foram deletados nestes transformantes, neste caso o que pode ser feito é proceder à TAIL-PCR com o par RB/AD

(todos os utilizados inicialmente), além da repetição com LB/AD que amplificaram fragmentos.

## 7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams P., De-Leij F. A., Lynch J. M. (2007). *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. *Microb. Ecol.* 54 306–313. 10.1007/s00248-006-9203-0
- Alfano G, Ivey MLL, Cakir C, Bos JIB, Miller SA, Madden LV, Kamoun S, Hoitink HAJ (2007) Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathology* 97 429–437
- Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI (2006) Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann Bot* 97:883–893
- Azarmi, R.; Hajiegharari, B. and Giglou, A. (2011) - Effect of *Trichoderma* isolates on tomato seedling growth response and nutrient uptake. *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, n. 31, p. 5850-5855. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB10.1600>
- Badri, DV., Vivanco, JM. (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ.* 32, 666–681
- Bae, H., Roberts, DP., Lim, HS., Strem, M., Park, SC., Ryu, CM., et al. (2011). Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24, 336–351.
- Bailey-Serres, J., Mittler, R. (2006). The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol.* 141, 900191.
- Bais, H. P. et al. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 233–266
- Bashir, Z., Shafique, S., Ahmad, A., Shafique, S., Yasin, NA., Ashraf, Y., Ibrahim, A., Akram, W., Noreen, S. (2016). Tomato Plant Proteins Actively Responding to Fungal Applications and Their Role in Cell Physiology. *Frontiers in physiology*, 7, 257. doi:10.3389/fphys.2016.00257

Bassinello, PZ. Pós-produção: qualidade dos grãos. Brasília, DF: Embrapa Arroz e Feijão, 2007. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia4/AG01/arvore/AG01\\_2\\_28102004161635.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia4/AG01/arvore/AG01_2_28102004161635.html)>. Acesso em: 20 mar. 2016.

Benítez, T., Rincín, A.M., Limón, M.C., Codón, A.C., (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7, 249–260.

Bissett J, Gams W, Jaklitsch W, Samuels GJ (2015) Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus* 6:263–295

Boller T, Felix G . (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60, 379–406.

Boller T, He SY . (2009) Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 324, 742–744.

Brotman Y, Landau U, Cuadros-Inostroza A (2013) *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance *PLoS Pathog* 9 e1003221

Brotman Y, Briff E, Viterbo A, Chet I (2008) Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol* 147: 779–789.

Brotman Y, Lisek J, Meret M, Chet I, Willmitzer L, et al. (2012) Transcript and metabolite analysis of the *Trichoderma*-induced systemic resistance response to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*. *Microbiology* 158: 139–146.

Caarls L, Elberse J, Awwanah M, Ludwig NR, de Vries M, Zeilmaker T, Van Wees SCM, Schuurink RC, Van den Ackerveken G (2017) *Arabidopsis* JASMONATE-INDUCED OXYGENASES down-regulate plant immunity by hydroxylation and inactivation of the hormone jasmonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: 6388–6393

Carreras-Villaseñor N, Sanchez-Arreguin JA, Herrera-Estrella AH. (2012). *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. *Microbiology* 158:3–16

Carris, L. M., C. R. Little, C. M. Stiles. (2012). Introduction to Fungi. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-I-2012-0426-01Carris, L. M., C. R. Little, C. M. Stiles.

(2012). Introduction to Fungi. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-I-2012-0426-01

Casas-Flores S, Rios-Momberg M, Rosales-Saavedra T, Martinez-Hernandez P, Olmedo-Monfil V, Herrera-Estrella A. (2006) Cross talk between a fungal blue-light perception system and the cyclic AMP signaling pathway. *Eukaryot Cell* 5:499–506.

Casimiro A, Beeckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G, Bennett MJ. (2003) Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends Plant Sci.*; 8(4):165-71

Chacón, M. R., Rodríguez-Galán, O., Benítez, T., Sousa, S., Rey, M., Llobell, A., et al. (2007). Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *Int. Microbiol.* 10, 19–27. doi: 10.2436/20.1501.01.4

Chet I., Benhamou N., Haran S. (1998) Mycoparasitism and lytic enzymes. in *Trichoderma and Gliocladium*, eds. Harman G. E., Kubicek C. P. (Taylor and Francis, London, United Kingdom), 2:153–172.

Coll, Epple & Dangl (2011) Coll NS, Epple P, Dangl JL. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death and Differentiation*;18:1247–1256

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileiro – grãos: Nono levantamento, junho 2016 – safra 2013/2014.: Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento. 2016. Disponível em: . Acesso em: 02 jul. 2018.

Conrath U. (2011) Molecular aspects of defence priming. *Trends Plant Sci.*16:524–31

Contreras-Cornejo HA Macías-Rodríguez L Beltrán-Peña E. (2011) *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal and camalexin dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea* *Plant Signal Behav*

Contreras-Cornejo HA Macías-Rodríguez L López-Bucio J Enhanced Plant Immunity using *Trichoderma* in Gupta VK ed. *Biotechnology and Biology of Trichoderma* Oxford: Elsevier 2014 495 504

Contreras-Cornejo HA, Macias-Rodriguez L, Cortes-Penagos C, Lopez-Bucio J (2009) *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and

promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 149:1579–1592

Cook, J.R. and Baker, K.F. (1983) The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. *American Phytopathological Society*, St. Paul.

Couto D, Zipfel C (2016) Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat Rev Immunol* 16:537–552

Crutcher, F. K., Moran-Diez, M. E., Ding, S., Liu, J., Horwitz, B. A., Mukherjee, P. K., et al. (2015). A paralog of the proteinaceous elicitor SM1 is involved in colonization of maize roots by *Trichoderma virens*. *Fungal Biol.* 119, 476–486

Dandan Li,<sup>1,3</sup> Yu Tang,<sup>4</sup> Jun Lin, and Weiwen Cai

de Groot MJ, Bundock P, Hooykaas PJJ, Beijersbergen AG (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol* 16: 839–842; erratum de Groot MJ, Bundock P, Hooykaas PJJ, Beijersbergen AG (1998) *Nat Biotechnol* 16: 1074

De Wit PJ, Mehrabi R, Van den Burg HA, Stergiopoulos I. (2009) Fungal effector proteins: past, present and future. *Mol Plant Pathol* 10: 735–747

Delgado-Jarana, J., A.M. Rincón, and T. Benítez. (2002). Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2431: cloning and characterization. *Microbiology* 148, 1305-1315

Deller S, Hammond-Kosack KE, Rudd JJ. (2011) The complex interactions between host immunity and non-biotrophic fungal pathogens of wheat leaves. *J Plant Physiol* 168: 63–71

Depuydt S., Hardtke C.S. (2011) Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Curr. Biol.* 21: R365–R373.

Djonovic S, Vargas WA, Kolomiets MV, Horndeski M, Weist A, Kenerley CM (2007) A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for systemic resistance in maize. *Plant Physiol* 14 875–889

Djonovic S., Pozo M. J., Dangott L. J., Howell C. R., Kenerley C. M. (2006). Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 838–853.

Druzhinina I.S., Kopchinskiy A.G., Komoń M., Bissett J., Szakacs G., Kubicek C.P. (2005) An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet. Biol.* ;42:813–928.

Druzhinina I.S., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B.A., Kenerley C.M., Monte E., Mukherjee P.K., Zeilinger S., Grigoriev I.V., Kubicek C.P.(2011) *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat. Microbiol. Rev.*;16:749–759.

Druzhinina IS, Chenthamara K, Zhang J, Atanasova L, Yang D, Miao Y, Rahimi MJ, Grujic M, Cai F, Pourmehdi S, et al. (2018) Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts. *PLoS Genet.*;14, 4:e1007322.

Druzhinina, I. S., Shelest, E., and Kubicek, C. P. (2012). Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. *FEMS Microbiol. Lett.* 337, 1–9

Empresa Brasileira de Pecuária e Agricultura (EMBRAPA) Controle biológico de pragas. Relatório técnico, Brasil, 2011.

Empresa Brasileira de Pecuária e Agricultura (EMBRAPA) Variedades de feijão. Relatório técnico, Brasil, 2004.

Fan, L Fu K, Yu C, Ma J, Li Y, Chen J. (2014) Construction and functional analysis of *Trichoderma harzianum* mutants that modulate maize resistance to the pathogen *Curvularia lunata*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 49, 8, p. 569-577,.

Farmaki T., Sanmartín M., Jiménez P., Paneque M., Sanz C., Vancanneyt G., et al. (2007). Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts. *J. Exp. Bot.* 58, 555–568

Favaro, L. C. de L. Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). Embrapa Agroenergia-Tese/dissertação (ALICE), 2009.

Fitzgerald, Anna M. et al. (2003). Agrobacterium and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. *Mycological research*, 107, 7, 803-810,

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

Friedl, M. A. & Druzhinina, I. S. (2012). Taxon-specific metagenomics of *Trichoderma* reveals a narrow community of opportunistic species that regulate each other's development. *Microbiology* 158, 69–83

Fuchslocher-Chico J, Saggau C, Adam D. (2017) Proteolytic control of regulated necrosis. *Biochim Biophys Acta.* ;1864:2147.

Gams W, Bissett J. Morphology and Identification of *Trichoderma* . In: Kubicek CP, Harman GE, eds. *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. London: Taylor and Francis Ltd.; 1998. pp. 3–34.

Gazzarrini, S., and McCourt, P. (2001). Genetic interaction between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 387–391.

Gelvin, Stanton B. (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67,. 1, 16-37

Geremia, R. A., Goldman, G. H., Jacobs, D., Ardiles, W., Vila, S. B. et al. (1993). Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol. Microbiol.* 8: 603–613.

Glazebrook, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. (2005) *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205–227,

Gomes EV, Nascimento CM, Graciano PR, Azevedo R R, et al. (2015) The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self cell wall protection. *Sci Rep* 5

Gouka RJ, Gerk C, Hooykaas PJ, Bundock P, Musters W, Verrips CT, de Groot MJ (1999) Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. *Nat Biotechnol* 17: 598–601

Guo, J., Wang, S., Yu, X., Dong, R., Li, Y., Mei, X., et al. (2018). Polyamines regulate strawberry fruit ripening by ABA, IAA, and ethylene. *Plant Physiol.* 177, 339–351.

- Guzmán-Guzmán, P., Alemán-Duarte, M. I., Delaye, L., Herrera-Estrella, A., Olmedo-Monfil, V. (2017) Identification of effector-like proteins in *Trichoderma* spp. and role of a hydrophobin in the plant-fungus interaction and mycoparasitism. *BMC Genet.* 18, 16,
- Hamin Neto, Y., da Rosa Garzon, N. G., Pedezzi, R., & Cabral, H. (2017). Specificity of peptidases secreted by filamentous fungi. *Bioengineered*, 9, 1, 30-37.
- Harman GE, Petzoldt R, Comis A, Chen J (2004. b) Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of this interaction on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 30–38.
- Harman GE, Shoresh M (2007) The mechanisms and applications of opportunistic plant symbionts. In M Vurro, J Gressel, eds, *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*. Springer, Amsterdam, pp 131–157
- Harman, GE. (2011). Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytology*, 189, 647–649.
- Harman, GE., Howell, CR., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 43–56.
- Hedstrom, L. (2002) Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*, 102, 4501-4523.
- Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E (2012) Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158: 17–25.
- Hermosa, R., Rubio, M. B., Cardoza, R. E., Nicolas, C., Monte, E., and Gutierrez, S. (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *Int. Microbiol.* 16, 69–80
- Hörger AC, and Van der Hoorn RAL (2013) The structural basis of specific protease–inhibitor interactions at the plant–pathogen interface, *Current Opinion in Structural Biology*, 23: 842-850.

Howell CR. (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease.*, 87,1 4–10.

Howell, C. R. (2006). Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology*, 96, 178–180.

Howell, C.R., Stipanovic, R.D. (1995) Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. *Phytopathology* 85, 469–472

Hutadilok-Towatana N, Painupong A, Suntainalert P (1999). Purification and Characterization of an Extracellular Protease from Alkaliphilic and Thermophilic *Bacillus* sp. PS719. *J Biosci Bioeng.* 87: 581-587

Ito, M. F.; Parisi, J. J. D. (2010) Mofo branco: Doença que exige muita atencao principalmente no periodo outono inverno. *Trichoderma* spp.,

JGI, 2018. Disponível em: <<https://genome.jgi.doe.gov/cgi-bin/dispGeneModel?db=Trihar1&tid=796901>> Acesso em: 23/08/2018.

Jones, J.D., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*.

Karimi Jashni M., Dols H. M. I., Iida Y., Boeren S., Beenen H. G., Mehrabi R., et al. (2015). Synergistic action of a metalloprotease and a serine protease from *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* cleaves chitin-binding tomato chitinases, reduces their antifungal activity and enhances fungal virulence. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10.1094/MPMI-04-15-0074-R [Epub]

Davies K J. A., Lin S W., and Pacifici R E. 1986 Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals. *The Journal of Biological Chemistry* 0 1987, The American Society of Biological Chemists, Inc. EUA

Koonin EV, Galperin MY. *Sequence - Evolution - Function: Computational Approaches in Comparative Genomics*. Kluwer Academic. Boston; 2003.

Kredics L, Hatvani L, Naeimi S, et al. Biodiversity of the genus *Hypocrea/Trichoderma* in different habitats. *In*: Gupta VG, Schmoll M, Herrera-

Estrella A, et al., eds. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier; 2014. pp. 3–24.

Kredics L., Antal Z., Dóczy I., Manczinger L., Kevei F., Nagy E. (2003) Clinical importance of the genus *Trichoderma*. A review. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 50:105–117.

Kredics, L., Z. Antal, A. Szekeres, L. Hatvani, L. Manczinger, C. S. Vágvölgyi and E. Nagy. (2005). Extracellular proteases of *Trichoderma* species. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 52: 169–184.

Kubicek C.P., Bissett J., Kullnig-Gradinger C.M., Druzhinina I.S., Szakacs G. (2003) Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet. Biol.* 38:310–317

Kubicek C.P., Herrera-Estrella A., Seidl-Seiboth V., Martinez D.A., Druzhinina I.S., Thon M., Zeilinger S., Casas-Flores S., Horwitz B.A., Mukherjee P.K., Mukherjee M., Kredics L., Alcaraz L.D., Aerts A., Antal Z., Atanasova L., Cervantes-Badillo M.G., Challacombe J., Chertkov O., McCluskey K., Couplier F., Deshpande N., von Döhren H., Ebbole D.J., Esquivel-Naranjo E.U., Fekete E., Flipphi M., Glaser F., Gómez-Rodríguez E.Y., Gruber S., Han C., Henrissat B., Hermosa R., Hernández-Oñate M., Karaffa L., Kosti I., Le Crom S., Lindquist E., Lucas S., Lübeck M., Lübeck P.S., Margeot A., Metz B., Misra M., Nevalainen H., Omann M., Packer N., Perrone G., Uresti-Rivera E.E., Salamov A., Schmoll M., Seiboth B., Shapiro H., Sukno S., Tamayo-Ramos J.A., Tisch D., Wiest A., Wilkinson H.H., Zhang M., Coutinho P.M., Kenerley C.M., Monte E., Baker S.E., Grigoriev I.V. (2011) Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol.* 12:R40.

Kupfer DM, Drabenstot SD, Buchanan KL, Lai H, Zhu H, Dyer DW, Roe BA, Murphy JW (2004) Introns and splicing elements of five diverse fungi. *Eukaryot Cell* 3:1088–1100

Lamdan, N. L., Shalaby, S., Ziv, T., Kenerley, C. M., and Horwitz, B. A. (2015). Secretome of the biocontrol fungus *Trichoderma virens* co-cultured with maize roots: role in induced systemic resistance. *Mol. Cell Proteomics* 14, 1054–1063.

Landowski, C. P., Huuskonen, A., Wahl, R., Westerholm-Parvinen, A., Kanerva, A., Hänninen, A. L., Salovuori, N., Penttilä, M., Natunen, J., Ostermeier, C., Helk, B.,

- Saarinen, J., & Saloheimo, M. (2015). Enabling low cost biopharmaceuticals: A systematic approach to delete proteases from a well-known protein production host *Trichoderma reesei*. *PLoS One*, 10, e0134723. DOI: 10.1371/journal.pone.0134723.
- Lapin D., and Van den Ackerveken G. (2013). Susceptibility to plant disease: more than a failure of host immunity. *Trends Plant Sci.* 18: 546– 554.
- Li X, Lin C, Brian G. Forde and William J. Davies F. (2017) The Biphasic Root Growth Response to Abscisic Acid in Arabidopsis Involves Interaction with Ethylene and Auxin Signalling Pathways *Plant Sci* | <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01493>
- Li, C Dandan H (2017) Methods for genetic transformation of filamentous fungi. *Microbial cell factories*, 16, 1, 168
- Lobo Junior, M. Importância dos Patógenos de Solo na Cultura do Feijoeiro. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijao/arvore/CONT000gvwk5em102wx7ha0g934vg016m2r7.html>  
Acesso em 06/06/2018
- Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E., & Monte, E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: from proteomics to the field. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 395–417.
- Maag, D., Kandula D, Muller, C. *Trichoderma atroviride* LU132 promotes plant growth but not induced systemic resistance to *Plutella xylostella* in oilseed rape. *BioControl* 59, 241–252 (2014).
- Mahato S, Neupane S. (2017) Comparative study of impact of *Azotobacter* and *Trichoderma* with other fertilizers on maize. *Journal of Maize Research and Development* 3, 1 (2017) 22
- Mastouri F, Bjorkman T, Harman GE (2012) *Trichoderma harzianum* enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. *Mol Plant Microbe Interact* 25: 1264–1271.
- McIntyre M., Nielsen J., Arnau J., van der Brink H., Hansen K., Madrid S. (Eds.), (2004). Proceedings of the 7th European Conference on Fungal Genetics. Copenhagen, Denmark

- Meguro, A., and Sato, Y. (2014). Salicylic acid antagonizes abscisic acid inhibition of shoot growth and cell cycle progression in rice. *Sci. Rep.*4:4555
- Michielse, Caroline B. et al. (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current genetics*, 48, 1, 1-17.
- Mishra A. K., Muthamilarasan M., Khan Y., Parida S. K., Prasad M. (2013). Genome-wide investigation and expression analyses of WD40 protein family in the model plant foxtail millet (*Setaria italica* L.). *PLoS ONE* 9:e86852. 10.1371/journal.pone.0086852
- Monteiro, V. N., do Nascimento Silva, R., Steindorff, A. S., Costa, F. T., Noronha, E. F., Ricart, C. A. O., et al. (2010). New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. *Curr. Microbiol.* 61, 298–305
- Morán-Diez, E., Rubio, B., Domínguez, S., Hermosa, R., Monte, E., and Nicolás, C. (2012). Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* after 24h incubation with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *J. Plant Physiol.* 169, 614–620.
- Moran-Diez, M. E., Trushina, N., Lamdan, N. L., Rosenfelder, L., Mukherjee, P. K., Kenerley, C. M., et al. (2015). Host-specific transcriptomic pattern of *Trichoderma virens* during interaction with maize or tomato roots. *BMC Genomics* 16:8.
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., Charles, M. and Kenerley, C. M. (2013). *Trichoderma* Research in the Genome Era. *Ann. Rev. Phytopathol.* 51: 105–29.
- Muthamilarasan L C., M., Prasad M. (2015). Drought stress responses and signal transduction in plants, in *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants*, ed Pandey G. K., editor. (New York, NY: Springer;), 195–225
- Naumann T. A., Naldrett M. J., Ward T. J., Price N. P. J. (2015). Polyglycine hydrolases: fungal  $\beta$ -lactamase-like endoproteases that cleave polyglycine regions within plant class IV chitinases. *Protein Sci.* 24, 1147–1157.
- Naumann T. A., Wicklow D. T., Price N. P. J. (2011). Identification of a chitinase-modifying protein from *Fusarium verticillioides*. *J. Biol. Chem.*286, 35358–35366.
- Naumann T. A., Wicklow D. T., Price N. P. J. (2014). Polyglycine hydrolases secreted

by Pleosporineae fungi that target the linker region of plant class IV chitinases. *Biochem. J.* 460, 187–198.

NCBI, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/?term=trichoderma>> Acesso em: 28/05/2018.

Negi S, Ivanchenko MG, Muday GK (2008) Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 55:175–187.

Nieto-Jacobo, M. F., Steyaert, J. M., Salazar-Badillo, F. B., Nguyen, D. V., Rostas, M., Braithwaite, M., et al. (2017). Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in Plant Science*, 8, 102.

Nogueira-Lopez G, Greenwood DR, Middleditch M, Winefield C, Eaton C, Steyaert JM, Mendoza-Mendoza A (2018) The Apoplastic Secretome of *Trichoderma virens* during interaction with maize roots shows an inhibition of plant defence and scavenging oxidative stress secreted proteins. *Front Plant Sci* 9:409.

Olivieri F., Eugenia Zanetti M., Oliva C. R., Covarrubias A. A., Casalongué C. A. (2002). Characterization of an extracellular serine protease of *Fusarium eumartii* and its action on pathogenesis related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 63–72.

Overmyer K, Tuominen H, Kettunen R, Betz C, Langebartels C, Sandermann H Jr., Kangasjärvi J (2000) Ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell* 12: 1849–1862

Palmieri, MC., Perazzolli, M., Matafora, V., Moretto, M., Bachi, A., and Pertot, I. (2012). Proteomic analysis of grapevine resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 reveals specific defence pathways activated against downy mildew. *J. Exp. Bot.* 63, 6237–6251

Pangesti N, Pineda A, Pieterse CMJ, Dicke M, Van Loon JJA.(2003) Two-way plant mediated interactions between root-associated microbes and insects: from ecology to mechanisms. *Front Plant Sci.* 4:414.

Perazzolli M., Moretto M., Fontana P., Ferrarini A., Velasco R., Moser C. (2012). Downy mildew resistance induced by *Trichoderma harzianum*T39 in susceptible grapevines partially mimics transcriptional changes of resistant genotypes. *BMC Genomics* 13, 660–678.

Pereira, J. L. et al. (2014). Analysis of *Phaseolus vulgaris* response to its association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the presence or absence of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. *PLoS One* 9, 1–23

Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28: 489–521.

Pieterse, CM. J., Zamioudis, C., Berendsen, RL., Weller, DM., Van Wees, SCM., Bakker, PAH. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347-375

Plummer KM., Clark SJ., Ellis LM., Loganathan A., Al-Samarrai T. H., Rikkerink E. H. A., et al. (2004). Analysis of a secreted aspartic peptidase disruption mutant of *Glomerella cingulata*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 265–274.

Pogorelko GV, Fursova OV, Ogarkova OA, Tarasov VA. (2008) A new technique for activation tagging in *Arabidopsis*., *Gene* , 414, 67-75

Pozo JM, Baek J-M, Garcia JM, Kenerley CM. (2004). Functional analysis of *tvsp1*, a serine protease encoding gene in the biocontrol agent *Trichoderma virens*. *Fungal Genetics Biology* 41:336/348.

Raeder, U.; Broda, P. 1985 Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1, 1, 17-20,.

Rao G.S., Reddy N.N.R., Surekha C. (2015): Induction of plant systemic resistance in Legumes *Cajanus cajan*, *Vigna radiata*, *Vigna mungo* against plant pathogens *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata* – a *Trichoderma viride* mediated reprogramming of plant defense mechanism. *International Journal of Science and Research*, 6: 4270–4280

Rawlings, Neil D; Barrett Alan J; Bateman Alex (2012). "MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors". *Nucleic Acids Res. England*. (Database issue): D343–50.

- Reese MG, Hartzell G, Harris NL, Ohler U, Abril JF, Lewis SE. (2000) Genome annotation assessment in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.*;10:483–50
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Lombardi, N., Woo, S. L., Vinale, F., and Marra, R. (2015). Multiple roles and effects of a novel *Trichoderma hydrophobin*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 28, 167–179
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turrà, D., Woo, S. L., et al. (2009). Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 291–301
- Sambrook, J., Frisch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Samolski, I (2012) The *qid74* gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. *Microbiology*, 158, 1, 129-138.
- Samolski, I., de Luis, A., Vizcaino, J. A., Monte, E., and Suarez, M. B. (2009). Gene expression analysis of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in the presence of tomato plants, chitin, or glucose using a high-density oligonucleotide microarray. *BMC Microbiol.* 9:217
- Samuels G.J. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*. 2006;96:195–206.
- Saravanakumar, K., Fan, L., Fu, K., Yu, C., Wang, M., Xia, H., Sun, J., Li, Y., Chen, J.,(2016). Cellulase from *Trichoderma harzianum* interacts with roots and triggers induced systemic resistance to foliar disease in maize. *Sci. Rep.* 6, 35543.
- Savci, S. (2012), an Agricultural Pollutant: Chemical Fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development*, 3,. 1
- Schauer, N. and Fernie, A.R. (2006) Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. *Trends Plant Sci.*11, 508–516.
- Schuster, A. and Schmoll, M. (2010) Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 787-799.

Segarra G., Casanova E., Bellido D., Odena M. A., Oliveira E., Trillas I. (2007). Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics* 7, 3943–3952.

Sharma, V., Salwan, R., Sharma, P. N., & Gulati, A. (2017). Integrated transcriptome and proteome: approach for accurate portraying of widespread multifunctional aspects of *Trichoderma*. *Frontiers in Microbiology* 1–13.

Shoresh M., Harman G. E., Matsoury F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Ann. Rev. Phytopathol.* 48, 21–43. Shoresh, M., & Harman, G. E. (2008). The molecular basis of maize responses to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation: a proteomic approach. *Plant Physiology*, 147, 2147–2163.

Silva, F. L. Análise de secretoma de interação entre *Trichoderma* spp. e *Phaseolus vulgaris*. Dissertação de mestrado, Programa de pós-graduação em Microbiologia, Universidade de Brasília, 2014.

Song S, Huang H, Gao H, Wang J, Wu D, Liu X, Yang S, Zhai Q, Li C, Qi T (2014). Interaction between MYC2 and ETHYLENE INSENSITIVE3 modulates antagonism between jasmonate and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26: 263–279.

Spoel SH and Loake GJ (2011) Redox-based protein modifications: the missing link in plant immune signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 358-364.

Spoel SH Dong X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology* 12, 89–100.

Steindorff A, Ramada MH, Coelho AS, Miller RN, Pappas G, Ulhoa CJ, Noronha EF (2014) Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. *BMC genomics*, 15. 1, 204

Stocco, M. C., Monaco, C. I., Abramoff, C., Lampugnani, G., Salerno, G., Kripelz, N., Cordo, C. A. and Consolo, V. F. (2016). Selection and characterization of Argentine isolates of *Trichoderma harzianum* for effective biocontrol of *Septoria* leaf blotch of wheat. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32: 49.

Stotz H U. Mitrousis G K. de Wit P J.G.M. Fitt B D.L. (2014) Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.04.009>

- Sullivan TD, Rooney RJ, Klein BS.(2002) *Agrobacterium tumefaciens* integrates transfer DNA into single chromosomal sites of dimorphic fungi and yields homokaryotic progeny from multinucleate yeast. *Eukaryot Cell* 1:895–905
- Szekeres, A., L. Kredics, Z. Antal, F. Kevei and L. Manczinger. (2004). Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters* 233: 215–222
- Tallapragada, P. and Gudini, M. (2011) Phosphate solubility and biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Turkish Journal of Biology* 35,593–600.
- Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K (2002) Plant defensins. *Planta* 216: 193–202
- Tor, M., Lotze, M. T., and Holton, N. (2009). Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. *J. Exp. Bot.*60, 3645–3654.
- Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J., and Katagiri, F. (2010). Network properties of robust immunity in plants. *PloS Genet.* doi: 10.1371/journal.pgen.1000772.
- Tucci M., Ruocco M., De Masi L., De Palma M., Lorito M. (2010). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Mol. Plant Pathol.* 12, 341–354.
- Twizeyimana, M., Ojiambo, P., Ikotun, T., Paul, C., Hartman, G. and Bandyopadhyay, R. (2007). Comparison of field, greenhouse, and detached-leaf evaluations of soybean germplasm for resistance to *Phakopsora pachyrhizi*. *Plant Disease* 91,9 1161-1169
- Uhlíková H, Obořil M, Klemková J, Šedo O, Zdráhal Z, Kašparovský T, Skládal P, Lochman J . (2016). Elicitin-induced distal systemic resistance in plants is mediated through the protein-protein interactions influenced by selected lysine residues. *Frontiers in Plant Science* 7, 59.
- van der Hoorn R. A. L. (2008). Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 191–223.
- Vargas, W. A., Mandawe, J. C., and Kenerley, C. M. (2009). Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiol.* 151, 792–808.

- Vargas, Walter & Kenerley, C.M.. (2012). Carbohydrate uptake and catabolism in fungi. importance of sugar trafficking during plant-host interactions. *Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease*. 21-39.
- Viterbo, A., Harel, M., and Chet, I. (2004). Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, 151–158.
- Walters DR, Ratsep J, Havis ND. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *J. Exp. Bot.*64:1263–80
- Wang P., Niu G.-Y., Fang Y.-H., Wu R.-J., Yu J.-J., Yuan G.-F., Pozdniakov S.P., and Scott R.L. (2018) Implementing dynamic root optimization in Noah-MP for simulating phreatophytic root water uptake *Water Resources Research* 54(3): 1560–1575
- Weindling R (1932) *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* 22 837–845
- Yedidia I, Benhamou N, Kapulnik Y, Chet I (2000) Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiol Biochem* 38 863–873
- Yedidia I, Shores M, Kerem Z, Benhamou N, Kapulnik Y, Chet I (2003) Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Appl Environ Microbiol* 69 7343–7353
- Yedidia I, Srivastva AK, Kapulnik Y, Chet I (2001) Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil* 235 235–242
- Zeilinger, S., Gupta, V. K., Dahms, T. E. S., Silva, R. N., Singh, H. B., Upadhyay, R. S., et al. (2016). Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 182–207
- Zipfel, C. (2014) Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol.* 35, 345–351, doi: 10.1016/j.it.2014.05.004

Zhang, S., Gan, Y., & Xu, B. (2016). Application of Plant-Growth-Promoting Fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 Enhances Tolerance of Wheat to Salt Stress through Improvement of Antioxidative Defense System and Gene Expression. *Frontiers in plant science*, 7, 1405

# DADOS SUPLEMENTARES

Figura 1S. Espelho da pesquisa do resultado do sequenciamento da região adjacente à inserção do T-DNA em genoma dos transformantes, em banco de dados NCBI BLASTx.

## T136 NCBI BLASTx

The screenshot shows the NCBI BLASTx search interface. The query sequence is: GAATTCGCTTGCACGAAGGCGTCAAGCAGATACGCTTTTCGACAGCGTCGGATTTGCGATCGAGGATTTTCGGGCGTGGCGTACGTCGGCAGCGGTTGAGGGATCAAGCCACAGCAGCCACTGACCTTCTAGCCGACCCAGACGAGCCAAAGGGATCTTTTGGAAATGCTGCTCCGTCGTCAGGCTTTCGACGTTTGGGTGGTGAACAGAAGTCATTATCGACAGGAATGCCAAGCAGCTCCCGAGGGGAGCCCTGTGGTTGGGATGCACATACAAATGGACGAGCGATTAAGCCCTTTTCAGCGCCCTTTAAATATCGGATTTCTAATAAAGCGCTTTTCTCTAGGTTTACCGCCA. The search set is configured for 'Non-redundant protein sequences (nr)' in the 'Tricoderma sp. (taxid:1715253)' organism. The job title is 'AD11\_Par\_T136\_2a\_Ea\_M13F Length=1161 (855)'. The search results show 'No significant similarity found. For reasons why, click here'.



## T49 NCBI BLASTx

The screenshot shows the NCBI BLASTx interface. The search query is AD5\_Par\_T49\_3a\_Ea\_M13F. The results indicate that no significant similarity was found. The interface includes navigation links, search options, and a footer with NCBI contact information and logos.

**BLAST Results**

Your search is limited to records that include: *Trichoderma sp. (taxid:1715253)* » Full Entrez Query

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#) [YouTube](#) [How to read this page](#) [Blast report description](#)

Job title: AD5\_Par\_T49\_3a\_Ea\_M13F

RID: WWWZPPU2015 (Expires on 10-24 08:48 am)

Query ID	Ic Query_345866	Database Name	nr
Description	AD5_Par_T49_3a_Ea_M13F	Description	All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects
Molecule type	nucleic acid	Program	BLASTX 2.8.1+ » Citation
Query Length	906		

No significant similarity found. For reasons why, click here

Other reports: [Search Summary](#)

BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine

Support center Mailing list

NCBI National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine  
8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA

Policies and Guidelines | Contact

Questions/comments

## T49 NCBI BLASTn

The screenshot shows the NCBI BLASTn interface. The search query is AD5\_Par\_T49\_3a\_Ea\_M13F. The results indicate that no significant similarity was found. The interface includes navigation links, search options, and a footer with NCBI contact information and logos.

**BLAST Results**

Your search is limited to records that include: *Trichoderma sp. CDR2P2F1 (taxid:5507)* » Full Entrez Query

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#) [YouTube](#) [How to read this page](#) [Blast report description](#)

Job title: AD5\_Par\_T49\_3a\_Ea\_M13F Sample\_Name=AD5\_Par\_T49\_3a\_Ea\_M13F...

RID: WWWRYW22015 (Expires on 10-24 09:18 am)

Query ID	Ic Query_72059	Database Name	nr
Description	AD5_Par_T49_3a_Ea_M13F Sample_Name=AD5_Par_T49_3a_Ea_M13F	Description	Nucleotide collection (nt)
Molecule type	nucleic acid	Program	BLASTN 2.8.1+ » Citation
Query Length	912		

No significant similarity found. For reasons why, click here

Other reports: [Search Summary](#)

BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine

Support center Mailing list

NCBI National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine  
8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA

Policies and Guidelines | Contact

Questions/comments

Figura 2S. Busca no banco de dados NCBI BLASTx e BLASTn para T49

# T136 JGIMycoCosm

The screenshot shows the JGIMycoCosm BLAST search interface. The top navigation bar includes 'SEARCH', 'BLAST', 'BROWSE', 'GO', 'KEGG', 'KOG', 'CLUSTERS', 'SM CLUSTERS', 'CAZY', 'MEROPS', 'SYNTENY', 'DOWNLOAD', 'INFO', 'HOME', and 'HELP!'. The main content area is titled 'Trichoderma harzianum TR274 v1.0' and contains the following sections:

- Query Sequences:** A text area containing a FASTA format query sequence starting with '>AD11\_Par\_T136\_3a\_Ea\_M13F Chromat...'. Below the text is an 'Add...' button.
- Run blasts:** A section for configuring the search parameters.
- Search Criteria:**
  - Alignment program:** Set to 'blastn: blast nucleotide vs. translated nucleotide'.
  - Databases:** A dropdown menu showing 'Trichoderma\_harzianum 20141017 masked assembly', 'Trichoderma\_harzianum 20141017 assembly', 'Trichoderma\_harzianum 20141017 filtered model transcripts', 'Trichoderma\_harzianum 20141017 EST clusters', and 'Trichoderma\_harzianum 20141017 ESTs (est)'.
  - Program Settings:** Includes 'BLAST' options, 'Expect' (1.0E-5), 'Word size' (3), 'Filter low complexity regions' (checked), and 'Perform gapped alignment' (BLOSUM62).

The bottom screenshot shows the results page for the same search. It features a 'Jobs Status' table with one job listed as 'Complete'.

Organism	Database used	Job id	Status	Created	Scheduled	Started	Finished	Hits	Raw Output	Messages
Trichoderma harzianum TR274 v1.0	Trihar1_AssemblyScaffolds	16811414	Complete	2018-10-22 05:01:06	1s	1s	1s	0	<a href="#">Download</a>	

Additional information at the bottom of the results page includes 'Contact Us', 'Cite Us', 'Accessibility/Section 508', 'Disclaimer', and 'Credits'. The footer contains copyright information: '© 1997-2018 The Regents of the University of California. MycoCosm Portal version: 8.15.62 content: 1667133 clustering: b94fba synteny: no synteny'.

Figura 3S. Busca no banco de dados JGIMycoCosm para T136

# T49 JGIMycoCosm

The screenshot displays the JGI MycoCosm BLAST search interface. The search criteria section shows the following configuration:

- Alignment program: tblastx: blast nucleotide vs. translated nucleotide
- Databases: Trichoderma\_harzianum 20141017 masked assembly, Trichoderma\_harzianum 20141017 assembly, Trichoderma\_harzianum 20141017 filtered model transcripts, Trichoderma\_harzianum 20141017 EST clusters, Trichoderma\_harzianum 20141017 ESTs (est)
- Program Settings: Expect 1.0E-5, Word size 3, Filter low complexity regions (checked), Perform gapped alignment (BLOSUM62)

The results table shows the following data:

Job Name	Database used	Job ID	Status	Created	Scheduled	Started	Finished	Hits	Raw-Output	Message
Trichoderma harzianum TR274 v1.0	Trihar1_AssemblyScaffolds_Repeatmasked	16811446	Complete	2018-10-22 06:03:09	2s	2s	3s	0	<a href="#">Download</a>	
Trichoderma harzianum TR274 v1.0	Trihar1_AssemblyScaffolds	16811447	Complete	2018-10-22 06:03:10	1s	1s	2s	0	<a href="#">Download</a>	

Figura 4S. Busca no banco de dados JGIMycoCosm para T49

a)

NNNNGGGCGATTGANTTAGCGGCCGCGAATTCGCCCTTATGCCAACTGAAGTTGCCTAGAATTTGAG  
GATACTGACTTTTCGAGGCGTCGCATTCGCAGGTATGATGTTTCAACTCCCACTAATCACCGCAACTCTA  
CCCTTAGAACGAATGGACGATCCAACAACAAGGATAATTGGCAATTCTGTATTCTGGGTGACTTTCTGT  
CTGGTTGGCCAGCCACTAGGCGCATTGCTGTACTTTTTTGCCTGGCAGGCAAATACGGTAGTGTTAGC  
AAGTTGGCAGCTAGTCCATGACCATGGTTGCATGCCGTTGAAACGAGACCAGTCAGATGAAAGCTGTC  
GGCAACGTGAAATATAATGACTAGAATGTTTCGCTCGAATAAATTTTCCATTTAATAGAGTGTCCGGGCTG  
GAGTCTGGCCGAGATACGATTAGGCCACCTATCATTAGTTTCGGGTCTCTCCGACAGCCGACCCCG  
GCCATAGTACAGCTATAAGGGTACCCGCTGACATCATCCATGTATTTTATTTTCTGAGCTTCAACA  
ATACAGCTACTTCACACTTTACTCCATTGCAACACATACCAACTCAATCAATTCACCATGGTTTCAATC  
ACCGTTCCCGAGAACTATGGGTACGTATTCTCTCTTATCTATGAGCGTTCTACGTCTTCAGCACGTTT  
ACCGATTCAATCGATTAATCACTAACATGATAATCTACAGCACCGTCATCGCTGTCGCCCTCGGCGGAAT  
CCCTCTACTCTCATGGATCCAGGGCATTGTCGTGACTAGTCTACGCAAACCTGCCAAAGTGCATTATCCG  
CAACTATGCGACGGCCGAACAATGCAAGGAGAACGTACGTCCCTCCATCCCTTTCCAAATGAAGC  
TCGGAGTGTAGTAGTGTACTGACGAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTGA  
GGGTTAATTCTGANCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGNGAAATTGTTATCCGCTCNCA  
ATTCCNNNNAACATACGAGCCGGAAGCCTAAAGTGTAAGCCTGGGGNNNCCTAAGGAGGNAGCCA  
ACCCCNNTAATTG

b)

NNNNNNNNNNNNGGGCGATTGATTTAGCGGCCGCGAATTCGCCCTTGCACGAAAGGCGTCAAGCAG  
ATCACGCTTTTCGACAGCGTCGGATTTGCGATCGAGGATTTTTCGGCGCTGCGCTACGTCCGCGACCCG  
GTTGAGGGATCAAGCCACAGCAGCCACTCGACCTTAGCCGACCCAGACGAGCCAAGGGATCTTTTT  
GGAATGCTGCTCCGTCGTCAGGCTTTCCGACGTTTGGGTGTTGAACAGAAGTCATTATCGCACGGAAT  
GCCAAGCACTCCCAGGGGAACCCTGTGGTTGGCATGCACATACAAATGGACGAACGGATAAACCTTT  
TCACGCCCTTTTAAATATCCGATTATTCTAATAAACGCTCTTTTCTTTAGGTTTACCCGCCAATATATCCT  
GTCAAACACTGATAGTTTAACTGAAGGCGGGAAACGACAATCTGATCATGAGCGGAGAATTAAGGG  
AGTCACGTTATGACCCCCCGGATGACGCGGACAAGCCGTTTTACGTTTGGAACTGACAGAACC  
ACGTTGAAGGAGCCACTCAGCCGCGGTGGCGGCCGCTACAACCCACCCGCGTTGGCAGGAAAAAAGG  
CAGCAAGACTTCACCTTTCGATGGAGGAACCTTGTGTGATGGGTAGGCATAATCTATTTATAGACGTC  
ATAAGGACATATTGTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAACCTAATAACACATTGCGGACGTTTTTA  
ATGTAAGTGAATTGCGCCGCCAGGCGCCAGAAAGCTTTGGCGTGGGCCATTGTGCATGGTGGCAGTGG  
TGTCGGACATTGTTGATGTCGACCAGGGGGGTAGCTGCGAGCTGATGTAACGAGGAAGGGCGAATT  
CGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTGAAGGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAG  
AAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCCAG  
TCGGNNACCTGTCGTGCCAGCNGCNNTATGAATCGGCCANNNNCGGGNNNAGGNGNTTGCNTTGG

**Figura 5S. resultado do sequenciamento para a) T49; b) T136. As áreas em vermelho são os sítios de restrição *EcoR1*. A seqüência em marrom é a região de anelamento do sítio M13.**

A

**One Way Analysis of Variance**

terça-feira, outubro 23, 2018, 11:37:17

Data source: Data 1 in Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	15	0	19.600	2.627	0.678
Row 2	15	0	16.780	2.875	0.742
Row 3	15	0	16.587	2.944	0.760
Row 4	15	0	17.907	2.213	0.572

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	3	86.059	28.686	3.993	0.012
Residual	56	402.291	7.184		
Total	59	488.350			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.012).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.676

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Row 1 vs. Row 3	3.013	4	4.354	0.017	Yes
Row 1 vs. Row 2	2.820	4	4.075	0.028	Yes
Row 1 vs. Row 4	1.693	4	2.447	0.318	No
Row 4 vs. Row 3	1.320	4	1.907	0.536	No
Row 4 vs. Row 2	1.127	4	1.628	0.660	Do Not Test
Row 2 vs. Row 3	0.193	4	0.279	0.997	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

B

**One Way Analysis of Variance**

terça-feira, outubro 23, 2018, 10:58:19

Data source: Data 1 in Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	15	0	1.307	0.317	0.0819
Row 2	15	0	1.167	0.417	0.108
Row 3	15	0	1.077	0.321	0.0829
Row 4	15	0	0.907	0.259	0.0670

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	3	1.264	0.421	3.787	0.015
Residual	56	6.232	0.111		
Total	59	7.496			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = 0.015$ ).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.639

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Row 1 vs. Row 4	0.400	4	4.644	0.009	Yes
Row 1 vs. Row 3	0.230	4	2.670	0.245	No
Row 1 vs. Row 2	0.140	4	1.625	0.661	Do Not Test
Row 2 vs. Row 4	0.260	4	3.019	0.155	No
Row 2 vs. Row 3	0.0900	4	1.045	0.881	Do Not Test
Row 3 vs. Row 4	0.170	4	1.974	0.507	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

C

**One Way Analysis of Variance**

terça-feira, outubro 23, 2018, 11:50:31

Data source: Data 1 in Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	15	0	0.0270	0.00753	0.00195
Row 2	15	0	0.0212	0.00727	0.00188
Row 3	15	0	0.0204	0.00689	0.00178
Row 4	15	0	0.0157	0.00473	0.00122

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	3	0.000961	0.000320	7.137	<0.001
Residual	56	0.00251	0.0000449		
Total	59	0.00348			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.959

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
Row 1 vs. Row 4	0.0113	4	6.512	<0.001	Yes
Row 1 vs. Row 3	0.00658	4	3.805	0.045	Yes
Row 1 vs. Row 2	0.00580	4	3.352	0.095	No
Row 2 vs. Row 4	0.00547	4	3.160	0.127	No
Row 2 vs. Row 3	0.000783	4	0.453	0.989	Do Not Test
Row 3 vs. Row 4	0.00468	4	2.707	0.234	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

D

**One Way Analysis of Variance**

sábado, dezembro 15, 2018, 16:51:30

Data source: Data 1 in medicao ciclo 2final.xlsx

Normality Test (Shapiro-Wilk): Passed (P = 0.085)

Equal Variance Test (Brown-Forsythe): Passed (P = 0.167)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 1	15	0	19.300	2.299	0.594
Col 2	15	0	18.307	2.163	0.558
Col 3	15	0	19.700	1.931	0.499
Col 4	15	0	19.247	1.456	0.376

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	15.989	3.997	0.947	0.442
Residual	70	295.407	4.220		
Total	74	311.395			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.442).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.050

The power of the performed test (0.050) is below the desired power of 0.800. Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

E

**One Way Analysis of Variance**

terça-feira, outubro 23, 2018, 11:46:10

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.713)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.637)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1	15	0	44.885	7.120	1.838
Col 2	15	0	38.771	10.088	2.605
Col 3	15	0	40.161	9.700	2.505
Col 4	15	0	35.886	8.649	2.233

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	3	634.607	211.536	2.633	0.059
Residual	56	4498.861	80.337		
Total	59	5133.467			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.059).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.396

The power of the performed test (0.396) is below the desired power of 0.800. Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

**Figuras 6S A,B, C, D, E. Espelho do tratamento estatístico para A, comprimento; B, peso seco, C, volume radiculares; D, pare aérea e E, área foliar.**

**Tabelas com os valores de Tuckey para análise de variância (ANOVA) significativa: volume, peso seco e comprimento radiculares.**

**Tabela 1S –volume radicular**

Volume de raiz	TR274 x planta	TR274 x T49	TR274 x 136	49 x 136	T49 x planta	T136 x planta
Valor de t	0,999	-1,792	-3,494	1,464	-0,592	-1,979
Valor de p	0,163	0,426	0,02174	0,777	0,279	0,028

**Tabela 2S – peso seco das raízes**

Peso de raiz	TR274 x planta	TR274 x T49	TR274 x 136	49 x 136	T49 x planta	T136 x planta
--------------	----------------	-------------	-------------	----------	--------------	---------------

Valor de t	2,348	-2,308	-4.864	2,186	-0,276	2,363
Valor de p	0,133	0,149	0,00022	0,0195	0,392	0,126

**Tabela 3S – comprimento radicular**

Compr. de raiz	TR274 x planta	TR274 x T49	TR274 x 136	49 x 136	T49 x planta	T136 x planta
Valor de t	2,804	2,768	1,909	-1,224	-0,079	-1,202
Valor de p	0,00453	0,0050	0,033	0,1158	0,468	0,119

Parâmetros que não apresentaram variância estatística

A ANOVA da parte aérea não foi significativa para  $p < 0,05$ , valor de f-ratio = 1,321; valor de p = 0,276,.

A ANOVA da área foliar , não foi significativa para  $p < 0,05$ , valor de f-ratio = 1,558; valor de p = 0,656.

**Tabela 4S. Valores obtidos no ensaio de atividade proteolítica com azocaseína em U/ml, a) pH 8,0; b) pH 4,0**

<b>a) Ensaio pH 8.0</b>												
<b>COM CASEÍNA</b>		<b>Média</b>				<b>desvpad</b>		<b>SEM CASEÍNA</b>		<b>Média</b>		<b>desvpad</b>
<b>T11</b>	0.112	0.137	0.127	0.126	0.010	0.149	0.148	0.138	0.145	0.005		
<b>T25</b>	0.124	0.117	0.116	0.119	0.004	0.151	0.155	0.144	0.150	0.005		
<b>T26</b>	0.120	0.115	0.123	0.119	0.003	0.146	0.139	0.152	0.146	0.005		
<b>T40</b>	0.119	0.129	0.114	0.121	0.006	0.131	0.147	0.127	0.135	0.009		
<b>T49</b>	0.129	0.136	0.168	0.144	0.017	0.192	0.188	0.192	0.191	0.002		
<b>T50</b>	0.132	0.126	0.114	0.124	0.008	0.138	0.127	0.128	0.131	0.005		
<b>T112</b>	0.106	0.137	0.106	0.116	0.015	0.111	0.106	0.110	0.109	0.002		
<b>T113</b>	0.111	0.116	0.119	0.115	0.004	0.146	0.139	0.135	0.140	0.005		
<b>T135</b>	0.173	0.133		0.153	0.020	0.123	0.128	0.131	0.127	0.003		
<b>T136</b>	0.115	0.121	0.109	0.115	0.005	0.121	0.125	0.116	0.120	0.004		
<b>R274</b>	0.206	0.186	0.188	0.193	0.009	0.439	0.443	0.443	0.441	0.002		
<b>b) Ensaio pH 4.0</b>												
<b>COM CASEÍNA</b>		<b>Média</b>				<b>desvpad</b>		<b>SEM CASEÍNA</b>		<b>Média</b>		<b>desvpad</b>
<b>T11</b>	0.219	0.212	0.213	0.215	0.003	0.028	0.062	0.026	0.039	0.017		
<b>T25</b>	0.246	0.243	0.181	0.224	0.030	0.030	0.022	0.018	0.023	0.005		
<b>T26</b>	0.206	0.203	0.209	0.206	0.003	0.042	0.037	0.034	0.038	0.004		
<b>T40</b>	0.233	0.229	0.224	0.229	0.004	0.036	0.020	0.018	0.025	0.008		
<b>T49</b>	0.263	0.205	0.209	0.226	0.026	0.031	0.021	0.005	0.019	0.011		
<b>T50</b>	0.220	0.210	0.204	0.211	0.007	0.004	0.004	0.003	0.003	0.001		
<b>T112</b>	0.195	0.203	0.186	0.195	0.007	-0.005	0.003	-0.006	-0.003	0.004		
<b>T113</b>	0.224	0.214	0.206	0.214	0.007	0.029	0.021	0.025	0.025	0.003		
<b>T135</b>	0.212	0.231	0.202	0.215	0.012	0.027	0.024	0.018	0.023	0.004		
<b>T136</b>	0.208	0.208	0.227	0.214	0.009	0.012	0.010	0.027	0.016	0.007		
<b>R274</b>	0.235	0.262	0.278	0.259	0.018	0.091	0.081	0.084	0.085	0.004		

**Tabela 5S. Valores obtidos no ensaio de atividade proteolítica com azocaseína normalizados pela massa seca do micélio, em U/ml/g, a) pH 8,0; b) pH 4,0 para os transformantes previamente triados em placa de BDA-agar com caseína.**

a)	pH 8,0 U/ml/g			
	COM CASEÍNA	desvpad	SEM CASEÍNA	desvpad
T11	0.763	0.01015	0.281	0.00485
T25	1.551	0.00360	0.314	0.00464
T26	1.738	0.00339	-0.34	0.00517
T40	0.888	0.00625	0.435	0.00863
T49	2.623	0.01721	-0.093	0.00166
T50	1.481	0.00752	0.165	0.00514
T112	0.678	0.01473	-0.057	0.00245
T113	0.582	0.00362	0.196	0.00455
T135	1.742	0.02015	-0.197	0.00327
T136	0.605	0.00507	0.171	0.00364
TR274	13.436	0.00890	-0.044	0.00188
b)	pH 4,0 U/ml/g			
	COM CASEÍNA	desvpad	SEM CASEÍNA	desvpad
T11	4.609	0.00330	3.597	0.01659
T25	4.236	0.02983	3.195	0.00480
T26	4.559	0.00271	4.863	0.00357
T40	5.123	0.00367	3.293	0.00837
T49	6.331	0.02633	3.277	0.01087
T50	4.385	0.00657	0.918	0.00052
T112	3.233	0.00689	0.309	0.00419
T113	4.439	0.00718	2.154	0.00333
T135	3.183	0.01217	2.762	0.00364
T136	2.583	0.00892	1.275	0.00737
TR274	21.273	0.01768	7.154	0.00421

**Tabela 6S. Ciclagem da reação TAIL-PCR primária (Liu e Whittier, 1995).**

Número de ciclos	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
1	Desnaturação inicial	92	2 min
		95	1 min
5	Desnaturação	94	30 s
	Anelamento	66	1 min
	Elongação	72	2 min
1	Desnaturação	94	30 s
	Anelamento	35	3 min
	Elongação	72	3 min
	Elongação	72	2 min
10	Desnaturação	94	5 s
	Anelamento	48	1 min
	Elongação	72	2 min
15	Desnaturação	94	5 s
	Anelamento	66	1 min
	Elongação	72	2 min
15	Desnaturação	94	5 s
	Anelamento	48	1 min
	Elongação	72	2 min
1	Elongação final	72	5 min

**Tabela S7 . Ciclagem da reação TAIL-PCR secundária (Liu e Whittier, 1995).**

Etapa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação		94	5 s
Anelamento	15	63	1 min
Elongação		72	2 min
Desnaturação		94	5 s
Anelamento	15	63	1 min
Elongação		72	2 min
			5 min
Desnaturação		94	10 s
Anelamento	15	44	1 min
Elongação		72	2 min
Elongação final	1	72	5 min

**Tabela S8. Ciclagem da reação TAIL-PCR terciária (Liu e Whittier, 1995).**

Etapa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação inicial	1	94	10 s
Desnaturação		94	15 s
Anelamento	20	48	15 s
Elongação		72	2 min
Elongação final	1	72	5 min