

Universidade de Brasília

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana

Análise da expressão gênica global de *Trichoderma asperellum* TR356 em interação com o feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris*)

Thiago Fernandes Qualhato

Orientadora:

Dra. Eliane Ferreira Noronha

Brasília, Dezembro de 2018



Universidade de Brasília

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana

Análise da expressão gênica global de *Trichoderma asperellum* TR356 em interação com o feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris*)

Thiago Fernandes Qualhato

Tese apresentada à Universidade de Brasília, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, para obtenção do Título de Doutor

Orientadora:

Dra. Eliane Ferreira Noronha

Brasília, Dezembro de 2018

Trabalho realizado no laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular do
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília

Orientadora:

Profª. Dra. Eliane Ferreira Noronha

Banca Examinadora:

Dr. Fausto Bruno dos Reis Almeida (FMRP – USP) - Examinador Externo

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa (UFG) - Examinador Externo

Profª. Dra. Rita de Cássia Pereira Carvalho (UnB) - Examinador Interno

Profª. Dra. Eliane Ferreira Noronha (UnB) – Orientadora

Membro Suplente: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho (UnB)

À minha mãe Aparecida Fernandes de Souza Qualhato, pelo sacrifício, abdicação, amor incondicional, incentivo e pelo exemplo de ser humano. Você sempre foi e será a minha fonte de inspiração;

Ao meu pai José Qualhato da Silva, por mostrar-me o caminho da bondade, honestidade, lealdade, cumplicidade e simplicidade. Você é a minha grande referência;

Às minhas irmãs Juliana e Julielly, pela amizade, cumplicidade e apoio.

Dedico

Agradecimentos

A Deus, por todas as bênçãos colocadas na minha vida e a minha família por ser meu bem mais precioso.

A professora Doutora Eliane Ferreira Noronha pela oportunidade de realização deste trabalho, orientação, paciência, compreensão, confiança e dedicação a pesquisa e a ciência. Meu muito obrigado !

A Universidade de Brasília, em especial ao Departamento de Biologia Microbiana, pela oportunidade de realização do curso e sua contribuição para o meu crescimento profissional.

A minha amiga Francilene Lopes, por toda ajuda nos experimentos iniciais de cultivo, pelas orientações, paciência e ajuda para que esse trabalho fosse realizado. Muito obrigado !

Ao doutor Andrei Steindorff, por toda ajuda ao decorrer de todo trabalho, principalmente nas análises dos dados iniciais de transcrito.

A minha amiga Mariane Brom Sobreiro, por toda ajuda no entendimento das análises de Bioinformática, pela paciência em me ensinar, pelo esforço, torcida e toda atenção que teve comigo. Meu muito obrigado !

Ao meu amigo Ricardo Diógenes por toda ajuda inicial com os dados gerais de transcrito. Muito obrigado!!

Ao Doutor Murillo Lobo Junior, pela doação das sementes de feijoeiro, e por disponibilizar a casa de vegetação da EMBRAPA Arroz e Feijão, GO. Sua ajuda foi fundamental!

Ao Professor Doutor Cirano José Ulhoa por todo apoio desde os tempos de mestrado.

Aos doutores Marcos Mota Costa - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN e Gabriel Sergio Costa Alves, pelas orientações iniciais desse trabalho.

Aos professores que participaram da defesa desta tese, pelas críticas construtivas e sugestões. Obrigado por fazerem parte desse momento tão importante.

Agradeço o IFGoiano, em especial o campus Ceres, pela bolsa PIQ de doutorado, fundamental para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Enzimologia da UnB.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos !!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	08
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
ORGANIZAÇÃO DA TESE	13
1. CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL	
1.1 INTRODUÇÃO	14
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO	
1.2.1 O gênero <i>Trichoderma</i> e interação com plantas hospedeiras.....	17
1.2.1.1 Proteínas efetoras	20
1.2.2 Feijoeiro-comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	23
1.3 OBJETIVOS	
1.3.1 Objetivo geral	25
1.3.2 Objetivos específicos	25
1.4 REFERÊNCIAS	26
2. CAPÍTULO II – ANÁLISE GLOBAL DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE <i>T. asperellum</i> TR356 EM INTERAÇÃO COM <i>P. vulgaris</i>	
2.1 METODOLOGIA	
2.1.1 Organismos utilizados	34
2.1.1.1 <i>Trichoderma asperellum</i> TR356	34
2.1.1.2 <i>Phaseolus vulgaris</i> L. – cultivar pérola	34
2.1.2 Obtenção dos conídios	35
2.1.3 Germinação das sementes de feijoeiro	35
2.1.4 Experimento de co-cultivo <i>T. asperellum</i> TR356/feijoeiro	36
2.1.5 Sequenciamento RNA-seq	37
2.1.6 Análise bioinformática	38
2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
2.2.1 Análise global da expressão gênica baseada em RNA-seq	40
2.2.2 Análise de genes envolvidos da degradação de carboidratos	47
2.2.3 Análise de genes associados com enzimas antioxidantes	53
2.2.4 Análise de genes de proteínas com domínio WSC.....	55
2.2.5 Análise de genes de <i>Heat shock protein</i> (HSP).....	56
2.2.6 Análise de categorização funcional e vias metabólicas	57
2.4 CONCLUSÃO	66
2.5 REFERÊNCIAS	68
3. CAPÍTULO III – IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS EFETORAS EM <i>T. asperellum</i> TR356	
3.1 METODOLOGIA	
3.1.1 Cultivo e manutenção dos isolados de <i>Trichoderma</i>	75
3.1.2 Germinação das sementes de feijoeiro	75
3.1.3 Predição de possíveis genes codificadores de efetores em <i>T. asperellum</i> TR356...	

.....	75
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.2.1 Proteínas secretadas de <i>Trichoderma asperellum</i> TR356 com capacidade efetora	76
3.2.2 Expressão dos genes selecionados durante a interação <i>T. asperellum</i> TR356/feijoeiro com capacidade efetora	87
3.4 CONCLUSÃO	94
3.5 REFERÊNCIAS	95
4. ANEXO	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Vista esquemática ilustrando os locais de ação dos efetores apoplásticos e citoplasmáticos. (Adaptado de Kamoun, 2006)21

Figura 02. Organização dos domínios de efetores apoplásticos e citoplasmáticos. (A) Desenho esquemático do efector apoplástico. (B) Desenho esquemático do efector citoplasmático com motivo conservado RxLR que estão relacionados a translocação destes efetores para o interior da célula (estes motivos estão ausentes em efetores apoplásticos). Em ambos os desenhos, os números sob as sequências indicam as posições dos aminoácidos. Todos os efetores, citoplasmáticos ou apoplásticos apresentam um peptídeo sinal na posição N-terminal da molécula, condição obrigatória para toda molécula efectora. As setas cinzentas distinguem as regiões efectoras das proteínas e as que estão envolvidas na secreção e direcionamento dos envolvidos na atividade efectora (Adaptado de Kamoun, 2006).....22

Figura 03. Sistema hidropônico utilizado para o co-cultivo de *T. asperellum* e *Phaseolus vulgaris*. Em A, plântulas formadas após 4 dias de germinação. Em B, estrutura utilizada no experimento de interação entre *Trichoderma*/planta.....37

Figura 04. Comparação dos perfis de expressão gênica completa de *T. asperellum* TR356 na interação com *P. vulgaris* em 48 horas de interação com 1.744 genes diferencialmente expressos e em 72 horas de interação com 5.073 genes diferencialmente expressos mostrados em vermelho ($P < 0.05$). Em cinza é possível observar os genes comuns aos dois períodos de análise.42

Figura 05. Diagrama de Venn dos 6.817 genes diferencialmente expressos. Nota-se que deste total 677 são GDE exclusivos do período de 48 horas, 4.006 são GDE exclusivos do período de 72 horas, e na interseção, 1067 genes comuns aos dois tempos de análise.....43

Figura 06. Quantidade de genes diferencialmente expressos categorizados como CAZymes, proteases, transportadores e pequenas proteínas secretadas e ricas em cisteínas (SSCPs). Os genes que foram induzidos estão representados nas barras positivas e os genes reprimidos estão representados nas barras negativas. As barras representam os períodos de análises: 48 e 72 horas.....45

Figura 07. Número de GDEs identificados como parte das famílias CAZymes durante a interação entre *T. asperellum* e *P. vulgaris* em 48 e 72 horas após a inoculação. Na figura é possível visualizar os genes que foram induzidos (*up-regulated*) na parte superior e os genes que foram reprimidos (*down-regulated*) na parte inferior da figura. As 5 famílias CAZymes representadas são: polissacarídeos liases (LPs); atividades auxiliares (AAs); carboidrato esterase (CEs); glicosil-transferases (GTs) e glicosil hidrolases (GHs).....48

Figura 08. Resultado da análise de categorização funcional dos genes encontradas no genoma de *T. asperellum* TR356 em 48 horas, que apresentaram similaridade significativa ($e\text{-value} < 10^{-5}$) com as sequências de proteínas depositadas nos bancos de dados (NCBI/UNIPROT), utilizando o *software* BLAST2GO. No eixo y estão os termos do GO e no eixo x estão os números de genes encontrados para cada termo de GO em cada categoria.....59

Figura 09. Resultado da análise de categorização funcional dos genes encontradas no genoma

de *T. asperellum* TR356 em 72 horas, que apresentaram similaridade significativa ($e\text{-value} < 10^{-5}$) com as sequências de proteínas depositadas nos bancos de dados (NCBI/UNIPROT), utilizando o *software* BLAST2GO. No eixo y estão os termos do GO e no eixo x estão os números de genes encontrados para cada termo de GO em cada categoria.
.....61

Figura 10. Resultado da análise de categorização funcional dos genes encontradas no genoma de *T. asperellum* TR356 em 48 e 72 horas, que apresentaram similaridade significativa ($e\text{-value} < 10^{-5}$) com as sequências de proteínas depositadas nos bancos de dados (NCBI/UNIPROT), utilizando o *software* BLAST2GO. No eixo y estão os termos do GO e no eixo x estão os números de genes encontrados para cada termo de GO em cada categoria.
.....63

Figura 11. Classificação por termos de GO dos genes identificados como possíveis efetores de *T. asperellum* TR356 durante a interação com as raízes do *Phaseolus vulgaris* em 48 horas (apenas algumas categorias foram selecionadas para a representação no gráfico).....81

Figura 12. Classificação por termos de GO dos genes identificados como possíveis efetores de *T. asperellum* TR356 durante a interação com as raízes do *Phaseolus vulgaris* em 48 horas (apenas algumas categorias foram selecionadas para a representação no gráfico).....82

Figura 13. Classificação por termos de GO dos genes identificados como possíveis efetores de *T. asperellum* TR356 durante a interação com as raízes do *Phaseolus vulgaris* em 48 horas (apenas algumas categorias foram selecionadas para a representação no gráfico).....83

Figura 14. Classificação por termos de GO dos genes identificados como possíveis efetores de *T. asperellum* TR356 durante a interação com as raízes do *Phaseolus vulgaris* em 72 horas (apenas algumas categorias foram selecionadas para a representação no gráfico).....84

Figura 15. Classificação por termos de GO dos genes identificados como possíveis efetores de *T. asperellum* TR356 durante a interação com as raízes do *Phaseolus vulgaris* em 72 horas (apenas algumas categorias foram selecionadas para a representação no gráfico).....85

Figura 16. Classificação por termos de GO dos genes identificados como possíveis efetores de *T. asperellum* TR356 durante a interação com as raízes do *Phaseolus vulgaris* em 72 horas (apenas algumas categorias foram selecionadas para a representação no gráfico).....86

Figura 17. Relação de genes induzidos candidatos a efetores identificados em *T. asperellum* TR356 durante interação com *Phaseolus vulgaris*. Em vermelho o gene identificado durante o tempo de 48 horas de interação e em verde os genes identificados no tempo de 72 horas de interação.....90

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Genes reprimidos (<i>down-regulated</i>) e induzidos (<i>up-regulated</i>) após 48 e 72 horas de interação. Na primeira parte da tabela é possível visualizar a quantidade de genes exclusivos de cada tempo, e na segunda parte todos os GDE reprimidos e induzidos.....	43
Tabela 02. Top 10 das famílias de Glicosil hidrolases que tiveram uma maior expressão conforme valores de $Log^2Fold\ Change$. Em negrito, observa-se as GHs que estão entre as mais expressas tanto em 48 quanto em 72 horas.....	50
Tabela 03. Expressão de GDE associados com proteínas antioxidantes induzidos durante a interação <i>T. asperellum</i> TR356/ <i>P. vulgaris</i>	54
Tabela 04. Expressão de GDE associados com proteínas que apresentam domínio WSC induzidos durante a interação <i>T. asperellum</i> TR356/ <i>P. vulgaris</i>	55
Tabela 05. Expressão de genes associados com <i>Heat Shock Proteins</i> (HSPs) durante a interação <i>T. asperellum</i> TR356/ <i>P. vulgaris</i>	57
Tabela 06. Rotas metabólicas, anotadas pelo KEGG, com maior número de sequências obtidas em 48 e 72 horas.....	65
Tabela 07. Genes de <i>T. asperellum</i> TR356 codificadores de efetores identificados em 48 e 72 horas.....	88

RESUMO

A interação entre fungos e plantas é um processo complexo que envolve diferentes mecanismos físicos, moleculares e uma grande diversidade de vias metabólicas. O fungo *Trichoderma asperellum* vem ganhando destaque pelo seu desempenho como promotor de crescimento de plantas, indução de resistência e controle biológico. Para melhor entender os mecanismos utilizados por *T. asperellum* na interação com a planta hospedeira, no presente trabalho foi analisada a modulação da expressão gênica do isolado TR356 usando a tecnologia de Illumina, explorando seu transcrito durante a interação direta com as raízes de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Foram gerados, utilizando-se a plataforma HiSeq 2000, um total de 39.205.000 fragmentos da sequência (*reads paired ends*) de 100 pb em 8 bibliotecas. A cobertura total dos *reads* no genoma do *T. asperellum* foi de 33x, e a cobertura em relação às regiões codantes do DNA (CDS) foi de aproximadamente 54x. A qualidade média das bibliotecas (%Q30) foi de 96%. Um total de 25.386 genes foi identificado nos dois tempos de análise (48 e 72 horas), destes, 6.817 genes foram identificados como diferencialmente expressos. Dos genes diferencialmente expressos, grande parte (74,5%) foi identificada no tempo de 72 horas, o que mostrou um aumento na modulação gênica neste período. Foi identificado um grande número de CAZymes no transcrito de *T. asperellum* categorizadas em diferentes famílias (229 genes e 51 famílias). Por meio da análise de categorização funcional, utilizando o Blast2GO, identificou-se genes categorizados em processos metabólicos (metabolismo secundário), regulação da transcrição e transporte. A análise das rotas metabólicas, utilizando o *software* Ipath3, destaca o aumento na expressão de genes de vias de degradação de carboidratos. Proteínas candidatas a efetores foram identificadas, utilizando os *softwares* SignalP, TMHMM e TargetP, como serino-proteases, cerato plataninas, tioredoxinas, metaloproteases, proteínas com domínio CFEM e LysM repeat. A análise geral do transcrito mostrou que a interação *T. asperellum* e *P. vulgaris* envolve a expressão de genes que codificam transportadores, moléculas envolvidas no metabolismo secundário e de enzimas envolvidas na degradação de carboidratos. Os resultados deste trabalho contribuíram para o mapeamento de genes candidatos com papel na complexa interação molecular entre *T. asperellum* e *Phaseolus vulgaris*.

ABSTRACT

The interaction between fungi and plants is a complex process involving different physical and molecular mechanisms and also a great diversity of metabolic pathways. The *Trichoderma asperellum* fungus has gained prominence for its performance as a promoter of plant growth, induction of resistance and biological control. For a better understanding of the mechanisms used by *T. asperellum* in the interaction with his host plant, it was analyzed in this study the gene modulation of the isolated TR356 using the Illumina technology, exploring its transcriptome during the direct interaction with the roots of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). They were generated, using the HiSeq 2000 platform in a total of 39205.000 fragments of the sequence of 100 pb in 8 libraries. The total coverage of the reads in the *T. asperellum* genome was 33x, and the coverage over the DNA coding regions (CDS) was approximately 54x. The average quality of the libraries (% Q30) was 96%. A total of 25,386 genes were identified in the two analysis times (48 and 72 hours) and among them 6,817 were identified as differentially expressed genes. Of the differentially expressed genes, a large part (74.5%) were identified at 72 hours, which showed an increase in gene modulation during this period. In order to avoid the generation of generic annotation data we used annotations already made for the genome of Proteases, Transporter, SSCPs and CAZymes. A detailed analysis of the CAZymes families showed the importance of these proteins in the interaction process. We identified a large number of CAZymes in *T. asperellum* with a high diversity of families (229 genes and 51 families). Through the functional categorization analysis, using Blast2GO, was identified fundamental terms for interaction as secondary metabolic processes, regulation of transcription and transport. The analysis of the metabolic routes using software Ipath3 confirmed the data already observed in this work, highlighting routes of carbohydrate degradation. Several effector candidate proteins were identified using SignalP, TMHMM and TargetP software, such as serine proteases, ceratoplatanins, thioredoxins, metalloproteases, CFEM Domain and LysM repeat protein and others. In this identification, proteins with known translocation motifs, such as the RxRL motif and were prioritized. These results suggest that groups of differentially expressed genes play an important role during the interaction process. The general analysis of the transcriptome showed that the interaction *T. asperellum* and *P. vulgaris* involves the expression of genes encoding transporters, molecules involved in the secondary metabolism and the modulation mainly of enzymes involved in the degradation of the carbohydrate. The results of this work will contribute to the understanding of the complex molecular interaction *T. asperellum* – *Phaseolus vulgaris*.

ORGANIZAÇÃO DA TESE

Esta Tese de doutorado está organizada no formato de Capítulos. Inicialmente, no Capítulo I é apresentada uma revisão de literatura, na qual se encontram informações dos organismos envolvidos nessa pesquisa (*Trichoderma asperellum* e *Phaseolus vulgaris*) bem como das ferramentas e tecnologias utilizadas na análise de transcritomas, objetivo desse trabalho. O Capítulo II apresenta uma análise do transcritoma de *T. asperellum* TR356 durante o crescimento na presença das raízes do feijoeiro-comum (*P. vulgaris*) comparando com o crescimento do *T. asperellum* na ausência da planta, com o objetivo de identificar genes diferencialmente expressos e vias metabólicas ativadas durante a interação. No Capítulo III são apresentados os resultados obtidos da análise de um conjunto específico de genes do transcritoma do *T. asperellum* responsáveis pela produção de proteínas especiais conhecidas como efetores, e sua capacidade de permitir que a interação entre o fungo e a planta hospedeira se estabeleça. Esta tese é o primeiro estudo envolvendo a análise de transcritoma do *Trichoderma asperellum* isolado de solo do Cerrado durante a interação com uma planta de grande interesse econômico, o feijoeiro-comum.

1. CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL

1.1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos estabelecem diversas interações com plantas, sendo que a maior parte destas é benéfica ou simplesmente não prejudicam o vegetal. Os resultados das interações entre plantas hospedeiras e microrganismos são igualmente influenciados por fatores de estresse abiótico como temperatura, estresse hídrico, salinidade, alagamento e variações da acidez do solo (Schenk et al. 2012).

A interação microrganismo-planta, seja ela benéfica ou não, envolve eventos de reconhecimento, provocando a ativação de cascatas de sinalização e regulação da expressão de genes tanto na planta hospedeira quanto no microrganismo. A descrição dos mecanismos envolvidos nessa sinalização pode levar ao entendimento das relações entre microrganismos-planta e, auxiliar na busca e desenvolvimento de microrganismos que possam ser utilizados de forma benéfica na produção agrícola no Brasil e no mundo.

A análise de transcrito é uma das ferramentas aplicadas ao mapeamento de genes envolvidos neste tipo de interação, e, portanto, para o entendimento do complexo processo de interação microrganismos-planta hospedeira. Esta técnica possibilita a catalogação de todas as espécies de transcritos, incluindo RNAs mensageiros (mRNAs), RNAs não codificantes e micro RNAs; reconhecer *splicing* alternativos e outras modificações pós-transcricionais; além de possibilitar a quantificação das mudanças nos níveis de expressão de cada transcrito em determinadas condições (Wang et al., 2009). Um transcrito é definido como o conjunto de todos os transcritos de uma célula e sua abundância em um estágio específico de desenvolvimento ou condição fisiológica (Tan et al. 2009). Conhecer e compreender o transcrito é um passo fundamental para interpretar os elementos funcionais do genoma, revelar os constituintes moleculares de células e tecidos, além de possibilitar o reconhecimento de mecanismos moleculares de desenvolvimento, interação e adaptação (Wang et al. 2009).

Diferentes ferramentas e estratégias podem ser utilizadas para a análise completa de transcritos como: microarranjos, SAGE (*Serial Analysis of Genes Expression*), bibliotecas SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*), differential display, AFLP (*Amplified*

Fragment Length Polymorphism) a partir de sequências expressas (cDNA-AFLP) e RNAseq (Rodrigues et al. 2013).

A tecnologia de RNA-seq permite a análise de milhões de transcritos e pode ser empregada para avaliações simultâneas de sequências que foram expressas em organismos diferentes e em diferentes condições, tendo aplicação em análises de interação fungo-hospedeiro (Westermann et al. 2012). A tecnologia de RNA-seq consiste no sequenciamento em larga escala de regiões transcritas, gerando pequenos fragmentos (*reads*) com tamanho variável (30 - 400 pb), de acordo com a plataforma de sequenciamento empregada. O RNA é convertido em cDNA e posteriormente ligado a adaptadores, que possuem sequências complementares às dos *primers* usados nas reações de sequenciamento. Os adaptadores podem ser ligados a uma (*single-end*) ou a ambas as extremidades dos fragmentos (*paired-ends*), possibilitando o sequenciamento dos fragmentos em duas direções (Wang et al. 2009). Após o sequenciamento, os milhões de *reads* gerados são submetidos a análises de bioinformática para a discriminação das sequências oriundas dos dois organismos sequenciados (*Dual RNA-seq*) e análise do transcrito.

No que se refere à interação fungo-planta, vários estudos de expressão diferencial foram realizados. Estes estudos se referem principalmente aos fungos fitopatogênicos, como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rizoctonia solani* e *Fusarium solani* (Guyon et al. 2014). A análise da expressão diferencial de fungos do gênero *Trichoderma* em interação com planta necessita de uma maior abrangência para um melhor entendimento dessa interação (Wu et al. 2017).

Alguns trabalhos vêm demonstrando a expressão diferencial de genes em espécies de *Trichoderma* durante a interação pepino, arroz, feijão, cacau e soja. Kamoun e colaboradores (2013) analisaram o transcrito de *T. asperellum* em interação com plantas de pepino durante 5 dias a fim de identificar genes relacionados a proteção do fungo contra a resposta de defesa da planta hospedeira. Schomoll e colaboradores (2016) identificaram um conjunto de 2.500 de transcritos na interação de *T. virens*, *T. atroviride* e *T. reesei* relacionadas com a interação com a planta hospedeira e a indução de resistência. Em trabalho mais recente de Guzmán-Guzmán e colaboradores (2017) com três espécies de *Trichoderma* (*T. atroviride*, *T. viriens* e *T. reesei*) em interação com a planta modelo *Arabidopsis thaliana*, foi observado no transcrito dessas espécies um conjunto de 233 transcritos que codificam proteínas já descritas em outros modelos de interação microrganismo-planta hospedeira. Yu e colaboradores (2018) analisaram a expressão diferencial de proteínas diversas durante a interação entre *T. asperellum* e *Populus davidiana*, buscando na análise de transcrito a

identificação de hidrofobinas.

Dentro das pesquisas envolvendo análises de genoma e transcrito, as análises de expressão gênica em diferentes situações tornou-se uma ferramenta de rotina nos laboratórios. O grande desafio está na obtenção e entendimento de perfis de expressão de genes e na interpretação dos resultados para obtenção de conhecimento mais global dos mecanismos biológicos. Desta forma, as análises de enriquecimento funcional exploram categorias enriquecidas em listas de genes que foram expressos nas mais diversas condições. Na análise de enriquecimento, várias metodologias são empregadas, utilizando métodos computacionais que permitam a interpretação de dados de expressão gênica, estabelecendo um conjunto definido de genes que apresenta diferenças concordantes e estatisticamente significativas entre dois estados biológicos, como por exemplo, diferentes condições de cultivo, variação de temperatura e nutrientes, presença ou não de organismos associados.

Utilizando grupos de genes previamente definidos biologicamente como comparação, as análises de enriquecimento gênico compara esses genes com um conjunto de genes diferencialmente expressos, estes então, são agrupados em módulos que compartilham funções biológicas semelhantes, regulação e até mesmo localização cromossômica (Subramanian et al. 2005). Esse tipo de análise, permite que se possa encontrar um significado biológico, de forma mais fácil, para a lista de genes que se mostraram diferencialmente expressos e assim, categorizar o conjunto de todos esses genes, baseado em conhecimentos de anotação funcional, utilizando inferência estatística de sobre-representação gênica (Falcon & Gentleman, 2007).

A análise de genes diferencialmente expressos em microrganismos durante a interação com o hospedeiro representam um desafio para a bioinformática e para a microbiologia em geral. A determinação da função desse conjunto gênico torna-se um grande desafio para uma melhor compreensão do metabolismo celular e como os microrganismos modulam sua expressão a fim de conseguir interagir com diversos organismos.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 O GÊNERO *TRICHODERMA* E INTERAÇÃO COM PLANTAS HOSPEDEIRAS

Segundo o Index Fungorum (www.indexfungorum.org) o gênero *Trichoderma* pertence ao Domínio *Eucaryota*, Grupo *Fungi/Metazoa*, Reino Fungi, Filo *Ascomycota*, Subfilo *Pezizomycotina*, Classe *Sordariomycetes*, Subclasse *Hypocreomycetidae*, Ordem *Hypocreales*, Família *Hypocreales* mitospóricos (ou Família *Hyhpocreacea*). De fato, a classificação taxonômica do gênero *Trichoderma* está em constante evolução e pode ser estabelecida com base em critérios, morfológicos, moleculares e, até mesmo, por espectrometria de massa de células intactas (Steindorff, 2016).

O gênero *Trichoderma* foi descrito em 1794 por Persoon e Gray, para quatro espécies de fungos e, em 1969, foi realizada a primeira revisão taxonômica e reclassificação por Rifai (Samuels, 2006). Em 2015 foi apresentado na *International Mycological Association* um trabalho que descreveu 254 espécies de *Trichoderma* (Bisset et al. 2015) juntamente com a descrição de todas as espécies e suas respectivas nomenclaturas. Outro parâmetro a ser seguido, recomendado pelo ICTF (*International Commission on the Taxonomy of Fungi*) e *International Subcommittee on the Taxonomy Of Trichoderma and Hypocrea* (www.isth.info) é que se deve dar prioridade para o uso do nome *Trichoderma* ao termo *Hypocrea* para evitar confusões muito comuns quanto à classificação destes fungos.

O gênero *Trichoderma* inclui espécies micoparasitas e simbiontes de plantas, podendo ser encontradas livres no solo com estilo de vida saprofítico, colonizando a epiderme de raízes de plantas hospedeiras ou mesmo endofíticas (Mastouri et al. 2010; Druzhinina et al. 2011; Chen et al. 2018). Espécies como *T. virens*, *T. atroviride*, *T. asperellum* e *T. harzianum*, são usadas como agentes de controle biológico devido à sua atividade micoparásita antagonizando fungos fitopatogênicos, como *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia solani*, entre outros (Benítez et al. 2004; Shores et al. 2010). As espécies de *Trichoderma* também se caracterizam por utilizarem uma variedade de compostos como fonte de carbono e nitrogênio, serem resistentes ao ataque por outros microrganismos e tolerantes a diferentes tipos de fungicidas químicos (Daryaei et al. 2016; Chen et al. 2018), além disso, *Trichoderma spp.* também tem um grande potencial na biorremediação do solo (Mei et al. 2018).

A capacidade das espécies do gênero *Trichoderma* de atuarem como agentes de controle biológico foi reconhecido primeiramente por Weindling no começo da década de 1930, quando foi descrita a ação micoparásita de *Trichoderma* contra fungos do gênero

Rhizoctonia e *Sclerotinia* e seus efeitos benéficos no controle das doenças provocadas por estes patógenos. Isso estimulou o interesse por esse fungo e o desenvolvimento de pesquisas nesta área. Atualmente, algumas espécies vêm sendo utilizadas com sucesso, inclusive comercial, no controle biológico de fungos causadores de doenças em plantas de interesse comercial. Dados recentes mostram que *Trichoderma* spp. exibem efeitos antagônicos contra pelo menos 18 gêneros e 29 espécies de fungos patogênicos, bem como uma variedade de bactérias patogênicas (Wu et al. 2017).

Formulados a base de espécies de *Trichoderma* têm sido aplicados em diferentes culturas de relevância econômica, tais como feijão, soja, milho, morango, hortaliças e plantas ornamentais. Nos últimos anos a disponibilidade destes produtos e seu uso comercial tem aumentado no Brasil. No entanto, restrições como a falta de registro desses produtos junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a deficiência na divulgação de informações sobre o uso de agentes de biocontrole tem dificultado o crescimento deste mercado novo e cada vez mais promissor (Lucon, 2014).

O antagonismo de espécies de *Trichoderma* é resultado de seu micoparasitismo, e capacidade de produzir metabólitos secundários inibidores do crescimento de fungos fitopatogênicos. A produção dos metabólitos secundários varia entre as espécies de *Trichoderma* e isso pode estar relacionado também ao tipo de interação estabelecida entre parasita e hospedeiro (Vinale et al. 2009; Brito et al. 2014). Metabólitos secundários produzidos pelo *Trichoderma* incluem compostos como pironas, terpenóides, esteróides, gliotoxinas e glivirinas (Patron et al. 2007). Sabe-se que, além dos metabólitos secundários, estes fungos também produzem compostos conhecidos como “*peptaibols*” como os peptídeos antibióticos, sendo já descrita para *T. asperellum* por Brito e colaboradores (2014).

Além da proteção das plantas por ataque direto a fitopatógenos, foi demonstrado que os fungos *Trichoderma virens*, *T. harzianum* e *T. atroviride* estabelecem interações benéficas com plantas, incluindo algodão, milho e *Arabidopsis thaliana*, promovendo o seu crescimento e desenvolvimento, possivelmente através da produção do hormônio auxina e metabólitos secundários (Contreras-Cornejo et al. 2009; Tucci et al. 2011). Assim como reforçando a sua resposta de defesa contra patógenos como *Botrytis cinerea* e *Pseudomonas syringae*, pelo acúmulo de fitoalexinas, ácidos salicílico e jasmônico (Salas-Marina et al. 2011; Velazquez-Robledo et al. 2011).

A simbiose destas espécies de *Trichoderma* com plantas hospedeiras ocorre por mecanismos similares aos de fungos micorrízicos, iniciando-se com a colonização da superfície externa das raízes, seguida da produção de celulasas e da penetração na primeira ou na segunda camada de células da epiderme (Benitez et al. 2004; Druzhinina et al. 2018), colonizando diferentes partes do sistema radicular, como raízes primárias e secundárias (Nogueira-Lopez et al. 2018). Durante a colonização, espécies de *Trichoderma* simbiotes penetram a primeira ou segunda camadas do sistema radicular, primeiramente colonizando a epiderme da raiz e depois a área do córtex, sem atingir o sistema vascular (Chacón et al. 2007). Os passos iniciais da colonização radicular por *Trichoderma* começam com a fixação na superfície da raiz, seguida pela formação de estruturas semelhantes a micro “garras” que podem ajudar na penetração dos tecidos internos (Yedidia et al. 1999, 2000; Viterbo e Chet, 2006). Após o contato, os fungos secretam compostos que modulam ramificação das raízes da planta hospedeira e resposta de defesa entre outras, favorecendo aquisição de nutrientes e água, promovendo crescimento, resistência contra patógenos e a estresses abióticos (Garnica-Vergara et al. 2016; Chang et al. 1986; Yedidia et al. 2001; Nogueira-Lopez et al. 2018; Donoso et al. 2008; Bae et al. 2009; Brotman et al. 2010).

O contato entre as raízes das plantas hospedeiras e o fungo simbiote é mediado por proteínas do tipo hidrofobina, e leva à secreção de hidrolases de parede celular vegetal que facilitam a internalização dos tecidos vegetais pelas hifas fúngicas. Durante o estágio inicial de penetração das hifas no tecido radicular da planta hospedeira é necessária a supressão de sua defesa para o sucesso da colonização inicial da raiz. Acredita-se que esta supressão seja mediada por proteínas pequenas solúveis ricas em cisteína denominadas SCRPs que atuam como proteínas do tipo efector. Até esse estágio, o comportamento de *Trichoderma spp* é semelhante ao de um patógeno vegetal que invade estruturas radiculares. No entanto, eventos subsequentes desencadeados pelas proteínas secretadas pelo fungo o diferencia de patógenos (Mendoza-Mendoza et al. 2018).

Em um experimento recente de interação entre *Trichoderma atroviride* e raízes de tomate, foi possível observar que o fungo também induz a resistência sistêmica da planta hospedeira sem a necessidade dos dois organismos estarem em contato direto (Medeiros et al. 2017). A maioria das espécies de *Trichoderma* investigadas até o momento geralmente exibem uma maior capacidade de promover o crescimento da planta ou propriedades de ataque efetivo a fungos fitopatogênicos, raramente observado as duas propriedades num mesmo isolado (Shaw et al. 2016).

Os fatores que definem o resultado da colonização fúngica (endofítica, simbiótica ou patogênica) não são totalmente compreendidos. Os mecanismos moleculares das interações de *Trichoderma spp* com as raízes de plantas estão apenas começando a ser compreendidos (Mojana di Cologna et al. 2018). As descobertas recentes apontam para o envolvimento de componentes de seu secretoma na indução de suscetibilidade em plantas hospedeiras e talvez suprimindo a resistência inicial das plantas, o que ajuda na penetração do fungo nas raízes (Lamdan et al. 2015). Além disto, foram identificadas proteínas que poderiam ter alvos intracelulares (Mendoza-Mendoza et al. 2018).

1.2.1.1 PROTEÍNAS EFETORAS

Embora muitas plantas sejam colonizadas por espécies de *Trichoderma* simbiontes, os mecanismos exatos pelos quais estas colonizam e se mantêm nos tecidos das hospedeiras sem desencadear intensa resposta de defesa permanecem desconhecidos. Provavelmente famílias de proteínas secretadas no apoplasto da planta hospedeira tenham papel na supressão de sua resposta imune (Nogueira-Lopez et al. 2018).

Proteínas efetoras com ação inibitória sobre a resposta de defesa de plantas hospedeiras já foram descritas para fitopatógenos. Estes efetores podem ser divididos em apoplásticos e citoplasmáticos em função do local de ação. Os efetores apoplásticos são aqueles secretados pelos microrganismos durante a interação com a planta hospedeira, podendo acumular na superfície exposta da célula ou nos espaços intercelulares. Já os efetores intracelulares ou citoplasmáticos são aqueles que podem atravessar as estruturas celulares e ter contato direto com compartimentos subcelulares e organelas (Kamoun, 2006; Kamoun 2007; Block et al. 2008) (Figura 01).

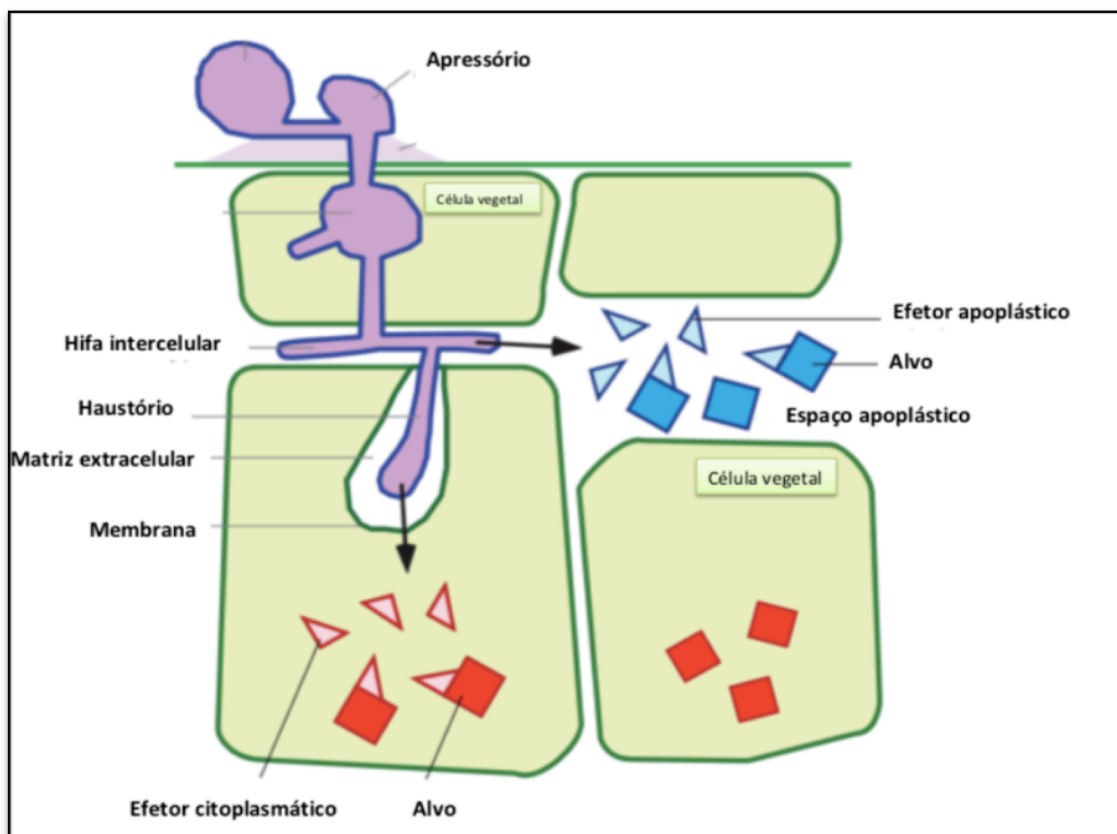


Figura 01. Vista esquemática ilustrando os locais de ação dos efetores apoplásticos e citoplasmáticos (Adaptado de Kamoun, 2006).

O processo de transporte de proteínas efetoras para o interior das células hospedeiras utilizado por bactérias fitopatogênicas é mais bem descrito do que para efetores de fungos fitopatogênicos. Os efetores possuem motivos específicos em sua sequência que são reconhecidos pela maquinaria de transporte de proteínas na membrana das células da planta hospedeira, porém, esse processo ainda não está bem esclarecido (Petre & kamoun, 2014). Sabe-se que uma vez translocados no interior da célula hospedeira, os efetores citoplasmáticos podem transitar para diferentes estruturas, incluindo organelas e vários sub-compartimentos da célula (Bai et al. 2009; Schornack et al. 2013).

Os efetores apoplásticos apresentam um peptídeo sinal curto, seguido de domínios funcionais, dentre os quais pode-se exemplificar domínios de inibidores de proteases (Damasceno et al. 2008; Kamoun, 2006). Os efetores citoplasmáticos são proteínas modulares, contendo peptídeo sinal no N-terminal seguido por motivos de translocação conservados de RxLR (R: arginina; x: qualquer aminoácido; L: leucina; R: arginina) ou um motivo semelhante e domínio funcional (Win et al. 2012; Plett et al. 2011; Guzmán-Guzmán et al. 2017) (Figura 02).

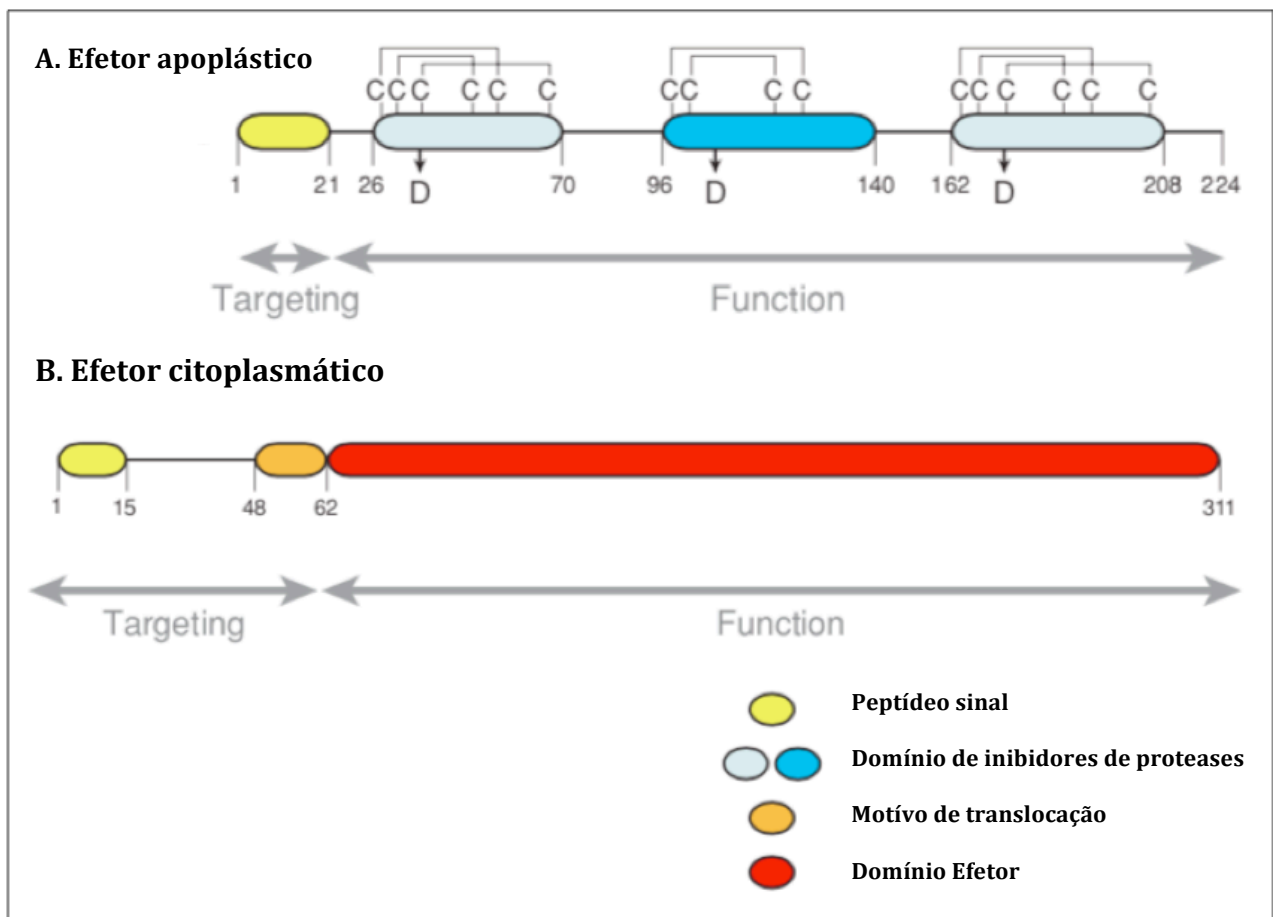


Figura 02. Organização dos domínios de efetores apoplásticos e citoplasmáticos. (A) Desenho esquemático do efetor apoplástico. (B) Desenho esquemático do efetor citoplasmático com motivo conservado RxLR que estão relacionados a translocação destes efetores para o interior da célula (estes motivos estão ausentes em efetores apoplásticos). Em ambos os desenhos, os números sob as sequências indicam as posições dos aminoácidos. Todos os efetores, citoplasmáticos ou apoplásticos apresentam um peptídeo sinal na posição N-terminal da molécula, condição obrigatória para toda molécula efetora. As setas cinzentas distinguem as regiões efetoras das proteínas e as que estão envolvidas na secreção e direcionamento dos envolvidos na atividade efetora (Adaptado de Kamoun, 2006).

Gohre & Robatzek (2008) relataram que os efetores podem apresentar atividades na inibição da defesa ou inibição do reconhecimento do microrganismo colonizador pela planta hospedeira. Estas moléculas pode atuar pela inibição de enzimas do tipo hidrolase no apoplasto, inibição de cascatas de sinalização, modificação do transcrito relacionado a resposta de defesa, degradação de componentes/proteínas relacionadas à defesa, interferência na secreção de proteínas e no trânsito de vesículas.

Com relação às funções dos efetores em espécies de *Trichoderma* simbiontes, já foram descritas proteínas com domínio CFEM e Lys-M que atuam reduzindo a resposta de defesa de plantas hospedeiras (Guzmán-Guzmán, Alemán-Duarte, Delaye, Herrera-Estrella, & Olmedo-Monfil, 2017; Lamdan, Shalaby, Ziv, Kenerley, & Horwitz, 2015). No entanto, o mecanismo pelo qual estas proteínas atuam ainda não descrito. Em média 50% das proteínas

secretadas por *Trichoderma* não estão envolvidas nas vias de secreção convencional, por não apresentarem um peptídeo sinal. Os mecanismos utilizados pelas células fúngicas para secreção dessas proteínas no apoplasto continua desconhecido.

1.2.2 FEIJOEIRO-COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.)

O feijoeiro-comum, *Phaseolus vulgaris*, é uma das culturas economicamente mais relevante do mundo, representando fonte primária de proteínas em países da América Latina e África. Porém sua posição não pode ser subestimada nos EUA, no Canadá ou na Índia (Hnatuszko-Konka et al. 2014). O feijão é altamente nutritivo com quase o dobro dos níveis de proteínas em relação aos cereais, menor teor de gordura do que a soja ou amendoim e maior quantidade de lisina, fósforo, ferro, zinco, magnésio, cobre e cálcio em relação a outras sementes (Blair et al. 2009).

Entre mais de 30 espécies do gênero *Phaseolus*, o feijoeiro-comum é o mais utilizando em culturas, ocupando mais de 90% da área destinada ao cultivo de feijão no mundo (Broughton et al. 2003; Morales, 2006; Singh, 2001; Santos & Gavilanes, 2008). De acordo com a CONAB em 2018, a produção de feijão no Brasil na safra 2017/2018 foi de 1.032,00 (1 milhão e 32 mil toneladas), a área destinada à cultura cresceu 9,3% em comparação com o ciclo passado, possivelmente motivado pela opção do feijão ao invés do milho. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de feijão, respondendo por 12% da produção, atrás apenas de Nyammar com 16,4% e da Índia com 15,7%. No Mercosul, o Brasil é o principal produtor com cerca de 3,2 milhões de toneladas anuais, seguido de países como Argentina, com 350 mil toneladas, Paraguai com 56 mil toneladas e Uruguai com 3,5 mil toneladas (CONAB, 2018).

Além da importância econômica, o feijão possui um importante papel social, uma vez que é reconhecido como cultura de subsistência em pequenas propriedades. No Brasil, a produção é feita principalmente através da agricultura familiar e de acordo com os dados do Ministério do Desenvolvimento Agrário, esse setor emprega quase 75% da mão de obra no campo e é responsável pela segurança alimentar dos brasileiros, produzindo 70% do feijão consumido no país (Fao, 1996; Brasil, 2013).

Apesar de sua habilidade em se adaptar a diferentes condições ambientais, a produção de feijão pelo mundo ainda sofre perdas por fatores bióticos e abióticos, dentre as condições

abióticas que impactam nesta produção pode-se citar toxicidade do solo, estresse por seca ou deficiências nutricionais (Beaver & Osorno, 2009; Popelka et al. 2004).

A cultura do feijoeiro-comum, é impactada por diferentes patógenos de importância epidemiológica que causam grandes prejuízos na produção de grãos como, por exemplo, o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Este fitopatógeno pode sobreviver em sementes por mais de três anos e através delas estabelecer a doença em novas partes da planta. Bianchini et al. (2005) demonstraram que em áreas com histórico do mofo branco causado por *S. sclerotiorum* pode se chegar a perdas de 100% na produção, sobretudo pela dificuldade no seu controle após o estabelecimento da doença.

Visto que o feijoeiro representa tem importância econômica e nutricional para grande parte da população mundial, estudos que permitam a investigação de novas formas de proteção dessa planta contra as diferentes pragas se faz necessário. Por isto, pesquisadores têm dedicado esforços em reconhecer e identificar espécies de microrganismos capazes de interagir de forma benéfica e também proteger as plantas de feijoeiro.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GERAL

Mapear genes relacionados à resposta de *Trichoderma asperellum* TR356 à interação com *Phaseolus vulgaris* L.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mapear genes diferencialmente expressos por *T. asperellum* em interação com *Phaseolus vulgaris* L.;
- Identificar categorias funcionais e vias metabólicas enriquecidas entre os genes diferencialmente expressos;
- Identificar e caracterizar *in silico* proteínas candidatas a efetores produzidas por *T. asperellum* TR356 durante o crescimento na presença das raízes de *Phaseolus vulgaris* L.

1.4. REFERÊNCIAS

AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20/01/2016.

Bae, H., Sicher, R.C., Kim, M.S., Kim, S.-H., Strem, M.D., Melnick, R.L., And Bailey, B.A. 2009. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *J. Exp. Bot.* 60, 3279-3295.

Bai, X.; Correa, V. R.; Toruño, T. Y.; Ammar, E.-D.; Kamoun, S. & Hogenhout, S. A. 2009. AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 22: 18–30.

Beaver JS, Osorno JM. 2009. Achievements and limitations of contemporary common bean breeding using conventional and molecular approaches. *Euphytica* 168:145–75.

Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C. And Codón, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7, 249- 260.

Bettiol, W., Morandi M.A.P., Pinto, Z.V., Paula Junior T.J., Correa E.B., Moura A.B., Lucon C.M.M., Costa J.C.B., Bezerra J.L., 2012. Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente (Documento) 113p.

Bianchini, A.; Maringoni, A. C.; Carneiro, S. M. T. P. G. Doenças Do Feijoeiro. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A. 2005. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, cap. 37, p. 333-349.

Beck, M.; Heard, W.; Mbengue, M. & Robatzek S. 2012. The INs and OUTs of pattern recognition receptors at the cell surface. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15: 367–74.

Medzhitov, R. & Janeway, C. A. 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91: 295–8.

Bissett J, Gams W, Jaklitsch W, Samuels GJ. 2015. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus.* 6(2):263–295.

Blair Mw, Munoz Mc, Pedraza F, Gaitan E, Tohme J, Main D, Frisch D, Wing R: 2009. Generation of expressed sequence tags (ESTs) from vegetative tissues of a common bean (*Phaseolus vulgaris*) mapping parente.

Block, A.; Li, G.; Fu, Z. Q. & Alfano, J. R. 2008. Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 396–403.

Brito JP, Ramada MH, De Magalhães MT, Silva LP, Ulhoa CJ. 2014. Peptaibols from *Trichoderma asperellum* TR356 strain isolated from Brazilian soil. *Springerplus.* 13(3):600.

Brotman, Y.; Gupta, K.; Viterbo, A. , 2010. Quick guide - *Trichoderma* . Magazine Current

Biology, v.20, p. 1-2.

Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. 2003. Beans (*Phaseolus spp.*)—model food legumes. *Plant and Soil*, 252, 55–128.

Carvalho DDC, Geraldine AM, Lobo Junior M, Mello SCM. 2015. Biological control of white mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. *Pesq. agropec. bras.* 50(12):1220-1224.

Carvalho, M.C.C.G., Silva, D.C.G., 2010. Next generation DNA sequencing and its applications in plant genomics. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.40. p.735-744.

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

Chang, Y.-C., Chang, Y.-C., And Baker, R. (1986). Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis.* 70, 145-148.

Chaudhary N, Sandhu P, Ahmed M, Akhter Y. 2017. Structural basis of transport function in major facilitator superfamily protein from *Trichoderma harzianum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95: 1091–1100

Chen S, Yu H, Zhou X, Wu F. 2018. Seedling Rhizosphere *Trichoderma* and *Fusarium* spp. Communities Altered by Vanillic Acid. *Front Microbiol.* 2018;9:2195. Published Sep 18. doi:10.3389/fmicb.2018.02195

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento, 2018. Análise mensal: Feijão – março 2018.

Conesa, A.,P. Madrigal, S. Tarazona, D. Gomezcabrero, A. Cervera, A.Mcpherson, M. W. Szcześniak, D.J. Gaffney, L.L. Elo, X. Zhang, A. Mortazavi. 2016. A survey of best practices for RNA-seq data analysis *Genome Biol.*, 17.

Contreras-Cornejo Ha, Macías-Rodríguez L, Cortés-Penagos C, López-Bucio J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149:1579–92.

Costa, J.G.C. 2014. Feijão: morfologia. AGEITEC: Agência Embrapa de Informação Tecnológica, Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijao/arvore/CONTAG01_9_1311200215101.html>. Acesso em: 24 jul. 2016.

Daryaei A, Jones EE, Ghazalibiglar H, Glare TR, Falloon Re. 2016. Effects of temperature, light and incubation period on production, germination and bioactivity of *Trichoderma atroviride*. *J Appl Microbiol.*

De Lafuente M, Borrajo A, Bermúdez J, Lores M, Alonso M, López M, Et AL. 2011. 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *J Proteomics* 74: 262–7.

- Djonović S, Pozo MJ, Dangott LJ, Howell CR, Kenerley CM. 2006.** Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Mol Plant Microbe Interact.* 19:838–53.
- Donoso, E.P., Bustamante, R.O., Carú, M., And Niemeyer, H.M. 2008.** Water Deficit as a Driver of the Mutualistic Relationship between the Fungus *Trichoderma harzianum* and Two Wheat Genotypes. *Applied and Environ. Microbiol.* 74, 1412-1417.
- Dou D, Kale SD, Wang X, Jiang RHY, Bruce NA, Arredondo FD, et al. 2008.** RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. *Plant Cell.* 20:1930–47.
- Druzhinina I. S., Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, Mukherjee PK, Zeilinger S, Grigoriev IV, Kubicek CP. 2011.** *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat Rev Microbiol* 9:749–759
- Druzhinina, I. S., Chenthamara, K., Zhang, J., Atanasova, L., Yang, D., Miao, Y., Rahimi, M. J., Grujic, M., Cai, F., Pourmehdi S., Salim, K. A., Pretzer, C., Kopchinskiy, A. G., Henrissat, B., Kuo, A., Hundley, H., Wang, M., Aerts, A., Salamov, A., Lipzen, A., LaButti, K., Barry, K., Grigoriev, I. V., Shen, Q., and Kubicek, C. P. 2018.** Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts ed. Francis Martin. *PLOS Genet.* 14:e1007322.
- Falcon S. and Gentleman R. 2007.** Using gstats to test gene lists for go term association, *Bioinformatics* 23(2):257-258.
- Fao. 1996.** Perfil da agricultura familiar no Brasil: dossiê estatístico. Brasília, DF, 24 p. (FAO. Projeto UFT/BRA/036/BRA).
- Ferreira, C. M. 2007.** Mercado de feijão. Brasília DF: Agência de Informação Embrapa, Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia4/AG01/arvore/A01_69_1162003151646.html> Acesso em: 05. jan. 2017.
- Garnica-Vergara, A., Barrera-Ortiz, S., Muñoz-Parra, E., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., Ruiz-Herrera, L. F., and López-Bucio, J. 2016.** The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *New Phytol.* 209:1496–1512.
- Giusti, J., Kettener, K., Fuchs-Ferraz, M.C.P. 2016.** Influência do sequências de nova geração no futuro da genética da conservação. *Revista RG News* 2 (2) – Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos.
- Göhre, V. & Robatzek, S. 2008.** Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46: 189–215.
- Guyon K, Balagué C, Roby D, Raffaele S. 2014.** Secretome analysis reveals effector candidates associated with broad host range necrotrophy in the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *BMC Genomics.* 15:336.
- 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 Genetics* (2017) 18:16 Doi 10.1186/s12863-017-0481-y

Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*. 158:17–25.

Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., Gerszberg, A., Wiktorek-Smagur, A., & Martin K., Mcdougall B.M., Mcilroy S., Jayus, Chen J. E., Seviour R.J. 2007. Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal β -(1,3)- and β -(1,6)-glucanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 31:168–192.

Hogenhout, S. A.; Van Der Hoorn, R. A. L.; Terauchi, R. & Kamoun, S. 2009. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 22(2): 115-122.

Jones, J. D. G. & Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323– 9.

Kamoun S, Kado CI, Esquivel-Naranjo EU, Herrera-Estrella A, Horner NR, Grenville-Briggs LJ, et al. 2013. Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. *Curr Opin Plant Biol*. 12:1–12. Elsevier Ltd.

Kamoun S. 2006. A catalogue of the effector secretome of plant Pathogenic Oomycetes. *Annu Rev Phytopathol*. 44:41–60.

Kamoun S. Groovy times: 2007. filamentous pathogen effectors revealed. *Curr Opin Plant Biol*. 10:358–65.

Kamoun, S. 2009. The secretome of plant-associated fungi and Oomycetes. In: Deising, H. *Plant Relationships*. 2 nd. Edition. Berlin: Springer-Verlag, pp. 173-180.

Lévesque CA, Brouwer H, Cano L, Hamilton JP, Holt C, Huitema E, et al. 2010. Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. *Genome Biol*. 11:R73. BioMed Central.

Lin H, Kazlauskas RJ, Travisano M. 2017. Developmental evolution facilitates rapid adaptation. *Scientific Reports*. 7:15891. doi:10.1038/s41598-017-16229-0.

Lopes FA, Steindorff AS, Geraldine AM, Brandão RS, Monteiro VN, Lobo M Jr, Coelho AS, Ulhoa CJ, Silva RN: 2012. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biol* 116(7):815–824.

Lucon, C.M.M, 2014. *Trichoderma*: o que é, para que serve e como usar corretamente na lavoura. Instituto Biológico. São Paulo, 1 edição.

Ma, L., Chen, L., Zhang, L., Zou, G., Liu, R., Jiang, Y., Zhou, Z. 2016. RNA Sequencing Reveals Xyr1 as a Transcription Factor Regulating Gene Expression beyond Carbohydrate metabolism. *BioMed Research International*. Pg 20.

Mahmoud H. El_Komy, Amgad A. Saleh, Anas Eranthodi, Younes Y. Molan, Mastouri et al. 2010. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, v. 100, p. 1213-1221.

- Medeiros, H. A. et al. 2017.** Tomato progeny inherit resistance to the nematode *Meloidogyne javanica* linked to plant growth induced by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *Sci. Rep.* 7, 40216.
- Mei, J., Wang, L., Jiang, X., Wu, B. and Li, M., 2018.** Functions of the C2H2 Transcription Factor Gene *thmea1* in *Trichoderma harzianum* under Copper Stress Based on Transcriptome Analysis. 2018. *BioMed Research International*, Article ID 8149682, 10 pages <https://doi.org/10.1155/2018/8149682>
- Mendoza-Mendoza, A., Zaid, R., Lawry, R., Hermosa, R., Monte, E., Horwitz, B. A., and Mukherjee, P. K. 2018.** Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: Role of the fungal secretome. *Fungal Biol. Rev.* 32:62–85
- Mojana di Cologna, N., Go_mez-Mendoza, D., Zanoelo, F., Giannesi, G., Cavalieri, N., Rios de Souza Moreira, L., Ferreira Filho, E., Ornelas Ricart, C., 2018.** Exploring *Trichoderma* and *Aspergillus* secretomes: proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest. *Enzym. Microb. Technol.* 109, 1e10.
- Morales FJ. Common beans. In: Loebenstein G, Carr JP, editors. 2006.** Natural resistance mechanisms of plants to viruses. Springer; p. 367–82.
- Morandi, M.A.B; Betiol, W. 2009.** Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: **Betiol, W.; Morandi, M.A.B. (Orgs).** Biocontrole de doenças em plantas: uso e perspectivas. Jaquariúna: EMBRAPA Meio Ambiente.
- Mukherjee PK, Horwitz B a, Herrera-Estrella A, Schmoll M, Kenerley CM. 2013.** *Trichoderma* research in the genome era. *Annu Rev Phytopathol.* 51:105–29.
- Nogueira-Lopez G, Greenwood DR et al. 2018.** The Apoplastic Secretome of *Trichoderma virens* During Interaction With Maize Roots Shows an Inhibition of Plant Defence and Scavenging Oxidative Stress Secreted Proteins. *Plant Sci*; 9: 409. doi: [10.3389/fpls.2018.00409](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00409)
- Patron NJ, Waller RS, Cozijnsen AJ, Straney DC, Gardiner DM, Nierman WC, Howlett BJ. 2007.** Origin and distribution of epipolythiodioxopiperazine (ETP) gene clusters in filamentous ascomycetes. *BMC Evol Biol.* 7:174.
- Perazzolli M, Herrero N, Sterck L et al. 2016.** Transcriptomic responses of a simplified soil microcosm to a plant pathogen and its biocontrol agent reveal a complex reaction to harsh habitat. *BMC Genomics* 17:838.
- Pereira JL, Queiroz RM, Charneau SO, Felix CR, Ricart CA, da Silva FL, Steindorff AS, Ulhoa CJ, Noronha EF. 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.* 30;9(5).
- Plett JM, Daguerre Y, Wittulsky S, Vayssières A, Deveau A, Melton SJ, et al. 2014.** Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proc Natl Acad Sci.* 111:8299–304.
- Plett JMM, Kemppainen M, Kale SDD, Kohler A, Legué V, Brun A, et al. 2011; A**

secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Curr Biol.* 21:1197–203.

Popelka JC, Terryn N, Higgins TJV. 2004. Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries? *Plant Sci* 167:195–206.

Richard M.M.S., Gratias A., Thareau V., Kim K., Balzergue S., Jackson J.J.S., Geffroy V. 2017. Genomic and epigenomic immunity in common bean: the unusual features of NB-LRR gene family, *DNA Research*, , dsx046, <https://doi.org/10.1093/dnares/dsx046>.

Rodrigues, C. M.; Mafra, V.; Machado, M. A. 2013. Transcritômica. In: BORÉM, A. L.; FRITSCHÉ-NETO, R. *Ômicas 360°: aplicações e estratégias para o melhoramento de plantas.* Viçosa: UFV.

Roux, F.; Voisin, D.; Badet, T.; Balagué, C.; Barlet, X.; Huard-Chauveau, C.; Roby, D. & Raffaele, S. 2014. Resistance to phytopathogens e tutti quanti: placing plant quantitative disease resistance on the map. *Molecular Plant Pathology* 15(5): 427-432.

Salas-Marina MA, Isordia-Jasso MI, Islas-Osuna MA, Delgado-Sánchez P, Jiménez-Bremont JF, RodríGuez-Kessler M, et al. 2015. The Epl1 and Sml1 proteins from *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma virens* differentially modulate systemic disease resistance against different life style pathogens in *Solanum lycopersicum*. *Front Plant Sci.* 6:1–13.

Salas-Marina MA, Silva-Flores MA, Uresti-Rivera EE, Castro-Longoria E, Herrera-Estrella A, Casas-Flores S. 2011. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *Eur J Plant Pathol.* 131:15–26.

Saloheimo M, Wang H, Valkonen M, Vasara T, Huuskonen A, Riikonen M, et al. 2004. Characterization of Secretory Genes ypt1 / yptA and nsf1 / nsfA from two filamentous fungi: induction of secretory pathway genes of *Trichoderma reesei* under secretion stress conditions. *Appl Environ Microbiol.* 70:459–67.

Samuels, G. J. 2006. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* 96:195-206.

Samuels, G.J.; Lieckfeldt, E.; Nirenberg, H.I. 1999. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia.* 51:71-88.

Santos, J.B.; Gavilanes, M.L. Botânica. In: Vieira, C.; Paula Júnior, J.; Borém. A. 2008. (Ed.). *Feijão.* 2. ed. Viçosa: UFV, p. 41-66.

Schenk, P.M.; Carvalhais, L.C.; Kazan, K. 2012. Unraveling plant–microbe interactions: can multi-species transcriptomics help *Trends in Biotechnology*, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 177–184.

Schmoll, C. Dattenbock, N. Carreras-Villasenor, A. Mendoza Mendoza, et al. 2016. The Genomes of three uneven siblings: footprints of the lifestyles of three *Trichoderma* Species *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 80 pp. 205-327

Schornack, S.; Moscou, M. J.; Ward, E. R. & Horvath, D. M. 2013. Engineering plant

disease resistance based on TAL effectors. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51: 383–406.

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

Shaw, S. et al. 2016. Transcriptional reprogramming underpins enhanced plant growth promotion by the biocontrol fungus *Trichoderma hamatum* GD12 during antagonistic interactions with *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Mol. Plant Pathol.* 17, 1425–1441.

Shoresh, M., Harman, G. E. & Mastouri, F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu Rev Phytopathol* 48, 21–43.

Silva, A.N.; Azevedo, G.B.; Sobrinho, G.G.R.; Novaes, Q.S. 2014. Effect of chemical products and use of the *Trichoderma* spp. for control of *Fusarium solani* in passion fruit trees: *Interciencia*, Caracas, v. 39, p. 398-403.

Singh, S.P. 2001. Broadening the genetic base of common bean cultivars: a review. *Crop Science*, Madison, v. 41, n. 6, p. 1659-1675.

Steindorff AS, Silva RN, Coelho ASG, Nagata T, Noronha EF, Ulhoa CJ 2012. *Trichoderma harzianum* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in mycoparasitism against *Fusarium solani*. *Biological Control* 61(2):134-140.

Steindorff AS 2016. Genômica Estrutural E Funcional De Fungos Do Gênero *Trichoderma*. Tese de Doutorado - UnB.

Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:15545–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>.

Sunil, S. A., Siu, K. S., 2014. *Trichoderma* Secretome: An Overview. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*; Chapter 8. School of Biological Sciences, Nanyang Technological University, Singapore.

Tan, K.-C.; Ipcho, S. V. S.; Trengove, R. D.; Oliver, R. P.; Solomon, P. S. 2009. Assessing the impact of transcriptomics, proteomics and metabolomics on fungal phytopathology. *Molecular Plant Pathology*, London, v. 10, n. 5, p. 703–715.

Tartarin B.B.G., Barros W.S., Sousa L.C.D., 2016. Principais pragas na cultura do feijoeiro-comum. *Revista Conexão Eletrônica*. Três Lagoas, MS. Vol. 13. N. 1.

Troian, R.F., Steindorff, A.S., Ramada, M.H.S., Arruda, W., Ulhoa, C.J. 2014. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. *Biotechnol. Lett.* 36, 2095e2101.

Tucci M, Ruocco M, De Masi L, De Palma M, Lorito M. 2011. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Mol Plant Pathol.* 12:341–54.

- Tyler, B. M.; Tripathy, S.; Zhang, X. M.; Dehal, P.; Jiang, R. H. Y.; Aerts, A.; Et Al. 2006.** *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* 313(5791): 1261-1266.
- Velazquez-Robledo R, Contreras-Cornejo HA, Macias-Rodriguez L, Hernandez-Morales A, Aguirre J, Casas-Flores S, et al. 2011.** Role of the 4- phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* in secondary metabolism and induction of plant defense responses. *Mol Plant Microbe Interact.* 24:1459–71.
- Vinale F, Ghisalberti EL, Sivasithamparam K, Marra R, Ritieni A, Ferracane R, Woo S, Lorito M. 2009.** Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Lett Appl Microbiol.* 48:705–711.
- Viterbo, A., and Chet, I. 2006.** TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Mol. Plant Pathol.* 7, 249–258. doi: 10.1111/j.1364-3703.2006.00335.x
- Wang, Z.; Gerstein, M.; Snyder, M. 2009.** RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, London, v. 10, n. 1, p. 57–63.
- Westermann, A.J.; Gorski, S.A.; Vogel, J. 2012.** Dual RNA-seq of pathogen and host. *Nature Reviews Microbiology*, London, v. 10, n. 9, p. 618–630.
- Whisson SC, Boevink PC, Moleleki L, Avrova AO, Morales JG, Gilroy EM, et al. 2007.** A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature.*;450:115–8.
- Win, J.; Chaparro-Garcia, A.; Belhaj, K.; Saunders, D. G. O.; Yoshida, K.; Dong, S.; Schornack, S.; Zipfel, C.; Robatzek, S.; Hogenhout, S. A. & Kamoun S. 2012a.** Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 77: 235–47.
- Wu, Q., Sun, R., Ni, M., Yu, J., Li, Y., Yu, C., Dou, K., Ren, J. and Chen, J. 2017.** Identification of a new fungus, *Trichoderma asperellum* GDFS1009, and comprehensive evaluation of its effectiveness in biocontrol. *PLoS One.*
- Yedidia, I. I., Benhamou, N., and Chet, I. I. 1999.** Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1061–1070.
- Yedidia, I., Srivastva, A., Kapulnik, Y., and Chet, I. 2001.** Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil* 235, 235-242.
- Yu W, Mijiti G, Huang Y, Fan H, Wang Y, Liu Z. 2018.** Functional analysis of eliciting plant response protein Epl1-Tas from *Trichoderma asperellum* ACCC30536. *Sci Rep.* 2018;8(1):7974. Published May 22. doi:10.1038/s41598-018-26328-1

2. CAPÍTULO II – ANÁLISE GLOBAL DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE *T. asperellum* TR356 EM INTERAÇÃO COM *P. vulgaris*

2.1 METODOLOGIA

2.1.1 ORGANISMOS UTILIZADOS

2.1.1.1 *Trichoderma asperellum* TR356

O fungo *T. asperellum* TR356 utilizado como modelo neste trabalho foi isolado de amostras de solo do Cerrado na região de Formosa no estado de Goiás, Brasil. Identificado por métodos morfométricos e moleculares, com base na sequência dos marcadores ITS1 e 2 e Tef1 (Lopes et al. 2012) e gentilmente cedido pelo Doutor Murillo Lobo Júnior da coleção de fungos e microrganismos funcionais da EMBRAPA arroz e feijão – GO. Os estoques são mantidos em ultrafreezer a -80°C em glicerol 20% (v/v). Para uso estes são repicados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) 2% e mantidos a 4°C.

Este isolado foi utilizado como modelo levando em consideração estudos prévios de sua ação como micoparasita de fitopatógenos e interação com plantas hospedeiras. Em trabalhos anteriores, nosso grupo demonstrou que este isolado modula a expressão de genes de defesa de feijoeiro em estudos de interação, indicando seu potencial em alterar a resposta de defesa de planta hospedeira. O genoma de *T. asperellum* TR356 já foi sequenciado, montado e está disponível no endereço: <http://genome.jgi.doe.gov/Triasp1/Triasp1.home.html>, Joint Genome Institute (JGI), California.

2.1.1.2 *Phaseolus vulgaris* L. – CULTIVAR PÉROLA

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar pérola utilizado como modelo neste estudo é fruto do esforço contínuo de melhoramento genético da Embrapa Arroz e Feijão – GO, juntamente com o Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA). A cultivar pérola foi lançada em 1996 e indicada para plantio em Goiás, Distrito Federal, Mato

Grosso, Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Norte, Rondônia, Acre, Espírito Santo e Santa Catarina. A cultivar de feijão Pérola (linhagem LR 720982 CPL53) é proveniente do trabalho de seleção de linhagens puras da cultivar Aporé, realizado pela Embrapa Arroz e Feijão (Yokoyama et al. 1999).

Dentre as principais características deste cultivar, estão: porte semi-ereto; ciclo de 90 dias; média de 46 dias para floração; flor branca; vagem verde, levemente rosada, na maturação; e vagem amarelo-areia na colheita. A cultivar Pérola é classificado no grupo comercial carioca, o seu grão é de cor bege-clara, com rajas marrom-claras, brilho opaco e peso de 100 sementes de 27 g. Destaca-se por produzir grãos maiores, o que lhe confere excelente aspecto visual (Yokoyama et al. 1999).

2.1.2 OBTENÇÃO DOS CONÍDIOS

Para a obtenção dos conídios de *T. asperellum*, 5 discos de meio BDA da cultura deste isolado foram inoculados em frascos do tipo *Erlenmeyer* contendo 50 gramas de arroz parboilizado e 25 mL de água destilada previamente autoclavados a 120°C por 20 minutos. Os frascos foram mantidos em câmara de germinação com fotoperíodo de 12 horas durante cinco dias a 28°C para a obtenção de esporos. O material dos frascos foi ressuspenso em 100 mL de água destilada autoclavada. A concentração da suspensão de esporos foi contada em câmara de Neubauer.

2.1.3 GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE FEIJOEIRO

A assepsia das sementes de feijoeiro da cultivar Pérola foi realizada em fluxo laminar através da sua imersão em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 1%, por 10 minutos, seguida de três lavagens, de um minuto cada, com água autoclavada conforme descrito por Pereira et al. (2014). Após a assepsia, as sementes foram transferidas para placas de Petri de vidro contendo meio ágar-glicose 2%, ambos autoclavados anteriormente. Estas foram incubadas em câmara de germinação (modelo TECHNICAL 4013) a 28°C com fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de escuro durante quatro dias. As plântulas obtidas foram então utilizadas nos experimentos de co-cultivo (Figura 03 A).

2.1.4 EXPERIMENTO DE CO-CULTIVO *T. asperellum* TR356/FEIJOEIRO

As plântulas obtidas como acima descrito, foram transferidas para frascos adaptados para seu cultivo em meio líquido, contendo 50 mL de meio *Murashige and Skoog* (MS) suplementado com sacarose ($0,5\text{g.L}^{-1}$) e acrescido de 10 mL de vitaminas de Gamborg preparado de acordo com as instruções do fabricante (*Sigma-Aldrich*). Os frascos foram em seguida selados com papel filme na abertura superior (Figura 03 B). As plântulas foram cultivadas neste sistema à temperatura ambiente, em baixa agitação, com fotoperíodo de 16 horas luz por 4 dias, em câmara de germinação do tipo BOD. Após este período, o meio de cultura foi substituído por meio MS fresco (macronutrientes orgânicos, como nitrato e aditivos orgânicos, como agar, açúcares, vitaminas e reguladores de crescimento) acrescido de 0,05% de sacarose, que serviu como primeira fonte de carbono para o desenvolvimento dos esporos do fungo, conforme metodologia de Rubio et al. (2012). Ao todo foram utilizados 60 frascos contendo as plantas que foram organizados em 2 grupos de tratamentos diferentes, constituindo as 2 condições para posterior análise: Condição co-cultivo (CC) na qual o fungo foi crescido na presença das raízes da planta; condição fungo (CF) onde o fungo foi crescido sozinho.

Todos frascos contendo apenas 50 mL de meio MS fresco foram inoculados com os esporos de *T. asperellum* (concentração final de $10^7/\text{mL}$). Após 48 e 72 horas da inoculação dos esporos, a planta foi cuidadosamente retirada, as raízes foram lavadas para coleta do micélio em associação com a raiz, o meio de cultura em seguida foi filtrado para obtenção do micélio. A massa micelial obtida foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada em ultrafreezer -80°C , sendo posteriormente utilizada para a extração de RNA total.

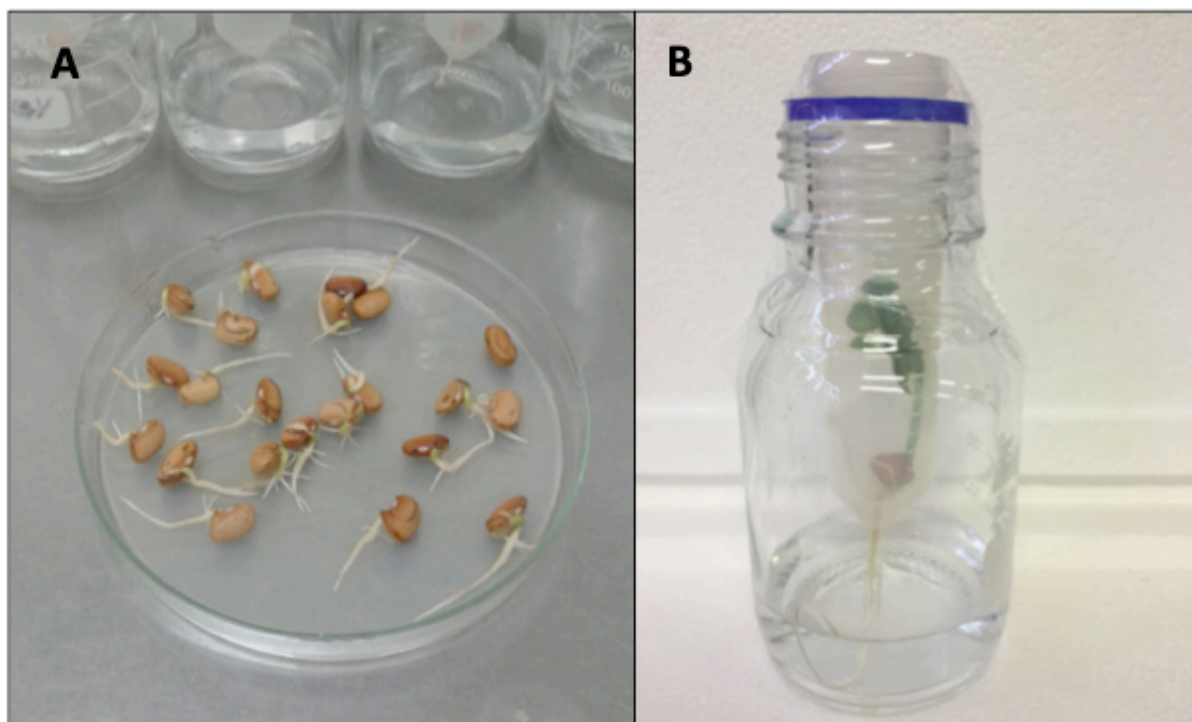


Figura 03. Sistema hidropônico utilizado para o co-cultivo de *T. asperellum* e *Phaseolus vulgaris*. Em **A**, plântulas formadas após 4 dias de germinação. Em **B**, estrutura utilizada no experimento de interação entre *Trichoderma*/planta.

2.1.5 SEQUENCIAMENTO RNA-SEQ

O RNA total dos micélios obtidos como acima descrito foi extraído utilizando o protocolo TRIzol® seguindo procedimento recomendado pelo fabricante (Invitrogen, CA). A quantidade e pureza dos RNAs totais foram estimada por análise da absorbância a 260nm, utilizando como padrão 1 unidade $A_{260}=40 \mu\text{g}$ de RNA, através de espectrofotômetro (Ultraspect® 2000 Pharmacia) e que usa o cálculo da razão A_{260}/A_{280} , que indica possíveis contaminações de RNA. A verificação quanto à integridade foi analisada pela empresa EUROFINS (Eurofins MWG Operon Kentucky, Louisville, Kentucky, USA) utilizando o aparelho Agilent 2100 Bioanalyzer.

As amostras de RNA total foram transportadas em RNAsstable (Biomátrica), de acordo com as instruções do fabricante. Após ressuspensão, a integridade do RNA foi avaliada utilizando sistema do Agilent 2100 Bioanalyzer e RNA LabChip® kit (Agilent Technologies).

A partir das amostras de RNA total foram desenvolvidas 8 bibliotecas de cDNA e o

sequenciamento foi realizado na mesma empresa acima citada, utilizando a tecnologia Illumina HiSeqTM2000 (<http://illumina.ucr.edu/ht/>) em apenas 1 *Lane*. Para a construção das bibliotecas de RNA foi utilizado o protocolo do Illumina TruSeq RNA Kit. Para o sequenciamento, os adaptadores foram ligados em ambas as extremidades dos fragmentos (*paired-ends*), permitindo o sequenciamento dos fragmentos em duas direções. As bibliotecas foram identificadas como “CF” para o experimento controle (fungo sozinho, ausência da planta hospedeira) e “CC” para o experimento de interação (fungo em contato com a planta hospedeira) com réplica biológica.

2.1.6 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA

Inicialmente, para o processamento dos dados de RNA-seq foi realizada a eliminação das regiões com baixa qualidade (*Phred* < 20) e adaptadores, utilizando o programa *Trimmomatic* versão 0.30. Sequências menores que 25 *pb* foram descartadas. O transcrito do fungo *T. asperellum* crescido em meio hidropônico na presença das raízes de *P. vulgaris* foi mapeado no genoma disponível no momento: *Trichoderma asperellum* TR356 v1.0 (<http://genome.jgi.doe.gov/Triasp1>) utilizando o programa *TopHat* 2.0.8 (Trapnell et al. 2009) nas configurações padrão.

Para a determinação dos valores de expressão gênica foi utilizado o programa *Cufflinks* 2.1.1 e os valores de FPKM (*Fragments per kilobase mapped*) foram calculados para cada gene. Os níveis de expressão comparativa foram obtidos utilizando o programa *CuffDiff* somente com sequências mapeadas uma única vez no genoma. Os perfis de expressão diferencial e agrupamentos foram analisados pelo *SOTA* (*Self Organizing Tree Algorithm*) utilizando o programa MeV 4.9.

Cada amostra de *T. asperellum* crescida em contato com as raízes de *P. vulgaris*, foi normalizada com seu respectivo controle crescido na ausência das raízes. Valores positivos de *Log²FC* (*fold change*) foram considerados induzidos (*up-regulated*) e valores negativos, reprimidos (*down-regulated*). Níveis de expressão diferencial foram considerados significantes utilizando *FDR* (*False Discovery Rate*) do teste de *Benjamini-Hochberg* ($P < 0.05$).

Todos os dados oriundos do RNA-seq foram utilizados para montagem do transcrito total utilizando o programa *Trinity* (Grabher et al. 2011), nas configurações

padrão. Para análise específica do conjunto de CAZymes, foi mapeado todas as proteínas de *T. asperellum* TR356 contra o banco de dados CAZy (<http://www.cazy.org/>) usando a ferramenta de busca BLASTp.

A anotação funcional usando os termos do *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org>) foi feita usando o *software Blast2GO* (Conesa and Götz 2008), que combina o GO (<http://geneontology.org/>), o BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e o Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>) bancos de dados e pesquisas de anotação de proteínas. A anotação das vias metabólicas foi feita usando o banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, <http://www.genome.jp/kegg>) utilizando o programa *Ipath3* (<https://pathways.embl.de>).

Para identificar possíveis proteínas de *T. asperellum* com ação efetora, um *Pipeline* foi projetado para prever suas características, tais como: (a) presença de um peptídeo sinal (SignalP4.0) (Bendtsen et al. 2004b; Petersen et al. 2011), (b) presença de domínios transmembrana (TMHMM v2.0) (Emanuelsson et al. 2007); (c) localização subcelular (TargetP 1.1) (Emanuelsson et al. 2000; Horton et al. 2007) e motivos de translocação que foi realizada manualmente. Sequências que não apresentavam características efetoras foram excluídas. Em todas as etapas que envolveram qualquer manipulação de arquivos foram utilizadas linhas de comando da linguagem Shell (Sistemas Unix – AWK e Join). Os gráficos apresentados foram construídos com o auxílio do pacote GGplot2 implementado no ambiente R.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1 ANÁLISE GLOBAL DA EXPRESSÃO GÊNICA BASEADA EM RNA-SEQ

É crucial entender os mecanismos utilizados pelos fungos antagonistas no processo de simbiose. A interação *Trichoderma asperellum*/feijoeiro, apesar de ser bem estudada em nível celular, ainda carece de trabalhos em nível molecular, que demonstre uma análise de forma global das particularidades dessa interação. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo compreender os mecanismos moleculares que regulam a interação *Trichoderma asperellum*/*Phaseolus vulgaris* em dois tempo distintos e utilizando o método de cultura em hidroponia.

Na busca de maior esclarecimento sobre essa simbiose, o perfil transcricional de *T. asperellum* TR356 foi analisado em dois tempos (48 e 72 horas) e em condições que mimetizam a interação utilizando o sistema de cultura em hidroponia. A iniciativa de analisar os transcritomas de *Trichoderma* surgiu através de um projeto intitulado “Aplicação e estudos moleculares do controle biológico de espécies de *Trichoderma* e de sua interação com os hospedeiros” desenvolvido por um consórcio de laboratórios da região Centro-Oeste do Brasil, com o principal objetivo de gerar informações sobre os transcritomas de *Trichoderma* spp.

O sistema de cultivo hidropônico usado para acompanhar a interação *Trichoderma*-raiz é representado na Figura 03. No momento da colheita, os micélios fúngico aderentes eram claramente visíveis nas raízes da planta hospedeira. Para comparação do transcritoma do fungo em interação com as raízes, *T. asperellum* também foi cultivado na ausência da planta nas mesmas condições.

A partir da análise de expressão diferencial dos genes identificados, foi possível estabelecer um modelo que pode melhor elucidar os mecanismos moleculares da interação entre *T. asperellum* e a planta hospedeira *Phaseolus vulgaris*, permitindo uma melhor compreensão dessa interação.

Neste estudo, para a análise de transcritoma, foi utilizada a técnica de RNA-seq a fim de avaliar os genes diferencialmente expressos (GDE) durante a interação entre *T. asperellum* TR356 e *Phaseolus vulgaris* em duas diferentes situações: crescimento das hifas na ausência

da planta hospedeira (controle) e crescimento das hifas na presença da planta hospedeira (co-cultivo). Durante o crescimento as análises foram realizadas após 48 e 72 horas de inoculação dos esporos no meio de cultura contendo as raízes do feijoeiro-comum. Nós definimos o tempo inicial de análise em 48 horas em virtude de resultados obtidos em pesquisas anteriores por colaboradores do nosso grupo de pesquisa, além de outros trabalhos, onde o resultado entre a interação só foi significativo após 48 horas. Esses dados corroboram com dados obtidos por Wu e colaboradores (2017), que não obtiveram resultados significativos em 24 e 36 horas de interação do *T. asperellum* com plantas hospedeiras. Visto também que o *Trichoderma* tem a capacidade de desenvolvimento e crescimento muito rápidos, assim como imediata secreção de enzimas e ajuste as condições do meio (Sunil et al. 2014) optamos por iniciar nossa análise em 48 horas de interação.

Como o genoma do *T. asperellum* já estava montado e anotado, ele foi utilizado para o mapeamento. Foram gerados, utilizando-se a plataforma HiSeq 2000, um total de 39.205.000 fragmentos da sequência (*reads paired ends*) de 100 pb das 8 bibliotecas. A cobertura total dos *reads* no genoma do *T. asperellum* foi de 33x, e a cobertura em relação às regiões codantes do DNA (CDS) foi de aproximadamente 54x. Em relação a qualidade média das bibliotecas, as bases com score de Phred Q30 (%) foi de 96%, o que garante um bom alinhamento e uma confiável análise de expressão diferencial.

Um total de 25.386 genes foram identificados no experimento de co-cultivo (48 e 72 horas), destes, foram identificados 6.817 genes diferencialmente expressos, mais precisamente 1.744 e 5.073 GDE para o período de 48 horas e 72 horas de interação fungo/planta respectivamente. Para ilustrar o perfil de expressão nos tempos citados, gráficos de *Scatter plot* foram gerados para uma comparação geral (Figura 04).

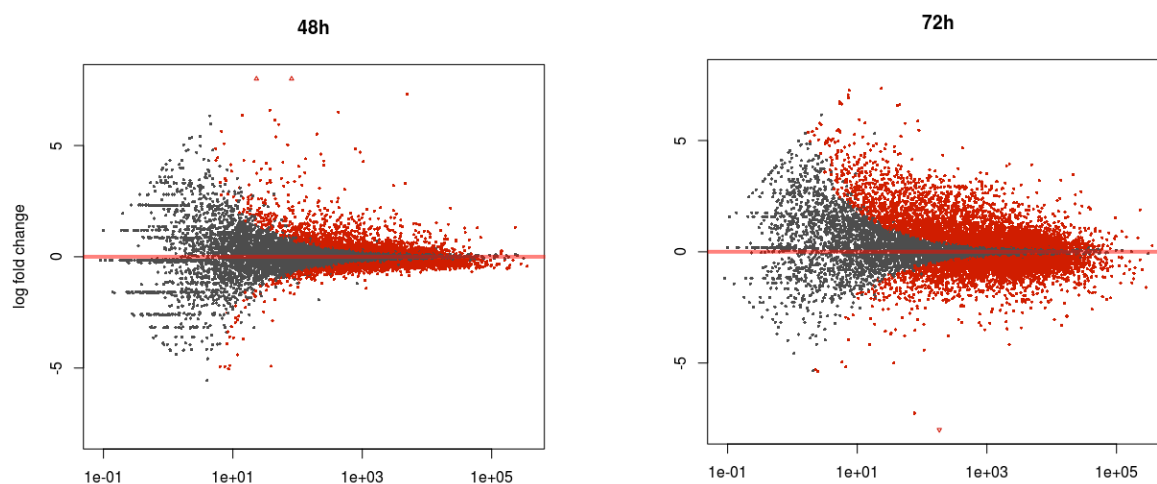


Figura 04. Comparação dos perfis de expressão gênica completa de *T. asperellum* TR356 na interação com *P. vulgaris*. Em 48 horas de interação com 1.744 genes diferencialmente expressos e em 72 horas de interação com 5.073 genes diferencialmente expressos mostrados em vermelho ($P < 0.05$). Em cinza é possível observar os genes que não foram diferencialmente expressos.

A Figura 05 é composta por um diagramas de Venn apresentando a quantidade de genes diferencialmente expresso em cada tempo. Observa-se que a quantidade de genes exclusivos do período 72 horas é maior que a intersecção e também o período 48 horas, sugerindo que cada período tem suas particularidades e requerem diferentes genes para a ação do fungo *T. asperellum*. Isso reflete na quantidade de genes induzidos e reprimidos para cada período analisado. Observa-se que a ativação e inativação da transcrição gênica são importantes ao decorrer do tempo de interação, onde um arsenal maior de genes são exigidos para o estabelecimento da simbiose.

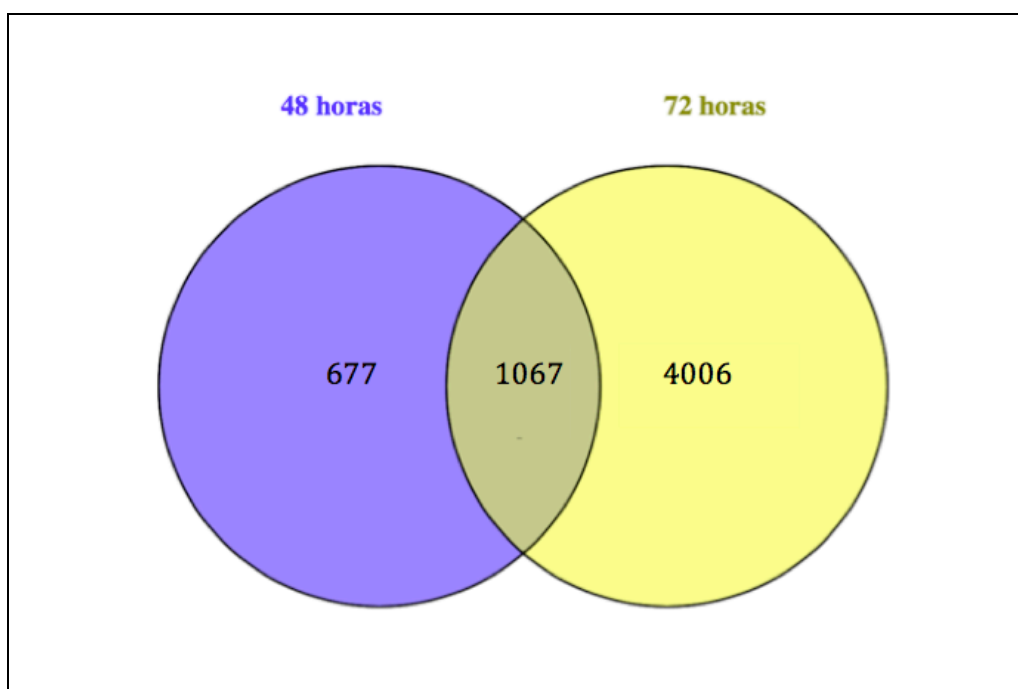


Figura 05. Diagrama de Venn dos 6.817 genes diferencialmente expressos. Nota-se que deste total 677 são GDE exclusivos do período de 48 horas, 4.006 são GDE exclusivos do período de 72 horas, e na interseção, 1067 genes comuns aos dois tempos de análise.

A Tabela 01 apresenta de forma detalhada o número de genes que foram reprimidos (*down-regulated*) e também genes que foram induzidos (*up-regulated*) para cada período da interação fungo/planta após análise somente dos genes exclusivos.

Tabela 01. Genes reprimidos (*down-regulated*) e induzidos (*up-regulated*) após 48 e 72 horas de interação. Na primeira parte da tabela é possível visualizar a quantidade de genes exclusivos de cada tempo, e na segunda parte todos os GDE reprimidos e induzidos.

GDE exclusivos	48 horas	72 horas
induzidos	330	2.153
reprimidos	347	1.853
Total	677	4.006
Todos os GDE	48 horas	72 horas
induzidos	839	2.665
reprimidos	905	2.408
Total	1.744	5.073

Algumas ferramentas de bioinformática são utilizadas para a análise de transcrito de fungos, tais como o GO: *Gene Ontology* (Ashburner et al. 2000), KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (Kanehisa et al. 2015) e KOG: *EuKaryotic Orthologous Groups* (Tatusov et al. 2003). Essas ferramentas permitem análises de categorização de proteínas quanto à sua função em experimentos de transcrito. Em genomas já anotados, essas ferramentas são bastante interessantes e permitem uma análise eficaz do transcrito. Entretanto, na análise de genomas de fungos tais ferramentas não são totalmente eficientes, visto que, cerca de 60% das proteínas preditas não possuem qualquer anotação, o que torna a sua análise prejudicada. Para evitar a geração de dados de anotação genéricas, utilizamos as anotações já realizadas para o genoma, de Proteases, Transportadores, SSCPs (*Small Secreted Cysteine-rich Proteins*) e CAZymes (*Carbohydrate-Active enZymes*).

A Figura 06 mostra a distribuição dessas anotações nas condições analisadas. Nota-se que houve um aumento das classes de proteínas em 72 horas após a inoculação comparadas ao período de 48 horas, apenas transportadores apresentaram uma diminuição não significativa em 72 horas de interação. A quantidade de classe de proteínas reprimidas relacionadas aos transportadores se manteve nos dois períodos. Houve um aumento significativo das CAZymes em 72 horas, assim como também houve uma diminuição na quantidade de genes reprimidos durante esse mesmo período. Foi observado também um aumento na quantidade de genes reprimidos para SSCPs em 72 horas, porém, houve um leve aumento na quantidade de genes induzidos dessa mesma classe de proteínas neste mesmo período.

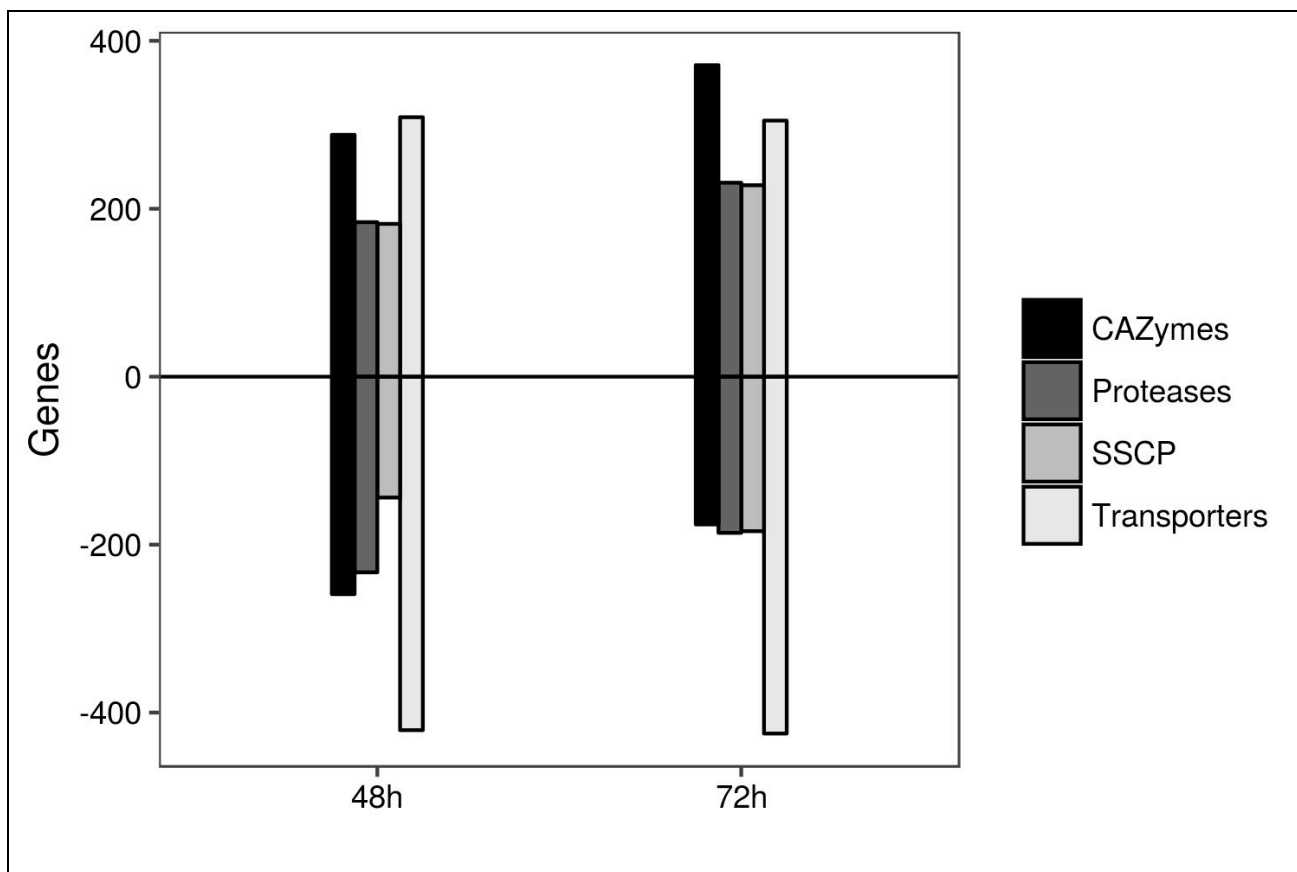


Figura 06. Quantidade de genes diferencialmente expressos categorizados como CAZymes, proteases, transportadores e pequenas proteínas secretadas e ricas em cisteínas (SSCPs). Os genes que foram induzidos estão representados nas barras positivas e os genes reprimidos estão representados nas barras negativas. As barras representam os períodos de análises: 48 e 72 horas.

É possível observar um aumento na quantidade de genes induzidos para proteases em 72 horas, assim como ocorre uma diminuição na quantidade de genes reprimidos (Figura 06). Estes resultados são esperados, visto que as proteases em fungos podem atuar na degradação da parede celular da planta e também na inativação ou inibição de algumas proteínas ligadas a resposta de defesa no vegetal (Bolton et al. 2006). As proteases também são produzidas quando ocorre uma produção de ácido oxálico e a consequente acidificação do meio (Bueno et al. 2012) o que também pode ter ocorrido no experimento de co-cultivo. Em trabalhos com o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* em interação com o feijoeiro-comum, foram demonstrados o envolvimento de proteases secretadas pelo patógeno no processo de invasão de *S. sclerotiorum* na planta hospedeira (Bueno et al. 2012) o que provavelmente ocorreu na interação entre o *T. asperellum* com as raízes do feijoeiro, permitindo a interação. As proteases também são responsáveis por desempenhar papéis fundamentais na lise celular do hospedeiro, degradando lipídios e proteínas pertencentes da parede celular, e a inativação de enzimas secretadas por outros organismos durante o processo de interação com a planta

(Hermosa et al. 2012; Vizcaíno et al. 2007). Rawlings e colaboradores (2012) sugerem que *Trichoderma* pode ter um dos maiores arsenais de proteases entre os fungos. Cerca de 20% das proteases de *Trichoderma* possuem um peptídeo sinal e, portanto, provavelmente são destinados a via de secreção.

Os nossos dados mostram também que a produção de genes anotados como transportadores se manteve elevado durante o dois períodos. Isso mostra que genes ligados a funções reguladoras são fundamentais no processo de interação. Essa super expressão de genes com função de transportadores foi encontrado nas análises de interação entre *T. virens* e as raízes de tomate e milho no trabalho de Moran-Diez e colaboradores (2015). Steindorff e colaboradores (2014) identificaram 30 genes diferencialmente expressos que codificam proteínas transportadoras em *T. harzianum*, segundo os autores, as permeases foram as proteínas mais abundantes entre as proteínas transportadoras identificadas no trabalho. As proteínas transportadoras em *Trichoderma*, principalmente as permeases, permitem o transporte de nutrientes e íons essenciais, além da excreção de produtos finais do metabolismo e da comunicação célula-ambiente (Chaudhary et al. 2017). Rubio e colaboradores (2012) afirmam que uma regulação positiva de genes com função de transportadores seria necessária para a troca de nutrientes entre o fungo e a planta. Genes com função de transportadores reprimidos também foram observados na interação *Trichoderma* com raízes de tomateiro, indicando que após a colonização das raízes pelas hifas, a absorção de nutrientes pelo *Trichoderma* é limitada, pelo menos numa fase inicial (Rubio et al. 2012).

Os genes que codificam para as SSCPs no genoma de *T. asperellum* foram identificados com base nos seguintes critérios: 300 aminoácidos ou menos, pelo menos quatro resíduos de cisteína e presença de peptídeo sinal para secreção (Horwitz et al. 2013; Kubicek et al. 2011). Alguns genes pertencentes a essa classe foram induzidos em interação com as raízes de feijoeiro (Figura 06). Duas hidrofobinas classe II foram identificadas em 48 horas (Triasp1/373058, Triasp1/403021 reprimidas) e 6 foram identificadas em 72 horas (Triasp1/464064, Triasp1/479303, Triasp1/373385, Triasp1/446180, Triasp1/403021 induzidas, Triasp1/373058 reprimida). Samolski et al. (2009) também identificou uma hidrofobina classe II que foi induzida por *T. harzianum* na presença de raízes de tomateiro. Przylucka e colaboradores (2017) observaram hidrofobinas que foram induzidas em *T. virens*, em interação com tomateiro. Sunil et al. (2014) identificou uma hidrofobina classe II durante a interação entre *T. viriens* com raízes de tomateiro contendo 8 resíduos de cisteína. Resultado semelhante foi identificado nas hidrofobinas classe II identificadas em nosso

trabalho, que contem uma média de 8 resíduos de cisteína na sua sequência. Viterbo & Chet (2006) relatam que as hidrofobinas são provavelmente as melhores SSCPs conhecidas, elas são encontradas nas superfícies exteriores das paredes das células da hifas e conídios, onde medeiam as interações entre o fungo e as raízes da planta.

Semelhante a este trabalho, um grande número de genes de hidrofobina reprimidos foi observado para *T. virens* T87 durante a interação com plantas de tomateiro usando uma análise de microarranjo, realizada por Rubio e colaboradores (2012), ao mesmo tempo que os efeitos negativos sobre o crescimento de plantas de tomate em culturas *in vitro* também foi causada por esse isolado. Isso pode indicar que, sob as condições experimentais de estudo, *T. virens* T87 teve uma fixação de raiz limitada, afetando sua interação com as plantas de tomate.

Observamos também a presença de 2 cerato-platanina em 48 horas (Triasp1/103587 induzida, Triasp1/465595 reprimida) e 2 cerato-platanina em 72 horas de interação (Triasp1/103587 induzida, Triasp1/465595 reprimida). Os genes da família cerato-platanina que codifica uma SSCP já foi descrito como indutor de resistência sistêmica em plantas (Djonovic et al. 2006; Frischmann et al. 2012). Genes da família cerato-platanina foram induzidos e identificados em *T. harzianum* por Samolski et al. (2009) na interação com tomateiro, o mesmo foi identificado por Djonovic et al. (2006) durante a interação entre *T. asperellum* com algodoeiro. Entretanto, Sunil et al. (2014) relatam que houve um aumento não significativo desses genes durante a interação entre *T. viriens* e tomateiro. A ação dessas proteínas como características efetoras será discutida no próximo capítulo deste trabalho.

2.2.2 ANÁLISE DE GENES ENVOLVIDOS NA DEGRADAÇÃO DE CARBOIDRATOS

Como foi visto na Figura 06, houve um aumento na produção das CAZymes em 72 horas, isso mostra que o fungo, ao decorrer do tempo, aumentou sua produção de genes envolvidos na degradação de carboidratos, como por exemplo de genes pertencentes as famílias de glicosil hidrolases. As famílias de proteínas na base de dados CAZymes estão agrupadas em cinco classes diferentes, são elas: glicosil hidrolases (GHs); glicosil-transferases (GTs); polissacarídeos liases (PLs); carboidrato esterases (CEs) e atividades auxiliares (AAs) (Ferreria Filho et al. 2017). Neste trabalho, genes para as glicosil hidrolases foram os mais abundantes quando comparado com as demais famílias de CAZymes, resultado

semelhante foi encontrado por Ferreria Filho e colaboradores (2017) em análise de transcrito de *T. harzianum*, *T. reesei*, *T. virens* e *T. atroviride*, demonstrando a importância dessas proteínas no processo de interação *Trichoderma/planta*. A Figura 07 apresenta o padrão de genes identificados para cada família CAZymes nesse trabalho, que foram induzidos ou reprimidos durante a interação.

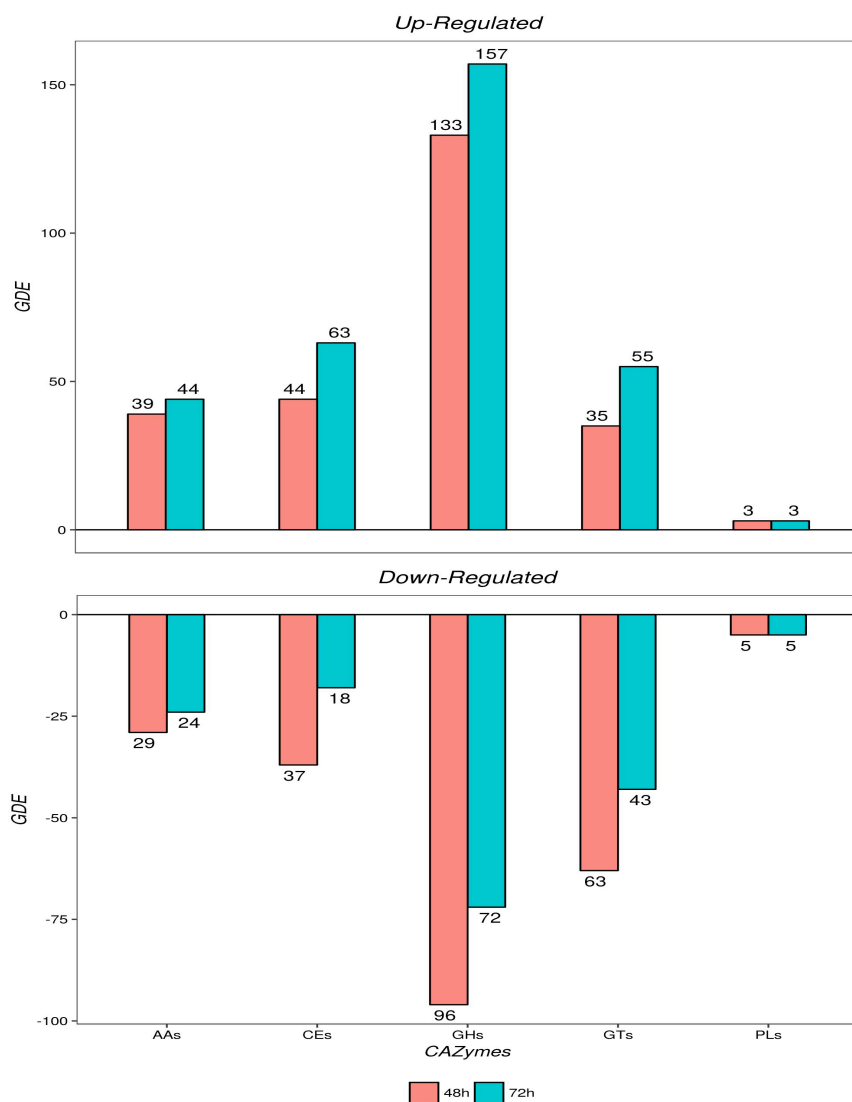


Figura 07. Número de GDEs identificados como parte das famílias CAZymes durante a interação entre *T. asperellum* e *P. vulgaris* em 48 e 72 horas após a inoculação. Na figura é possível visualizar os genes que foram induzidos (*up-regulated*) na parte superior e os genes que foram reprimidos (*down-regulated*) na parte inferior da figura. As 5 famílias CAZymes representadas são: atividades auxiliares (AAs); carboidrato esterases (CEs); glicosil hidrolases (GHs); glicosil-transferases (GTs) e polissacarídeos liases (PLs).

A identificação de genes codificadores de glicosil hidrolases aponta para uma função central na interação: a habilidade do *T. asperellum* em degradar as paredes das células da raiz do feijoeiro. Dados semelhantes foram observados por Morán-Diez e colaboradores (2015) em análise da interação entre *T. virens* durante a interação com as raízes de milho e tomate, onde, o número de genes de glicosil hidrolases foram significativamente maior durante o período de 72 horas. A habilidade do *Trichoderma* em degradar a parede celular da planta hospedeira é um importante mecanismo para que ocorra a simbiose. O aumento na quantidade de genes induzidos para as CAZymes é um sinal da ação do fungo no processo de interação.

Visto que existe uma extensa variedade de carboidratos na parede celular do feijoeiro, uma multiplicidade de enzimas é necessária para a degradação da parede e uma possível interação. As GHs são enzimas-chave na hidrólise de carboidratos, compondo o grupo de enzimas que clivam as ligações glicosídidas (ligações beta-1,4) entre as moléculas de glicose (De Castro et al. 2010). Em nosso trabalho, foram identificados 229 genes em *T. asperellum* que representam diversas famílias de GHs, destes, 133 e 157 demonstraram uma regulação positiva significativa em resposta às raízes do feijoeiro em 48 e 72 horas respectivamente. Todas as glicosil hidrolases foram agrupadas de acordo com as famílias de GH a partir da anotação (JGI), um total de 46 e 51 famílias GH foram identificadas como induzidas em 48 e 72 horas respectivamente. Foi observado também um total de 96 e 72 genes para GH que foram reprimidos para 48 e 72 horas respectivamente (Figura 07). As famílias de GHs foram a classe CAZyme com o maior número de genes expressos, incluindo GH3 (11 genes), GH16 (9 genes), GH18 (7 genes), GH31 (7 genes) e GH92 (7 genes) induzidos no tempo de 48 horas, e em 72 horas foram induzidos as famílias GH3 (13 genes), GH18 (11 genes), GH109 (10 genes), GH92 (7 genes), GH31 (7 genes). A Tabela 02 apresenta um top 10 das famílias de GH que tiveram uma maior indução durante a interação.

Tabela 02. Top 10 das famílias de glicosil hidrolases que tiveram uma maior expressão conforme valores de *Log²Fold Change*. Em negrito, observa-se as GHs que estão entre as mais expressas tanto em 48 quanto em 72 horas.

48 horas			72 horas			
Família GH	Principal atividade enzimática	<i>Log²Fold Change</i>	Família GH	Principal atividade enzimática	<i>Log²Fold Change</i>	
1	GH11	Endo-1,4- β -xylanase	5,94	GH3	β -glucosidase	5,94
2	GH18	Chitinase	4,86	GH55	Endo- β -1,3-glucanase	5,87
3	GH16	Xyloglucanase	4,28	GH79	β -glucuronidase	4,82
4	GH79	β -glucuronidase	4,15	GH10	β -glucosidase	4,77
5	GH93	Exo- α -L-1,5-arabinanase	3,99	GH51	Endo-1,4- β -xylanase	4,22
6	GH67	α -glucuronidase	3,58	GH62	α -L-arabinofuranosidase	4,05
7	GH10	Endo-1,4- β -xylanase	3,57	GH64	β -1,3-glucanase	3,90
8	GH64	β -1,3-glucanase	2,73	GH18	Chitinase	3,79
9	GH3	β -glucosidase	2,68	GH67	α -glucuronidase	3,71
10	GH92	Mannosyl-oligosaccharide α -1,2-mannosidase	2,32	GH76	α -1,6-mannanase	3,24

Na Tabela 02 é possível observar que 6 famílias de GH estão presentes nos dois tempos de análise, famílias GH 3, 10, 18, 64, 67 e 79 (destacados na Tabela em negrito), nota-se que todas as 6 famílias apresentaram uma maior indução em 72 horas quando comparado a 48 horas, indicando que o fungo necessita de um maior arsenal de enzimas hidrolíticas ao decorrer tempo, possivelmente para possibilitar uma simbiose ainda mais bem-sucedida. Foram identificadas outras famílias de hidrolases nos dois tempos de interação, membros das 3 classes de hidrolases identificadas neste trabalho, tais como, endoglucanases (GH51, GH55), Exocelulases (GH1 e GH3 – glucanohidrolases) e β -glucosidases (GH1, GH3, GH30 e GH43).

As endoglucanases (GH51, GH55) identificadas neste estudo como as mais expressas (Tabela 2) tem como substrato natural a celulose e xiloglicana presentes na parede celular vegetal, apresentando também especificidade sobre a carboximetilcelulose (CMC), β -glucana

e xilana. Estas enzimas catalisam a hidrólise interna de ligações β -1,4-D-glucosídicas da celulose. Podendo, também, hidrolisar ligações β -1,4 em D-glucanas que contenham ligações β -1,3 (Tomme et al. 1988). As exocelulases (GH1 e GH3 – glucanohidrolases) atuam nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia de celulose e celotetraose liberando majoritariamente celobiose, além de glicose e celotriose (Bischoff et al. 2006). E por fim as β -glicosidases (GH1, GH3, GH30 e GH43), conhecidas por atuarem no remodelamento da parede celular vegetal a partir da hidrólise da celulose, estas enzimas são responsáveis pela hidrólise da celobiose liberada no meio, pela ação das celobiohidrolases, em moléculas de glucose (Nummi et al. 1983).

Neste estudo, as famílias GH18 (representada principalmente pelas proteínas quitinase-like) e GH3 (que inclui enzimas importantes do processo de degradação de celulose - β -glicosidase) estão entre as famílias mais expressas por *T. asperellum* (Tabela 02). Resultado semelhante foi encontrado por Ferreira filho e colaboradores (2017), onde famílias GH18 e GH3 foram as mais expressas por 4 isolados de *Trichoderma* estudados (*T. harzianum*, *T. reesei*, *T. virens* e *T. atroviride*). Segundo os autores, a família GH18, cujos membros são principalmente envolvidos na degradação de quitina, é uma família importante tanto biologicamente, quanto economicamente, uma vez que são aplicados também no controle biológico. A indução de genes da família GH18 podem indicar uma constante autólise das células miceliais (Brunner et al. 2003), provavelmente favorecendo o desenvolvimento das hifas. Dubey e colaboradores (2012) afirmam que a presença da família GH18, é um indicativo de processos metabólicos envolvendo a glicosilação de proteínas intracelulares e hidrólise de oligossacarídeos provenientes de glicoproteínas externas (Dubey et al. 2012).

Em 48 horas, a família GH11 foi a mais expressa. Essa família inclui genes para expressão de xilanases, o que representa um resultado positivo e promissor, visto que esses genes, já identificados em outros isolados de *Trichoderma* são considerados bons candidatos a indução de resistência em plantas pelo aumento da resistência das plantas contra patógenos, devido a indução de necrose tecidual provocado pelas xilanases (Wo et al. 2017). Estudos revelaram que a xilanase tem um duplo papel durante a colonização das plantas, envolvendo tanto a atividade das enzimas líticas quanto a indução de resistência sistêmica em cultivares específicos de tabaco e tomate (Rotblat et al. 2002; Ron & Avni, 2004).

A presença de uma endopoligalacturonase (família GH28) em 48 e 72 horas era esperada, visto que as paredes das dicotiledôneas como o feijão, são mais ricas em pectina

(Caffall et al. 2009). Esse padrão foi encontrado por Morán-Diez e colaboradores (2015) durante a interação entre *T. viriens* e raízes de tomateiro, com uma expressão mais elevada do que em milho (uma monocotiledônea). Um ortólogo do gene da família GH28 foi identificado em *T. harzianum*, conhecido como ThPG1. O silenciamento de ThPG1 em *T. harzianum* mostrou que esse gene é necessário para a colonização de raízes de *Arabidopsis* (Moran-Diez et al. 2009), o que provavelmente ocorre em *T. asperellum* e feijoeiro.

Vários estudos anteriores descrevem o conteúdo de CAZymes em fungos (Häkkinen et al. 2012; Benoit et al. 2015), bactérias (Manzo et al. 2011; Berlemont & Martiny, 2013) e plantas (Tyler et al. 2010; Pinard et al. 2015). Nós identificamos um grande número de CAZymes em *T. asperellum* com uma elevada diversidade de famílias (229 genes e 51 famílias). Estes resultados demonstram a importância e complexidade do sistema envolvido no remodelamento da parede celular vegetal que foi desenvolvida nestes fungos ao longo do tempo evolutivo (Xie et al. 2014), o que demonstra a sua habilidade na interação com diversos vegetais. Horta e colaboradores (2014) determinaram o perfil do transcrito de *T. harzianum* durante a degradação da biomassa e grupos delimitados de genes induzidos de CAZymes, e Santos e colaboradores (2016) expressaram heterologicamente a GH1 (beta-glicosidase) de *T. harzianum* em *Escherichia coli* e caracterizaram sua estrutura e função. Os trabalhos de investigação das CAZymes em *Trichoderma* são voltados para a ação dessas enzimas no micoparasitismo, carecendo de informações sobre o conjunto enzimático de CAZymes que é modulado durante a interação com raízes de planta.

Morán-Diez e colaboradores (2015) afirmam que a expressão de membros da família GH está relacionada com a composição da parede celular hospedeira, e é necessário que essas proteínas sejam conhecidas, além do nível do transcrito. Conhecer quando e onde cada CAZyme é expressa no tecido radicular também é importante. Nosso trabalho revelou que algumas famílias específicas de GH foram reguladas negativamente (Figura 07), estas enzimas são importantes na ação degradativa de células fúngicas, este resultado indica que provavelmente seja uma adaptação do fungo na obtenção de uma simbiose bem sucedida com a planta hospedeira, ao invés de um hospedeiro fúngico.

2.2.3 ANÁLISE DE GENES GENES ASSOCIADOS COM ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Um grupo de proteínas pouco discutido e que apresenta papel fundamental na interação fungo-planta são as proteínas com ação antioxidantes. A variação oxidativa do meio é um dos eventos mais críticos no reconhecimento planta-patógeno (Heller e Tudzynski, 2011). Essa reação é ativada por uma rápida secreção de espécies reativas de oxigênio (EROs) no apoplasto, como por exemplo o peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, que também estão envolvidos na sinalização de resposta de defesa em plantas. As EROs podem atuar no fortalecimento da parede celular vegetal (Nogueira-lopez et al. 2018), podendo ser tóxicas em grande quantidade, o que pode ser prejudicial as células fúngicas (Nanda et al. 2010; Marschall & Tudzynski, 2016). Antioxidantes podem proteger as células do dano oxidativo ao eliminar as espécies reativas de oxigênio (Nogueira-lopez et al. 2018). A homeostase redox da célula é importante para manter a interação entre o fungo e planta (Marschall & Tudzynski, 2016).

Recentemente, uma análise do transcrito de *T. asperellum* submetido ao estresse provocado por uma grande concentração de cobre foi realizado por Mei e colaboradores (2018), os autores identificaram 7 genes de enzimas relacionadas a ação antioxidante, sendo 1 catalase, 5 peroxidases e 1 superóxido dismutase (*cooper and zinc superóxido dismutase*).

Neste estudo, foram identificadas proteínas no transcrito de *T. asperellum* TR356 que atuam como enzimas antioxidantes, permitindo uma interação mais eficiente entre o *Trichoderma* e o feijoeiro-comum. A enzima superóxido dismutase (Triasp1/50106) foi identificada como induzida no tempo de 72 horas. Essa enzima está envolvida na quebra de moléculas de EROs e estabelece a integridade das células fúngicas (Nogueira-lopez et al. 2018), esta enzima foi relatada como molécula essencial durante a interação fungo-planta (Zhang et al. 2011). A proteína catalase-peroxidase (Triasp1/473954) foi identificada em 48 e 72 horas de interação, entretanto, sua presença também foi notada no controle (fungo na ausência da planta), portanto, essa proteína não foi considerada diferencialmente expressa. A enzima catalase-peroxidase exibe atividade de catalase e peroxidase, fornecendo proteção contra o estresse oxidativo. No fungo *M. Oryzae*, a secreção de catalase-peroxidase confere resistência ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) acumulado nas células vegetais do arroz (Tanabe et al. 2011). Um dado surpreendente foi a quantidade de proteínas induzidas do tipo nucleído-dissulfeto-óxido-redutase, que possui atividade antioxidante. Foram encontradas 10 proteínas induzidas no período de 48 horas (Triasp1/475993, 441819, 442174, 440845,

471567, 460906, 391965, 371180, 372709 e 376476) e 6 proteínas induzidas em 72 horas (Triasp1/446748, 394949, 442174, 465469, 98601 e 436395) (Tabela 03). Todas essas proteínas antioxidantes foram identificada no secretoma de *T. asperellum* e estão relacionadas com a inativação de EROs durante a interação fungo-planta, e provavelmente atuam como indutoras de resistência em feijoeiro.

Tabela 03. Expressão de GDE associados com proteínas antioxidantes induzidos durante a interação *T. asperellum* TR356/*P. vulgaris*.

<i>Time</i>	<i>Gene ID</i>	<i>Log2 (FC)</i>	<i>P_value</i>	<i>Annotation</i>
48 h	Triasp1/475993	0,708027	0,0017	nucleido-dissulfeto-oxido-redutase
48 h	Triasp1/441819	0,627297	0,00335	nucleido-dissulfeto-oxido-redutase
48 h	Triasp1/442174	0,622863	0,0003	nucleido-dissulfeto-oxido-redutase
48 h	Triasp1/440845	0,598859	0,00005	nucleido-dissulfeto-oxido-redutase
48 h	Triasp1/471567	0,59326	0,00005	nucleido-dissulfeto-oxido-redutase
48 h	Triasp1/460906	0,512847	0,00365	nucleido-dissulfeto-oxido-redutase
48 h	Triasp1/391965	0,38976	0,0004	nucleido-dissulfeto-oxido-redutase
48 h	Triasp1/371180	0,411513	0,0002	nucleido-dissulfeto-oxido-redutase
48 h	Triasp1/372709	0,395801	0,00095	nucleido-dissulfeto-oxido-redutase
48 h	Triasp1/376476	0,285428	0,0186	nucleido-dissulfeto-oxido-redutase
72 h	Triasp1/446748	1,48607	0,0003	nucleido-dissulfeto-oxido-redutase
72 h	Triasp1/394949	1,1705	0,00005	nucleido-dissulfeto-oxido-redutase
72 h	Triasp1/442174	0,653743	0,0156	nucleido-dissulfeto-oxido-redutase
72 h	Triasp1/465469	0,581722	0,0003	nucleido-dissulfeto-oxido-redutase
72 h	Triasp1/98601	0,483013	0,00315	nucleido-dissulfeto-oxido-redutase
72 h	Triasp1/436395	0,379075	0,0026	nucleido-dissulfeto-oxido-redutase
72 h	Triasp1/50106	1,8557	0,00005	superóxido dismutase

2.2.4 ANÁLISE DE GENES DE PROTEÍNAS COM DOMÍNIO WSC

Múltiplas proteínas contendo um componente de resposta ao estresse da parede celular (*cell wall stress-responsive componente* - WSC) foram identificadas nos genomas do *Trichoderma* (Mendoza-Mendoza et al. 2017). Proteínas com um único domínio WSC atuam na superfície externa da parede celular fúngica, auxiliando no suporte as tensões e integridade da parede. Essas proteínas são necessárias para uma tolerância múltipla em fungos contra as proteínas de defesa da planta (Levin, 2005; Klis et al. 2002). Nós identificamos duas proteínas induzidas com domínio WSC, uma em 48 horas (Triasp/463119) e uma em 72 horas (Triasp/196240) (Tabela 04). Os membros da família WSC tem como característica um domínio WSC e um peptídeo sinal N-terminal (Straede & Heinisch, 2007). O domínio WSC também é um domínio rico em cisteína, contendo oito cisteínas conservadas (Futagami et al. 2011).

Proteínas com domínio WSC secretada pelo fungo benéfico *Piriformospora indica*, foi identificada como um supressor eficiente das moléculas de defesa em diferentes hospedeiros vegetais, alterando a composição e as propriedades da parede celular do fungo (Rovenich et al. 2016; Wawra et al. 2016). As proteínas contendo o domínio WSC também foram caracterizadas em alguns fungos filamentosos, como *Aspergillus nidulans* (Futagami et al. 2011), *Aspergillus fumigatus* (Dichtl et al. 2012), e *Neurospora crassa* (Maddi et al. 2012).

Em *Beauveria bassiana* algumas proteínas contendo domínios WSC estão diferentemente envolvidas no aumento da resistência celular à perturbação da parede celular (Tong et al. 2016). Durante a colonização da planta, algumas condições de estresse precisam ser toleradas pelo *Trichoderma*. Se a WSC está implicada na resposta de resistência ou está diretamente envolvida na supressão imunológica da planta, precisa ser explorada (Mendoza-Mendoza et al. 2017). Novos estudos seriam necessários para o entendimento da função dessas proteínas em *Trichoderma*, e sua possível ação como efetora.

Tabela 04. Expressão de GDE associados com proteínas que apresentam domínio WSC induzidos durante a interação *T. asperellum* TR356/*P. vulgaris*.

<i>Time</i>	<i>Gene ID</i>	<i>Log2 (FC)</i>	<i>P_value</i>
48 h	Triasp1/463119	0,307479	0,01145
72 h	Triasp1/196240	0,408022	0,0058

2.2.5 ANÁLISE DE GENES DE *HEAT SHOCK PROTEINS* (HSPs)

As *Heat Shock Proteins* (HSPs) são divididas em proteínas de alto peso molecular, incluindo as famílias Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 e proteínas de baixo peso molecular, incluindo a família Hsp20 ou pequenas proteínas de choque térmico (sHSPs) (Sarkar et al. 2009). Foi relatado que as HSPs são geradas sob múltiplas condições de estresse e participam no reparo e degradação de proteínas danificadas pelo estresse, bem como no dobramento, transporte e montagem de novas cadeias peptídicas sintetizadas (Chai et al. 1999; Mei et al. 2018).

Identificamos 2 genes induzidos responsáveis por proteínas do tipo *Heat Shock Protein* de *T. asperellum* TR356 em 48 horas de interação (Triasp1/161012 e Triasp1/448939), o número de gene ligados as proteínas *Heat Shock* induzidos foi superior em 72 horas de interação, com um total de 12 genes (Triasp1/161012, Triasp1/60305, Triasp1/92630, Triasp1/384163, Triasp1/417973, Triasp1/192072, Triasp1/509712, Triasp1/444454, Triasp1/447355, Triasp1/76390, Triasp1/383878 e Triasp1/388182) (Tabela 05).

As Hsps também estão envolvidas na estabilização de substratos biológicos e na degradação de polipeptídeos, bem como na regulação de mecanismos de transcrição, *splicing* e tradução (Bukau et al. 2006). A resposta dos genes Hsp dos fungos de biocontrole ao estresse tem sido investigada. O aumento da expressão de Hsp23 em *T. virens* T59 foi encontrado quando o fungo foi cultivado em temperaturas extremas. Alta expressão também foi observada quando o fungo foi cultivado em 10% de etanol por 4 horas (Montero-Barrientos et al. 2007). Em *T. harzianum*, os níveis de expressão de Hsp70 foram superiores aos do controle sob estresse de calor e sal, aumentando a sua tolerância. Além disso, a massa micelial do fungo foi maior que a do controle *T. harzianum* sob estresse térmico, salino, osmótico e oxidativo, indicando que a indução de Hsp70 aumentou a resistência de *T. harzianum* ao calor e outros estresses abióticos (Montero-Barrientos et al. 2008).

Estes resultados sugerem que as HSPs de *T. asperellum* podem estar envolvidas no controle de proteínas e substâncias diversas durante a interação com *P. vulgaris* em meio hidropônico, provavelmente controlando fatores que levam ao stresse do fungo durante a realização do experimento.

Tabela 05. Expressão de GDE associados com *Heat Shock Proteins* (HSPs) induzidos durante a interação *T. asperellum* TR356/*P. vulgaris*.

<i>Time</i>	<i>Gene ID</i>	<i>log2 (FC)</i>	<i>P value</i>	<i>Annotation</i>
48 h	Triasp1 161012	0,2939	0,015	<i>Heat shock protein Hsp40</i>
48 h	Triasp1 448939	0,403815	0,0009	<i>Heat shock protein Hsp40</i>
72 h	Triasp1 161012	1,35437	0,00005	<i>Heat shock protein Hsp40</i>
72 h	Triasp1 60305	1,30986	0,00005	<i>Heat shock protein Hsp40</i>
72 h	Triasp1 92630	1,17704	0,00005	<i>Heat shock protein Hsp40</i>
72 h	Triasp1 384163	0,89076	0,00005	<i>Heat shock protein Hsp40</i>
72 h	Triasp1 417973	0,671725	0,00005	<i>Heat shock protein Hsp40</i>
72 h	Triasp1 192072	0,59421	0,00005	<i>Heat shock protein Hsp40</i>
72 h	Triasp1 509712	0,553583	0,00005	<i>Heat shock protein Hsp40</i>
72 h	Triasp1 444454	1,39941	0,00005	<i>Heat shock protein Hsp20</i>
72 h	Triasp1 447355	1,38233	0,00005	<i>Heat shock protein Hsp20</i>
72 h	Triasp1 76390	1,4593	0,00005	<i>Heat shock protein Hsp70</i>
72 h	Triasp1 383878	1,18315	0,00005	<i>Heat shock protein Hsp70</i>
72 h	Triasp1 388182	0,34047	0,006	<i>Heat shock protein Hsp70</i>

2.2.6 ANÁLISE DE CATEGORIZAÇÃO FUNCIONAL E VIAS METABÓLICAS

Utilizando-se dos 677 e 4006 genes diferencialmente expressos e exclusivos para 48 e 72 horas respectivamente, e também dos 1744 e 5073 genes diferencialmente expressos totais de 48 e 72 horas respectivamente, foi realizada uma análise de categorização funcional usando os termos do *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org>), a fim de permitir a interpretação funcional dos dados experimentais usando o GO, por meio de análise de enriquecimento com a ferramenta *BLAST2GO* (Conesa & Gotz 2008). Esta anotação foi distribuída em três categorias funcionais (Componente Celular, Função Molecular e Processos Biológicos). Alguns genes foram anotados em duas ou mais categorias, sendo a categoria Função Molecular a mais representada com 372 e 2591 anotações para os GDE exclusivos de 48 e 72 horas respectivamente, seguida da categoria Processo Biológico com 211 e 1381 (48 e 72 horas respectivamente) e, por último, a categoria menos representada, Componente Celular, com 143 e 884 anotações (48 e 72 horas respectivamente).

Em 48 horas de interação, ao analisarmos a categorização funcional dos genes exclusivos deste período, na categoria Função Molecular, os termos “atividade catalítica” e

“ligação ao zinco” foram as mais representadas com 60 e 39 genes, respectivamente (Figura 08), demonstrando provavelmente uma ação na atividade reguladora do fungo durante a interação. É possível observar também termos relacionados com a interação fungo/planta como “atividade transportadora”, “hidrolases” e “quinases”.

Para a categoria Componente Celular, “proteínas integrais de membrana”, “núcleos” e “membrana”, foram os termos mais representados com 41, 37 e 25 genes, respectivamente (Figura 08).

E, na categoria Processos Biológicos, os termos mais representados foram “processos metabólicos”, “transporte” e “transporte de elétrons” com 64, 39 e 29 genes, respectivamente (Figura 08).

Em geral, na análise de 48 horas, observamos termos bem representados envolvidos com o Metabolismo Secundário (*FAD binding*, *ATP binding*, *binding* e *DNA binding*), Transportadores (*ABC transporter*), Fatores de transcrição, além de termos ligados ao Metabolismo de carboidratos, o que pode representar genes envolvidos com o remodelamento da parede celular, além de termos ligadas a proteases (*Proteolysis*, *serine activity*).

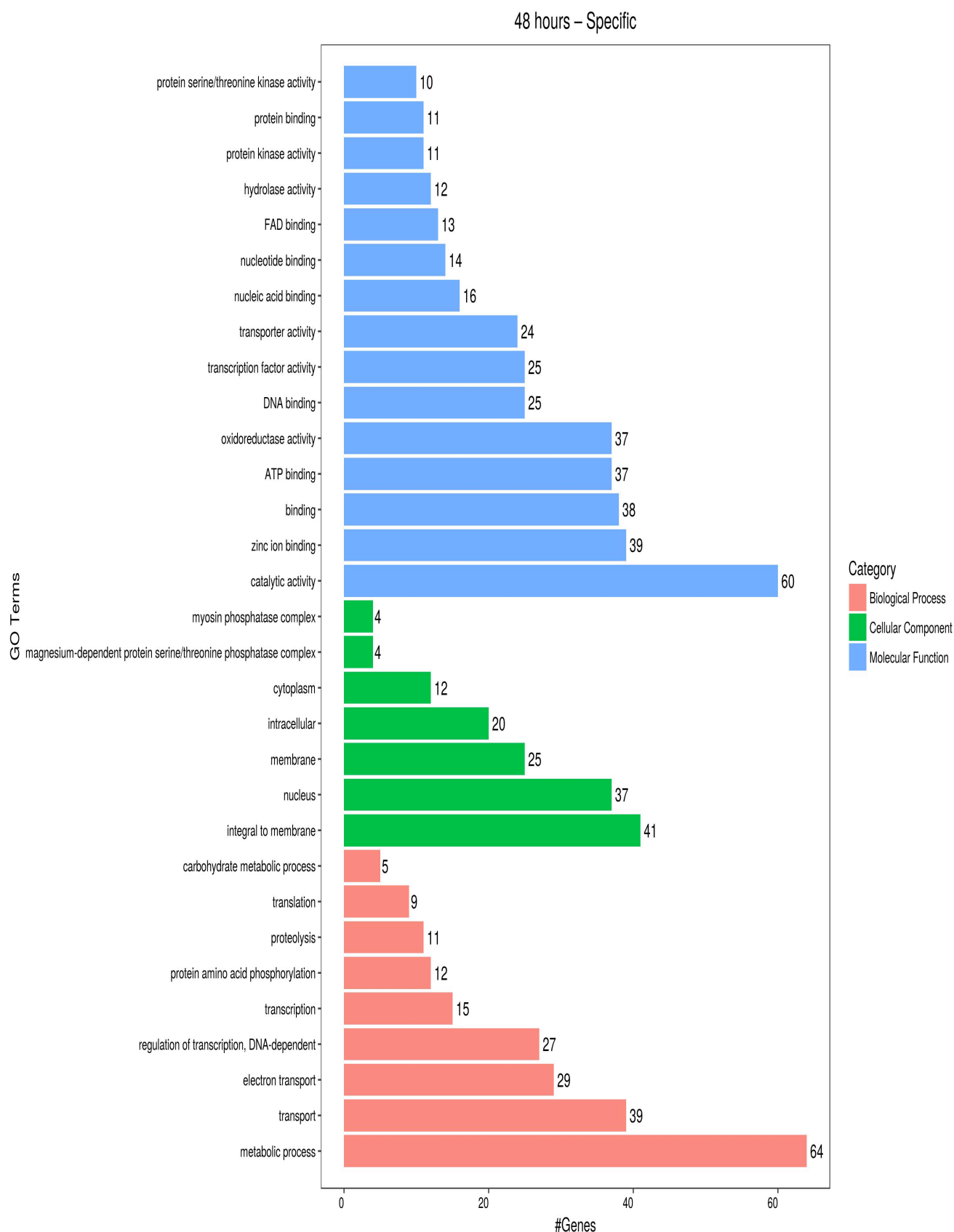


Figura 08. Resultado da análise de categorização funcional dos genes encontradas no genoma de *T. asperellum* TR356 em 48 horas, que apresentaram similaridade significativa ($e\text{-value} < 10^{-5}$) com as sequências de proteínas depositadas nos bancos de dados (NCBI/UNIPROT), utilizando o *software* BLAST2GO. No eixo y estão os termos do GO e no eixo x estão os números de genes encontrados para cada termo de GO em cada categoria.

Em 72 horas de interação, ao analisarmos a categorização funcional dos genes exclusivos deste período, na categoria Função Molecular, os termos “ligação ao zinco”, “atividade catalítica” e “ligação ao ATP” foram os mais representados com 309, 298 e 201 genes, respectivamente (Figura 09). É possível observar também proteínas relacionadas com a interação fungo/planta como “atividade transportadora”, “hidrolases” e “kinases”.

Para a categoria Componente Celular, “proteínas integrais de membrana”, “núcleos” e “membrana”, foram os termos mais representados com 269, 186 e 159 genes, respectivamente (Figura 09). Esses termos são semelhantes aos encontrados em 48 horas, porém, com um número maior de genes em cada termo, apontando que, houve um aumento na expressão de determinados genes já presentes no período inicial ao longo da interação.

Na categoria Processos biológicos, os termos mais representados foram “processos metabólicos”, “regulação da transcrição” e “transporte”, com 317, 196 e 177 genes, respectivamente (Figura 09).

Observamos que em 72 horas as categorias não mudaram tanto comparado com 48 horas, o que muda é a adição de mais algumas categorias com algumas funções semelhantes, como metabolismo secundário (*Zinc ion binding*, *heme binding*, *GTP binding*, *FAD binding*, *calcium ion binding* e *iron binding*), transporte (*vesicle-mediated transport*, ABC transporter) o que pode indicar um maior metabolismo ligado a formação de vesículas de secreção, além de um maior número de categorias ligadas as proteases e CAZymes. Esse aumento no número de categorias está diretamente ligado ao aumento do número de genes diferencialmente expressos em 72 horas, o que indica um maior esforço do fungo no processo de simbiose durante esse período.

Em *Trichoderma*, a presença dos transportadores ABC, tem sido associado a indução de resistência em plantas, por serem fator chave na interação múltipla estabelecida pelo *Trichoderma* com outros microrganismos em um ambiente tóxico ou antagônico, com rápida degradação de compostos fenólicos liberados pelas plantas. Na interação, ocorre uma massiva modificação no transcrito e metabolismo vegetal, elevando as concentrações de compostos antimicrobianos, propiciando a resistência do vegetal (Harman et al. 2008; Brotman; Gupta et al. 2010).

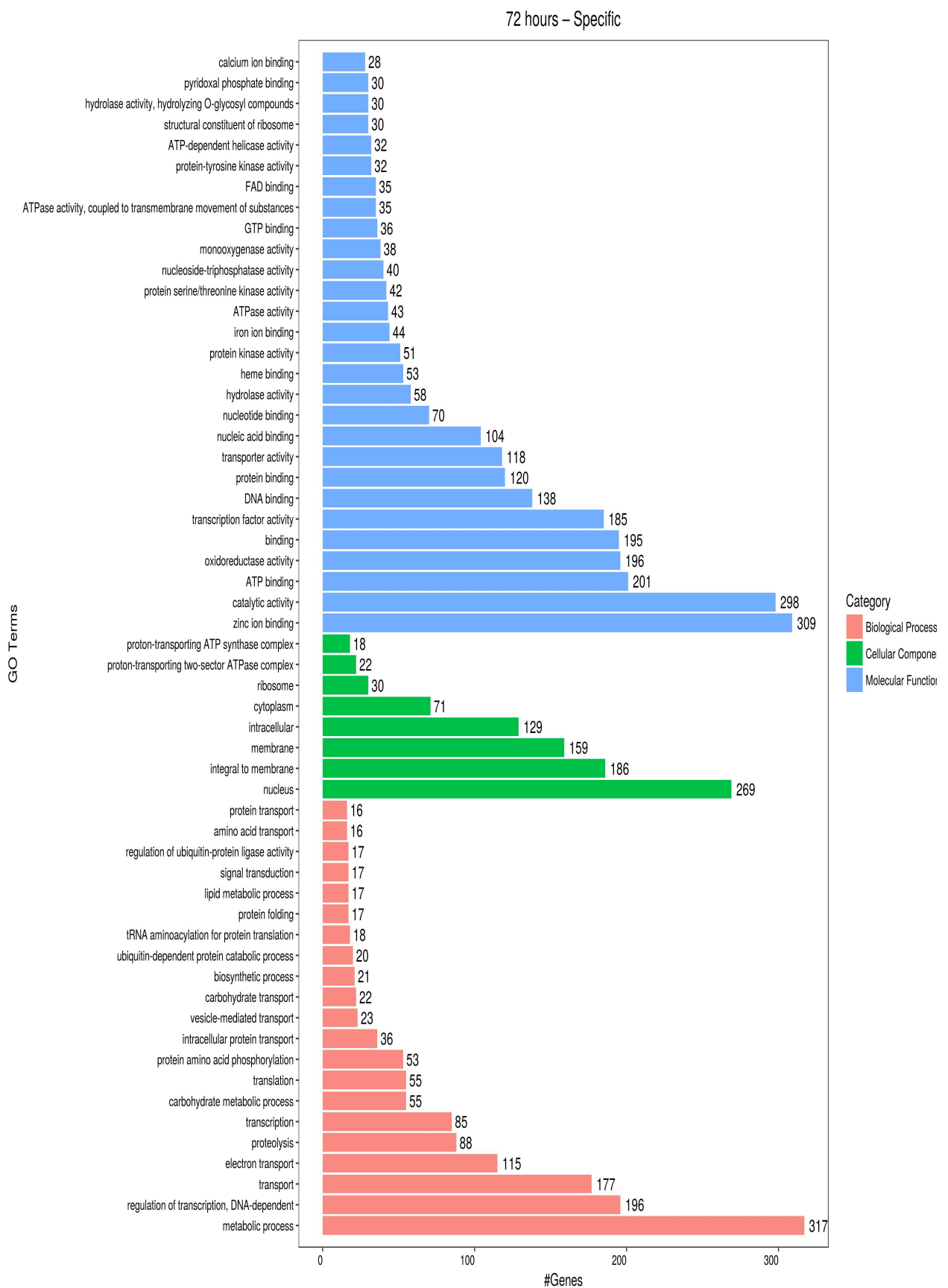


Figura 09. Resultado da análise de categorização funcional dos genes encontrados no genoma de *T. asperellum* TR356 em 72 horas, que apresentaram similaridade significativa ($e\text{-value} < 10^{-5}$) com as sequências de proteínas depositadas nos bancos de dados (NCBI/UNIPROT), utilizando o *software* BLAST2GO. No eixo y estão os termos do GO e no eixo x estão os números de genes encontrados para cada termo de GO em cada categoria.

Analisando a categorização funcional dos genes comuns aos dois períodos de interação, na categoria Função Molecular, os termos “atividade catalítica”, “atividade de oxidoreductase” e “ligação ao zinco” foram os mais representados com 102, 67 e 61 genes, respectivamente (Figura 10). Estão presentes também categorias importantes como “atividade de hidrolases” e “atividade de transporte”.

Na categoria Componente Celular, “proteínas integrais de membrana”, “núcleos” e “membrana”, foram os termos novamente mais representados com 61, 53 e 52 genes, respectivamente (Figura 10). Esses termos são semelhantes ao encontrados em 48 e 72 horas para GDE exclusivos de cada período.

Em Processos Biológicos, os termos mais representados foram “processos metabólicos”, “regulação da transcrição” e “transporte”, novamente se repetem, com 111, 57 e 45 genes, respectivamente (Figura 10).

48 and 72 hours – Common

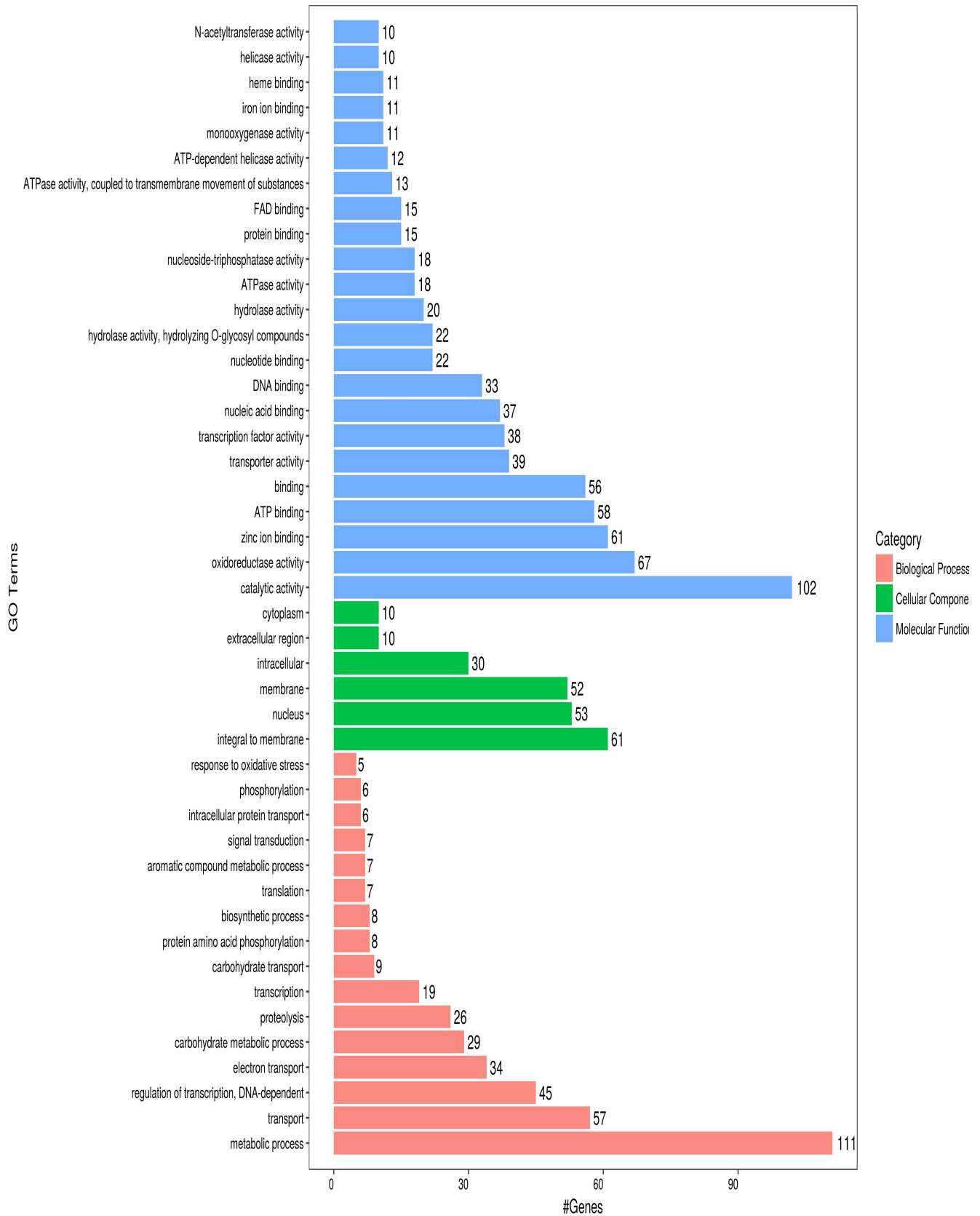


Figura 10. Resultado da análise de categorização funcional dos genes encontradas no genoma de *T. asperellum* TR356 em 48 e 72 horas, que apresentaram similaridade significativa ($e\text{-value} < 10^{-5}$) com as sequências de proteínas depositadas nos bancos de dados (NCBI/UNIPROT), utilizando o *software* BLAST2GO. No eixo y estão os termos do GO e no eixo x estão os números de genes encontrados para cada termo de GO em cada categoria.

Observamos que as categorias “metabolismo de carboidratos” e “transporte” estão presentes em todas as análises de categorização funcional, sejam elas dos genes exclusivos ou geral para cada tempo (48 ou 72 horas), resultado esse que poderia indicar uma adaptação ativa do fungo *T. asperellum* para o nicho rizosfera (Rubio et al. 2012). Resultado semelhante foi observado por Rubio e colaboradores (2012) ao analisar a interação entre 3 isolados de *Trichoderma* com raízes de tomateiro pelo sistema de hidroponia.

Categorias relacionadas a “membrana”, “núcleo” e “citoplasma” podem refletir a atividade mitótica intensa do fungo no início e durante a colonização das raízes, além da diferenciação de células (Felts & Toft, 2003). Categorias ligadas a “regulação da transcrição” e “metabolismo secundário” foram também observadas em outros trabalhos de interação *Trichoderma/planta* (Chaco et al. 2007; Samolski et al. 2009), estas categorias estão mais presentes nos estágios iniciais de interação, a fim de suportar a maior demanda de energia metabólica do fungo (Rubio et al. 2012). Nogueira-Lopez e colaboradores (2018) relatam que os metabólitos secundários do *Trichoderma* são classificados em quatro classes: policetídeos, terpenóides, compostos derivados do ácido chiquímico e peptídeos não ribossômicos. Durante as interações planta-fungo, os metabólitos secundários, como fito-hormônios e toxinas, desempenham papéis importantes na regulação dos processos de resposta metabólica e defesa da planta (Pusztahelyi et al. 2015). Além disso, os metabólitos secundários dos fungos podem moldar as interações fungo-planta de maneira similar às proteínas efetoras (Pusztahelyi et al. 2015).

Os dados de categorização funcional corroboram com os dados encontrados na análise de genes diferencialmente expressos para CAZymes, transportadores e proteases no início desse estudo, onde temos uma predominância de genes do metabolismo de carboidratos, metabolismo secundário e atividade de proteases com maior atividade em 72 horas de interação quando comparados ao tempo de 48 horas. O aumento na atividade de genes específicos relatados nesse estudo demonstra uma estratégia do fungo a fim de realizar uma colonização mais efetiva. O isolado *Trichoderma asperellum* TR356 se mostrou capaz de modular sua expressão gênica para ativar e inativar diferentes vias e consequentemente utilizar diversas estratégias dependendo do tempo de interação com a planta hospedeira.

Por meio da análise de posicionamento dos genes em vias metabólicas, verificou-se que do conjunto total de genes identificados em 48 horas de interação, 111 genes induzidos

estão envolvidas em 18 vias metabólicas, enquanto que do conjunto total de genes identificados em 72 horas, 448 genes induzidos expressam as 20 principais vias metabólicas que tiveram destaque durante a interação (Tabela 06). É possível observar que o maior número de genes foram induzidos em cada rota no segundo tempo da análise (72 horas). A análise de KEGG revelou que estes genes foram significativamente enriquecidos nas vias de metabolismo e degradação. Entre essas vias, as vias associadas ao metabolismo de bases nitrogenadas (*Purine metabolism e Pyrimidine metabolism*) representam 16 e 74 genes em 48 e 72 horas respectivamente. Os genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos (*Tryptophan metabolism, Tyrosine metabolism, Histidine metabolism, Glycine, serine and threonine metabolismo*) representam 20 e 81 genes para 48 e 72 horas respectivamente.

Tabela 06: Análise de enriquecimento das vias metabólicas dos GDE. A quantidade de genes envolvidos nas vias KEGG estão nas colunas centrais. Apenas as 20 rotas KEGG mais abundantes estão representadas.

Rota Metabólica	48 horas	72 horas	Código da rota
Purine metabolism	12	47	K07153
Starch and sucrose metabolism	11	37	K00500
Glycerolipid metabolism	11	37	K00561
Tryptophan metabolism	7	29	K07103
Pyrimidine metabolism	4	27	K17723
Sphingoglycolipid metabolism	9	25	K00600
Ubiquinone biosynthesis	5	23	K00130
Butanoate metabolism	7	23	K00650
Benzoate degradation via CoA ligation	7	21	K00632
Tyrosine metabolism	4	20	K00350
N-Glycans biosynthesis	1	20	K00510
Lysine degradation	7	19	K00310
Pentose and glucuronate	7	18	K00040

interconversions

ATP synthesis	0	18	K01939
Aminosugars metabolism	4	18	K00520
Type III secretion system	0	18	K02024
Inositol phosphate metabolism	6	16	K00562
Histidine metabolism	2	16	K00340
Glycine serine and threonine metabolism	7	16	K00260
Fructose and mannose metabolism	4	16	K00051

2.3 CONCLUSÃO

As abordagens transcritômicas mostraram que a interação entre *T. asperellum* TR356 e *P. vulgaris* é bem complexa e envolve a produção de diversas moléculas fundamentais para a simbiose nos dois tempos de análise, com destaque para 72 horas, com uma modulação principalmente de enzimas hidrolíticas. Neste estudo, foi observada uma alta frequência de transcritos diferencialmente expressos envolvidos na degradação do carboidratos, metabólitos secundários, transporte, efetores diversos, SSCPs, atividade antioxidante e genes envolvidos com a indução de resistência em plantas, sugerindo que os genes identificados poderiam ser essenciais para a adaptação do *T. asperellum* a planta hospedeira.

Identificamos que a degradação e modificação da parede celular hospedeira é essencial durante a colonização. *T. asperellum* apresentou uma alta presença de GHs em seu transcritoma em resposta à interação com as raízes de feijoeiro. A homeostase redox mostrou-se importante, provavelmente para manter um ambiente controlado no apoplasto. Observamos a presença de proteínas putativas semelhantes a efetores secretadas por *T. asperellum* que podem levar a relação simbiótica pela supressão de vias de defesa em plantas, por exemplo, atividade de peroxidase.

Os resultados sugerem que, quando *T. asperellum* encontra o sistema radicular da planta hospedeira, para superar as barreiras da parede celular, penetrar e colonizar com

sucesso, pode secretar enzimas no apoplasto como glicosil hidrolases que se concentram na degradação de polímeros da parede celular, necessários para colonizar os tecidos do hospedeiro. As xilanases secretadas, identificadas nesse estudo, são boas candidatas a induzir resistência em plantas e aumentar a sua defesa.

Estes resultados indicam que o transcrito de *T. asperellum* é alterado pela presença das raízes do hospedeiro, pela expressão e supressão de diferentes famílias de proteínas, sugerindo que o fungo está modulando o seu transcrito a fim de realizar simbiose.

Este estudo estabelece as bases a futuros estudos, para uma melhor compreensão das interações fungo-planta, particularmente no nível transcritômico a partir dos nossos dados transcritômicos. Os dados obtidos fornecem um passo em direção ao entendimento dos complexos processos de interação *Trichoderma*-planta. Entretanto, estudos futuros são necessários para caracterização funcional de alguns genes aqui relatados, auxiliando a definir os melhores caminhos envolvidos no processo de interação. Uma perspectiva é realizar uma análise mais robusta das proteínas presentes no apoplasto, com o propósito de identificar possíveis efetores que foram secretados, utilizando técnicas de proteômica. Assim como entender de forma mais abrangente a interação entre fungos do gênero *Trichoderma* com plantas diversas.

Em conclusão, o *Trichoderma asperellum* é promessa para o desenvolvimento agrícola em curso, expressando diversas enzimas promissoras, elicitores e metabólitos secundários.

2.4 REFERÊNCIAS

- Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Roberts, D. P., Thomas, S. E., Crozier, J., Samuels, G. J., Choi, I. Y. & Holmes, K. A. 2006.** Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta* 224, 1449–1464.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Von Heijne, G., and Brunak, S. 2004b.** Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340, 783–795. doi: 10.1016/j.jmb.2004.05.028
- Benoit I, Culleton H, Zhou M, DiFalco M, Aguilar-Osorio G, Battaglia E, Bouzid O, Brouwer CPJM, El-Bushari HBO, Coutinho PM, et al. 2015.** Closely related fungi employ diverse enzymatic strategies to degrade plant biomass. *Biotechnol Biofuels.* 8(1):107.
- Berlemont R, Martiny AC. 2013.** Phylogenetic distribution of potential Cellulases in bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 79(5):1545–54.
- Bischoff, K. M. et al. 2006.** Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters.* v. 28, n. 21, p. 1761-1765, Nov. 2006. ISSN 0141-5492.
- Bolton MD, Thomma BPHJ, Nelson BD. 2006;** *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Mol Plant Pathol* 7:1–16. doi: 10.1111/j.1364-3703.2005.00316.x.
- Brotman, Y.; Gupta, K.; Viterbo, A. , 2010.** Quick guide - *Trichoderma* . Magazine Current Biology, v.20, p. 1-2.
- Brunner, K., Peterbauer, C. K., Mach, R. L., Lorito, M., Zeilinger, S. & Kubicek, C. P. 2003.** The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr Genet* 43, 289–295.
- Bukau B, Weissman J, Horwich A 2006.** Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125(3):443–451
- Bueno EA, Oliveira MB, Andrade RV, Lobo MJr, Petrofeza S. 2012.** Effect of different carbon sources on proteases secreted by fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* during *Phaseolus vulgaris* infection. *Genet Mol Res* 11(3):2171-81.
- Chaco´ n, M. R., Rodr´ ıguez-Gala´ n, O., Ben´ ıtez, T., Sousa, S., Rey, M., Llobell, A. & Delgado-Jarana, J. 2007.** Microscopic and transcrip- tome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *Int Microbiol* 10, 19–27.
- Chai, Y. S. L. Koppenhafer, N. M. Bonini, and H. L. Paulson, 1999.** “Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease,” *The Journal of Neuro- science*, vol. 19, no. 23, pp. 10338–10347.
- Chaudhary N, Sandhu P, Ahmed M, Akhter Y. 2017.** Structural basis of transport function in major facilitator superfamily protein from *Trichoderma harzianum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95: 1091–1100

Cieslak, J. F., Levindo, G.G., Vianello, R. P. 2013. Re-sequências genômico da cultivar de feijoeiro-comum Pérola (*Phaseolus vulgaris* L.). 7 seminário de Jovens Talentos: Coletânea dos resumos apresentados. Embrapa Arroz e Feijão. Santo Antônio de Goiás, Go.

Conesa A, Götz S. 2008. Blast2GO: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *Int J Plant Genomics* 2008: 619832. doi: 10.1155/2008/619832.

Conesa, A.,P. Madrigal, S. Tarazona, D. Gomezcabrero, A. Cervera, A.Mcpherson, M. W. Szcześniak, D.J. Gaffney, L.L. Elo, X. Zhang, A. Mortazavi 2016. A survey of best practices for RNA-seq data analysis *Genome Biol.*, 17.

Dichtl, K., Helmschrott, C., Dirr, F., and Wagener, J. 2012. Deciphering cell wall integrity signaling in *Aspergillus fumigatus*: Identification and functional characterization of cell wall stress sensors and relevant Rho GTPases. *Mol Microbiol* **83**: 506–519.

Djonovic S, Pozo MJ, Dangott LJ, Howell CR, Kenerley CM. 2006. Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Mol Plant Microbe Interact.* 19(8):838–53.

Dubey MK, Ubhayasekera W, Sandgren M, Jensen DF, Karlsson M. 2012. Disruption of the Eng18B ENGase gene in the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* affects growth, conidiation and antagonistic ability. *PLoS One.* 7(5):36152.

Dubey, M.K., Jensen, D.F., 2014. Karlsson, M. Hydrophobins are required for conidial hydrophobicity and plant root colonization in the fungal biocontrol agent *Clonostachys rosea*. *BMC Microbiology* 14:18

Emanuelsson, O., Brunak, S., Von Heijne, G., and Nielsen, H. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protoc.* 2, 953–971. doi: 10.1038/nprot.2007.131

Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., and Von Heijne, G. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300, 1005–1016. doi: 10.1006/jmbi.2000.3903

Felts, S. J. & Toft, D. O. (2003). p23, a simple protein with complex activities. *Cell Stress Chaperones* 8, 108–113.

Ferreira Filho J. A., Horta M. A. C., Beloti L. L., Dos Santos C. A., de Souza A. P. 2017. Carbohydrate-active enzymes in *Trichoderma harzianum*: a bioinformatic analysis bioprospecting for key enzymes for the biofuels industry. *BMC Genomics* 18:779. 10.1186/s12864-017-4181-9.

Frischmann, A.; Neudl, S.; Gaderer, R.; Bonazza, K.; Zach, S.; Gruber, S.; Spadiut, O.; Friedbacher, G.; Grothe, H.; Seidl-Seiboth, V. 2012. Self-assembly at Air/Water Interfaces and Carbohydrate Binding Properties of the Small Secreted Protein EPL1 from the fungus *Trichoderma atroviride*. *J. Biol. Chem.* 288, 4278-4287.

Futagami, T., Nakao, S., Kido, Y., Oka, T., Kajiwara, Y., Takashita, H., et al. 2011. Putative stress sensors WscA and WscB are involved in hypo-osmotic and acidic pH stress tolerance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **10**: 1504–1515.

Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan

- L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohe N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A. 2011.** Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol.* 15;29(7):644-52.
- 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 Genetics* 18:16 Doi 10.1186/s12863-017-0481-y.
- Häkkinen M, Arvas M, Oja M, Aro N, Penttilä M, Saloheimo M, Pakula TM. 2012.** Re-annotation of the CAZy genes of *Trichoderma reesei* and transcription in the presence of lignocellulosic substrates. *Microb Cell Factories.* 11:134.
- Harman, G.E.; Björkman, T.; Ondik, K.; Shoresh, M. 2008.** Changing paradigmas on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. For biocontrol. *Outlooks on Pest Management, Burnham*, v.19, p.24-29.
- Heller, J., and Tudzynski, P. 2011.** Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 369–390. doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095355
- Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E. 2012.** Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology.* 158:17–25.
- Horta MAC, Vicentini R, Delabona PS, Laborda P, Crucello A, Freitas S, Kuroshu RM, Polikarpov I, Pradella JGC, Souza AP. 2014.** Transcriptome profile of *Trichoderma harzianum* IOC-3844 induced by sugarcane Bagasse. *PLoS One.* 9(2):e88689.
- Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., et al. 2007.** WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* 35, W585–W587. doi: 10.1093/nar/gkm259
- Horwitz BA, Kosti I, Glaser F, Mukherjee M. 2013.** *Trichoderma* genomes: a vast reservoir of potential elicitor proteins. In: Mukherjee PK, Horwitz BA, Singh US, Mukherjee M, Schmoll M, editors. *Trichoderma: Biology and Applications.* UK: CABI International; p. 195–208.
- Howell, C. R. (2003).** Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis* 87, 4–10.
- Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. 2015.** KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research*, Vol. 44, 457–462.
- Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K., and Brul, S. 2002.** Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 26: 239–256.
- Kombrink, A., & Thomma, B. P. H. J. 2013.** LysM Effectors: Secreted Proteins Supporting Fungal Life. *PLoS Pathogens*, 9(12), e1003769. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003769>
- Kubicek CP, Herrera-Estrella A, Seidl-Seiboth V, Martinez DA, Druzhinina IS, Thon M, et al. 2011.** Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the

ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol.* 12(4):R40.

Levin, D.E. (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 262–291.

Lopes FA, Steindorff AS, Geraldine AM, Brandão RS, Monteiro VN, Lobo M Jr, Coelho AS, Ulhoa CJ, Silva RN: 2012. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biol* 116(7):815–824.

Maddi, A., Dettman, A., Fu, C., Seiler, S., and Free, S.J. 2012. WSC-1 and HAM-7 are MAPK-1 MAP kinase pathway sensors required for cell wall integrity and hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *PLoS ONE* **7**: e42374.

Manzo N, D'Apuzzo E, Coutinho PM, Cutting SM, Henrissat B, Ricca E. 2011. Carbohydrate-active enzymes from pigmented bacilli: a genomic approach to assess carbohydrate utilization and degradation. *BMC Microbiol.* 11(1):198.

Marra, R., Ambrosino, P., Carbone, V., Vinale, F., Woo, S. L., Ruocco, M., Ciliento, R., Lanzuise, S., Ferraioli, S. et al. 2006. Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. *Curr Genet* **50**, 307–321.

Marschall, R., and Tudzynski, P. (2016). Reactive oxygen species in development and infection processes. *Semin. Cell Dev. Biol.* **57**, 138–146. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.03.020

Moran-Diez E, Hermosa R, Ambrosino P, Cardoza RE, Gutierrez S, Lorito M, et al. 2009. The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*-plant beneficial interaction. *Mol Plant Microbe Interact.* **22**(8):1021–31.

Mei, J., Wang, L., Jiang, X., Wu, B. and Li, M., 2018. Functions of the C2H2 Transcription Factor Gene *thmeal* in *Trichoderma harzianum* under Copper Stress Based on Transcriptome Analysis. 2018. *BioMed Research International*, Article ID 8149682, 10 pages <https://doi.org/10.1155/2018/8149682>

Montero-Barrientos M, Cardoza RE, Gutierrez S, Monte E, Hermosa R 2007. The heterologous overexpression of *hsp23*, a small heat-shock protein gene from *Trichoderma virens*, confers thermotolerance to *T. harzianum*. *Curr Genet* **52**:45–53

Montero-Barrientos M, Hermosa R, Nicolas C, Cardoza RE, Gutierrez S, Monte E 2008. Overexpression of a *Trichoderma* HSP70 gene increases fungal resistance to heat and other abiotic stresses. *Fungal Genet Biol* **45**:1506–1513

Nanda, A. K., Andrio, E., Marino, D., Pauly, N., and Dunand, C. 2010. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *J. Integr. Plant Biol.* **52**, 195–204. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00933.x

Nieto-Jacobo, M. F., Steyaert, J. M., Salazar-Badillo, F. B., Nguyen, D. V., Rostás, M., Braithwaite, M., et al. 2017. Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Front. Plant Sci.* **8**:102. doi: 10.3389/fpls.2017.00102.

Nummi, M. et al. 1983. Cellobiohydrolase from *Trichoderma reesei*. *Biochemical Journal.* v. **215**, n. 3, p. 677-683,. ISSN 0264-6021.

Ozsolak F, Milos PM 2011,: RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat Rev Genet* 12(2):87–98.

Pereira JL, Queiroz RM, Charneau SO, Felix CR, Ricart CA, da Silva FL, Steindorff AS, Ulhoa CJ, Noronha EF 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*. 30;9(5).

Pereira JL, Queiroz RML, Charneau SO, et al. 2014b. 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.

Petersen, T. N., Brunak, S., Von Heijne, G., and Nielsen, H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8, 785–786. doi: 10.1038/nmeth.1701

Pinard D, Mizrachi E, Hefer CA, Kersting AR, Joubert F, Douglas CJ, Mansfield SD, Myburg AA. 2015. Comparative analysis of plant carbohydrate active enzymes and their role in xylogenesis. *BMC Genomics*. 16(1):402.

Pozo, M. J., Baek, J.-M., García, J. M., & Kenerley, C. M. (2004). Functional analysis of *tvsp1*, a serine protease- encoded Shoresh ng gene in the biocontrol agent *Trichoderma virens*. *Fungal Genetics and Biology*, 41(3), 336–348. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2003.11.002>

Przylucka, A., Akcapinar, G.B., Chenthamara, K., Cai, F., Grujic, M., Karpenko, J., Livoi, M., Shen, Q., Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S., 2017. HFB7-A novel orphan hydrophobin of the Harzianum and Virens clades of *Trichoderma*, is involved in response to biotic and abiotic stresses. *Fungal Genet. Biol.* 102, 63e76.

Pusztahelyi, T., Holb, I. J., and Pócsi, I. 2015. Secondary metabolites in fungus- plant interactions. *Front. Plant Sci.* 6:573. doi: 10.3389/fpls.2015.00573

Rawlings, N.D.; Barrett, A.J.; Bateman, A. Merops. 2012, the database of proteolytic enzymes; their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 40, D343–D350.

Ron, M., and Avni, A. (2004). The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell* 16, 1604–1615. doi: 10.1105/tpc.022475

Rotblat, B., Enshell-Seijffers, D., Gershoni, J. M., Schuster, S., and Avni, A. (2002). Identification of an essential component of the elicitation active site of the EIX protein elicitor. *Plant J.* 32, 1049–1055. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01490.x

Rubio M B, Dominguez S, Monte E, Hermosa R. 2012. Comparative study of *Trichoderma* gene expression in interactions with tomato plants using high-density oligonucleotide microarrays. *Microbiology* 158:119–28.

Samolski, I., de Luis, A., Vizcaíno, J. A., Monte, E. & Suárez, 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.

Sarkar NK, Kim YK, Grover A 2009. Rice sHsp genes: genomic organization and

expression profiling under stress and development. *BMC Genom* 10:393

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.

Shoresh, M. & Harman, G. E. 2008. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. *Plant Physiol* 147, 2147–2163.

Shoresh, M., Harman, G. E. & Mastouri, F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu Rev Phytopathol* 48, 21–43.

Straede, A., and Heinisch, J.J. 2007. Functional analyses of the extra- and intracellular domains of the yeast cell wall integrity sensors Mid2 and Wsc1. *FEBS Lett* 581: 4495–4500.

Sunil, S. A., Siu, K. S., 2014. *Trichoderma* Secretome: An Overview. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*; Chapter 8. School of Biological Sciences, Nanyang Technological University, Singapore.

Tanabe, S., Ishii-Minami, N., Saitoh, K., Otake, Y., Kaku, H., Shibuya, N., et al. 2011. The role of catalase-peroxidase secreted by *Magnaporthe oryzae* during early infection of rice cells. *Mol. Plant Microbe Interact* 24, 163–171. doi: 10.1094/MPMI-07-10-0175

Tatusov RL, Fedorova ND, Jackson JD, Jacobs AR, Kiryutin B, Koonin EV, Krylov DM, Mazumder R, Mekhedov SL, Nikolskaya AN, Rao BS, Smirnov S, Sverdlov AV, Vasudevan S, Wolf YI, Yin JJ, Natale DA. 2003. The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics*. 11(4):41.

Tomme, P. et al. 1988. Studies of the cellulolytic of *Trichoderma reesei* QM-9414 - analysis of domain function in 2 cellobiohydrolases by limited proteolysis. *European Journal of Biochemistry*. v. 170, n. 3, p. 575-581,. ISSN 0014-2956.

Tong, S.M., Chen, Y., Zhu, J., Ying, S.H., Feng, M.G., 2016. Subcellular localization of five singular WSC domain-containing proteins and their roles in *Beauveria bassiana* responses to stress cues and metal ions. *Environ. Microbiol. Rep.* 8, 295e304.

Tyler L, Bragg JN, Wu J, Yang X, Tuskan GA, Vogel JP. 2010. Annotation and comparative analysis of the glycoside hydrolase genes in *Brachypodium distachyon*. *BMC Genomics*. 11(1):600.

Viterbo A, Chet I 2006. *TasHyd1*, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Mol Plant Pathol* 7 249–258

Vizcaíno JA, Redondo J, Suarez MB, Cardoza RE, Hermosa R, Gonzales FJ, Rey M, Monte E: 2007. Generation, annotation and analysis of ESTs from four different *Trichoderma* strains grown under conditions related to biocontrol. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:853–862.

Wang, Z.; Gerstein, M.; Snyder, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, London, v. 10, n. 1, p. 57–63.

Wu Q., Sun R., Ni M., Yu J., Li Y., Yu C., et al. 2017. Identification of a novel fungus, *Trichoderma asperellum* GDFS1009, and comprehensive evaluation of its biocontrol efficacy. *PLoS ONE* 12:e0179957 10.1371/journal.pone.0179957.

Xie B-B, Qin Q-L, Shi M, Chen L-L, Shu Y-L, Luo Y, Wang X-W, Rong J-C, Gong Z-T, Li D, et al. 2014. Comparative genomics provide insights into evolution of *Trichoderma* nutrition style. *Genome Biol Evol.* 6(2):379–90.

Yamada, T. et al. 2011. ipath2. 0: interactive pathway explorer. *Nucleic acids research*, Oxford Univ Press, v. 39, n. suppl 2, p. 412–415, page.1616.

Yokoyama, L.P.; Del Peloso, M.J.; Di Stefano, J.G.; Yokoyama, M. 1999. Nível de aceitabilidade da cultivar de feijão “Pérola”: avaliação preliminar. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 20p. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 98).

Zhang, N., Zhang, S., Borchert, S., Richardson, K., and Schmid, J. 2011. High levels of a fungal superoxide dismutase and increased concentration of a PR-10 plant protein in associations between the endophytic fungus *Neotyphodium lolii* and ryegrass. *Mol. Plant Microbe Interact* 24, 984–992. doi: 10.1094/MPMI-02-11-0028

3. CAPÍTULO III – IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS EFETORAS EM *T. asperellum* TR356

3.1 METODOLOGIA

3.1.1 CULTIVO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *Trichoderma*

O fungo *T. asperellum* TR356, isolado de solo do Cerrado, e mantido na coleção de fungos do CNPAF, EMBRAPA arroz e feijão – GO e também na coleção de fungos do Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília, foi utilizado nos experimentos de interação e análise de transcrito para identificação de proteínas efetoras. O fungo foi mantido -80°C em glicerol a 20%, com repiques anuais. Quando da sua utilização uma alíquota da suspensão de conídios é inoculada em meio BDA (batata, dextrose e ágar) e a cultura obtida é mantida a 4°C, com repiques periódicos por até 15 dias.

3.1.2 GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE FEJJOEIRO

Utilizamos o cultivar Pérola nos nossos experimentos de interação, as sementes foram doadas pela Embrapa Arroz e Feijão – Goiás. A assepsia das sementes foi realizada em fluxo laminar com imersão em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 1%, por 10 minutos, seguida de três lavagens, de um minuto, com água autoclavada conforme descrito por Pereira et al. (2014). As sementes foram transferidas para placas de Petri de vidro contendo meio ágar-glicose 2%, ambos autoclavados anteriormente. Estas foram incubadas em câmara de germinação (modelo TECHNICAL 4013) a 28°C com fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de escuro, durante quatro dias. As plântulas obtidas foram então utilizadas nos experimentos de co-cultivo (descrito no capítulo II).

3.1.3 PREDIÇÃO DE POSSÍVEIS GENES CODIFICADORES DE EFETORES EM *Trichoderma asperellum* TR356

Os efetores são proteínas secretadas pelo fungo, sendo essa a característica principal para sua identificação. Essa busca pode ser realizada *in vivo*, por meio da análise do secretoma do fungo ou como é mais realizado atualmente, *in silico*, na filtragem e análise de dados a procura de sequências nos genomas do fungo.

Para a predição de possíveis proteínas extracelulares ou que provavelmente estão presentes na membrana do *Trichoderma asperellum* TR356, usamos inicialmente um *Pipeline* com os algoritmos SignalP4.0, TMHMM v2.0 e TargetP1.1, o que nos permitiu prever proteínas extracelulares de *Trichoderma* com um peptídeo sinal de secreção e sem domínios transmembranares.

Rastreamos proteínas efetoras entre as proteínas extracelulares de *Trichoderma asperellum* TR356 usando as proteínas no banco de dados para efetor como consultas BLAST. Entre os acertos significativos (e-value <0,001), procuramos por uma série de características dos efetores, estes incluíram domínios conhecidos de Pfam presentes em efetores; Peptídeo sinal na região N-terminal; Motivos de translocação validados experimentalmente como RxLR (Dou et al. 2008), ou motivos semelhantes já relatados na literatura como RxFLAK (Liu et al. 2011), W / Y / F-XC (Godfrey et al. 2011) e variações possíveis [RKH] x [LYMFYW] [RKH] (Kale & Tyler, 2010); e pequenas proteínas ricas em cisteína (SSCPs).

Finalmente, classificamos e agrupamos as proteínas previstas de acordo com as propriedades efetoras identificadas a partir do conjunto completo do proteoma de *T. asperellum* TR356. Na lista de possíveis genes codificadores de efetores de *T. asperellum* TR356 selecionamos sequências de 8 famílias principais nas quais os genes foram classificados e que tinham preferencialmente um motivo de translocação tipo RxLR ou variações em cada família. A caracterização funcional das proteínas extracelulares em *Trichoderma* foi baseada na anotação GO e realizada pela plataforma Blast2GO.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 PROTEÍNAS SECRETADAS DE *Trichoderma asperellum* TR356 COM CAPACIDADE EFETORA

Após a análise inicial dos genes diferencialmente expressos, descrito no capítulo anterior, usamos um *Pipeline* para investigação, utilizando o *software* SignalP v4.0, para

identificar apenas sequências com peptídeo sinal presente. Utilizando a ferramenta TargetP 1.1, desconsideramos as sequências de genes de proteínas destinadas a mitocôndrias ou outras estruturas citoplasmáticas, considerando apenas aquelas efetivamente relacionadas à ação efetora. Também utilizamos a ferramenta TMHMM v2.0 para selecionar apenas as proteínas putativas que não apresentavam domínio transmembrana em sua estrutura. Após essa mineração dos dados, identificamos 198 genes que codificam possíveis efetores, destes, 54 foram identificados em 48 horas e 144 em 72 horas de interação *T. asperellum* e *P. vulgaris* desenvolvido no sistema hidropônico.

Recentemente, em um trabalho realizado por Guzmán-Guzmán e colaboradores (2017), foi identificado um conjunto de 233 candidatos a efetores em três genomas de espécies de *Trichoderma* (*T. atroviride*, *T. virens* e *T. reesei*) priorizando a identificação de hidrofobinas na interação *Trichoderma/A. thaliana*. Schmoll e colaboradores (2006), identificaram um conjunto de 2500 pequenas proteínas secretadas ricas em cisteínas (SSCPs) entre os genomas de *T. virens*, *T. atroviride* e *T. reesei* utilizando como critérios de identificação sempre as características efetoras já conhecidas, como a presença de peptídeo sinal e um comprimento de sequência com média de 300 aminoácidos.

Em nosso trabalho, todos os genes codificadores de efetores foram agrupados em 20 e 50 famílias de acordo com seus domínios Pfam em 48 e 72 horas de interação, respectivamente (Tabelas suplementares 1 e 2). Estes domínios estão relacionados principalmente com atividades como proteínas elicitoras, proteases, ligação à superfície do hospedeiro, proteção de hifas, transporte de substâncias entre membranas, enzimas de degradação da parede celular, domínios proteicos relacionados ao mutualismo, resposta ao estresse e processo biossintético.

Foram identificadas 27 e 67 proteínas que não apresentaram domínio Pfam utilizando *e-value* <1e-5 em 48 e 72 horas de interação, respectivamente. Curiosamente, 135 das 198 sequências totais consideradas putativas possuem um domínio de translocação já validado experimentalmente, semelhante a RxLR, RxLR-like ou W/Y/F-xC (37 para 48 horas e 98 para 72 horas) que podem ser classificadas como efetores putativos (Tabelas suplementares 1 e 2).

Vários trabalhos têm demonstrado a eficácia dos motivos RxLx na translocação de proteínas (Whisson et al. 2007; Lévesque et al. 2010). Em *Plasmodium falciparum* o motivo RxLx é suficiente para translocar proteínas para o interior das células sanguíneas, ou o motivo RxLR da proteína Avr1B de *Phytophthora sojae* que permite a translocação da proteína

fluorescente verde para as células da raiz da soja (Dou et al. 2008; Bhattacharjee et al. 2006; Kamoun, 2006). Em *Trichoderma*, já foi demonstrado que alguns efetores podem atuar em processos relacionados à defesa de plantas, como Sm1 de *T. viriens* e seu ortólogo Epl1 de *T. atroviride*, que são caracterizados como cerato-plataninas (Gomes et al. 2015). Outros estudos demonstraram que os níveis de transcrição do efector de hidrofobina Tashyd1 de *T. asperellum* aumentam com a interação após 5 dias com a planta de pepino (Kamoun et al. 2013).

Alguns efetores já foram validados experimentalmente, como o efector Mg3LysM do patógeno *Mycosphaerella graminicola*, que foi identificado no genoma do fungo e, posteriormente, sua participação durante a interação com o hospedeiro (Marshall et al. 2011). Alguns efetores putativos foram identificados a partir do agente de biocontrole *Pythium oligandrum* durante a interação com o patógeno *Phytophthora infestans* (Horner et al. 2012). Outros autores demonstraram a existência de 78 genes que codificam possíveis efetores em *Sclerotinia sclerotiorum*, um fitopatógeno de várias plantas, essa identificação só foi possível com a ajuda de ferramentas de bioinformática (Guyon et al. 2014). Guzmán-Guzmán e colaboradores (2017) identificaram pelo menos 16 efetores putativos que participam de vários processos durante a colonização do *Trichoderma* em raízes de plantas.

Nós identificamos algumas proteases, glicosil hidrolases, celulasas e hidrofobinas, que também foram identificadas por Guzmán-Guzmán et al (2017) e Schmoll et al (2016), mas que ainda não foram relatadas como efetores em *T. asperellum*. Nosso conjunto de potenciais efetores inclui não apenas as proteínas citadas, mas também outras proteínas que podem atuar como possíveis efetores. Dentre as principais famílias efectoras selecionadas em nosso trabalho, duas foram mencionadas também nos trabalhos citados acima, como as proteínas LysM e CFEM, ambas identificadas com 72 horas de interação.

Das 198 proteínas totais detectadas, o grupo mais frequente foram enzimas degradadoras de polissacarídeos como glicosil hidrolases (GH) com um total de 15 proteínas de diferentes famílias de GH, ao menos 6 proteínas identificadas em 48 horas e 9 proteínas identificadas em 72 horas como endo-1,3- β -glucanase (GH160), quitinase (GH18), glucosidase (GH63), manosidase (GH76) e outros (Tabelas suplementares 1 e 2). Este resultado é semelhante ao encontrado por Lamdan et al (2015), que identificou uma maior abundância de GH17 durante a interação entre *T. virens* e raízes de milho por sistemas hidropônicos similares aos que foram realizados em nosso trabalho. Essas GHs são enzimas hidrolíticas presentes em fungos e têm sua função relacionada à degradação da parede celular

da planta (Lamdan et al. 2015). Outro grande grupo de proteínas anotadas compreende enzimas com atividade proteolítica de várias famílias, principalmente peptidases. A abundância da maioria das proteases foi identificada em 72 horas (Tabela suplementar 2).

Outras categorias funcionais, como aspartil proteases, oxidoredutases, metaloproteases, serino-proteases e proteínas de ligação a FAD foram identificadas em nosso estudo. Essas famílias podem atuar como potenciais efetores e são identificadas em 72 horas de interação entre *T. asperellum* TR356 e feijoeiro (Tabela suplementar 2). Apenas as proteínas de ligação ao FAD foram identificadas em 48 horas de interação (Tabela suplementar 1).

Neste trabalho, 2 e 5 SSCPs foram reprimidas com 48 e 72 horas, respectivamente. Identificamos 07 e 19 SSCPs induzidas durante a interação de *T. asperellum*/feijoeiro em 48 e 72 horas, respectivamente (Tabela suplementar 1 e 2). Esses resultados corroboram com os dados de Lamdan et al. (2015) que identificaram uma abundância de proteínas reprimidas durante a interação entre *T. virens* e raízes de milho e 5 SSCPs induzidas durante essa interação. Segundo os autores, as SSCPs seriam os primeiros sinais que resultariam em resistência nas plantas. Uma hipótese muito interessante foi apontada por Lamdan e colaboradores (2015), demonstrando que o *Trichoderma* regula efeitos positivos ou negativos diferentes para atingir a resposta máxima de defesa da planta durante a interação, pois o sistema de defesa da planta responde em ondas de ativação transcricional em sua resposta de defesa. A repressão ou indução de um dado efector poderia, assim, promover uma resposta de defesa adequada pela planta em um dado período de interação.

Para acessar a informação completa das categorias funcionais de todos os genes que apresentam características para possíveis candidatos a efetores nos tempos analisados, realizou-se uma anotação global destes genes. Todos os transcritos identificados, em cada tempo, foram analisados em conjunto pela ferramenta online QuickGo, a fim de realizar o controle de termos GO redundantes. Estes transcritos foram distribuídos em três categorias funcionais principais: *Biological process*, *Molecular function* e *Cellular component* (Figuras 11 a 16).

Ao analisarmos as categorias funcionais de todos os genes candidatos a efetores, nós observamos uma grande variedade de categorias funcionais relacionadas à produção de vesículas de transporte, produção de estruturas transportadoras como os microtubulos, proteínas de transporte intracelular e também enzimas relacionadas com a formação do

Reticulo Endoplasmático (Figuras 11 a 16). Isto, sugere que, provavelmente durante a interação entre o fungo e a planta um grupo específico de genes encarregados pela fabricação de estruturas de secreção são efetivamente ativados, permitindo assim que interação ocorra de forma completa. Fischer-Parton e colaboradores (2000) em trabalhos com *T. atroviride* relatam a importância do tráfego de vesículas e a formação de estruturas transportadoras para o crescimento e diferenciação celular. Em fungos filamentosos, uma grande quantidade de vesículas é destinadas à exocitose celular. Em fungos superiores (isto é, *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Deuteromycota*) o tráfico de vesículas até o ápice das hifas durante o crescimento é altamente organizado e envolve a atividade de um complexo de organelas e outros componentes (Fischer-Parton et al. 2000). Zhou et al. (2018) relatam que a produção de vesículas por fungos filamentosos está ligado ao crescimento das hifas e à capacidade de interagir com as células do hospedeiro. O transporte de vesículas está intimamente ligado também a manutenção da membrana plasmática e parede celular fúngica.

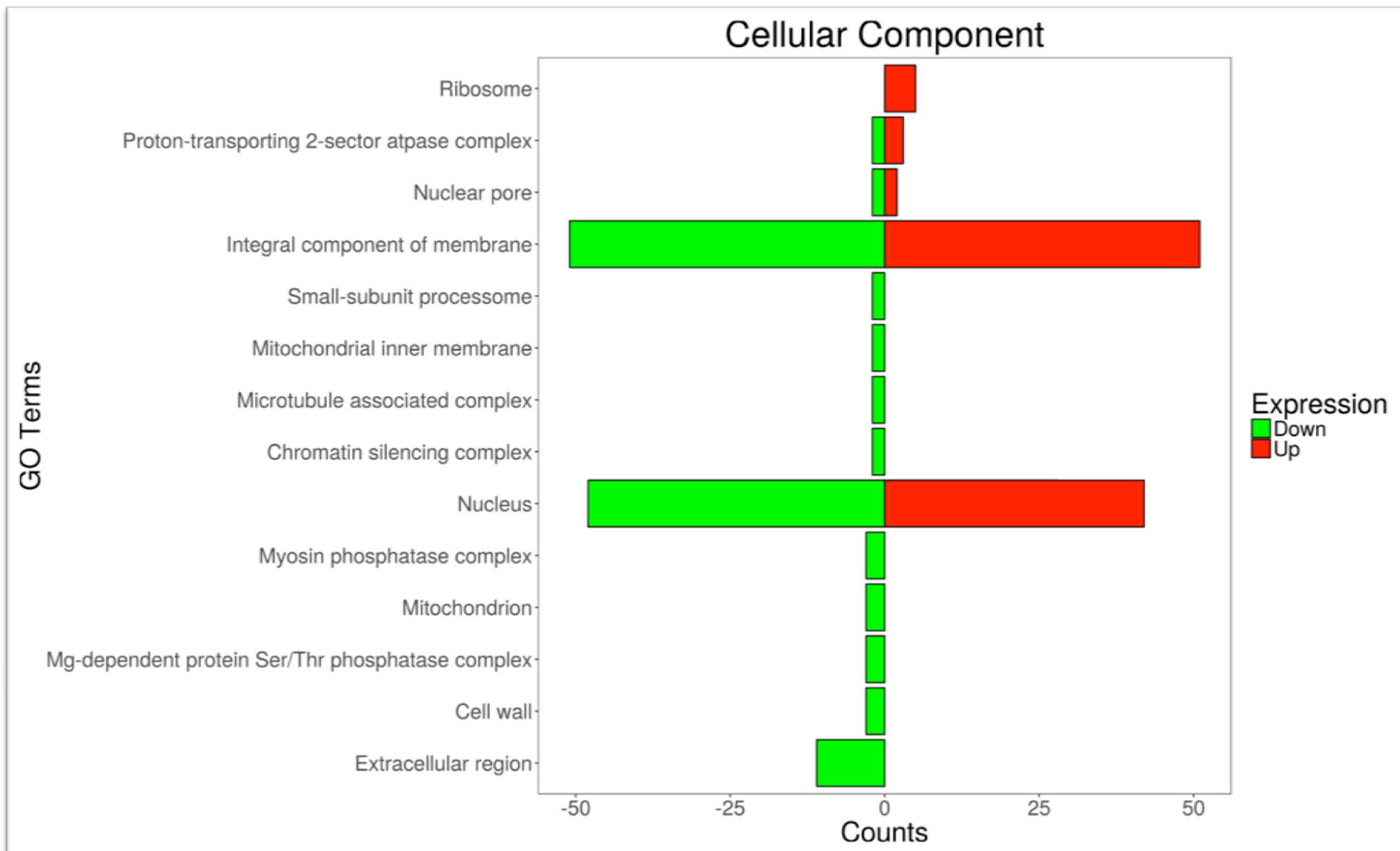


Figura 11. Classificação por termos de GO dos genes identificados como possíveis efetores de *T. asperellum* TR356 durante a interação com as raízes do *Phaseolus vulgaris* em 48 horas (apenas algumas categorias foram selecionadas para a representação no gráfico).

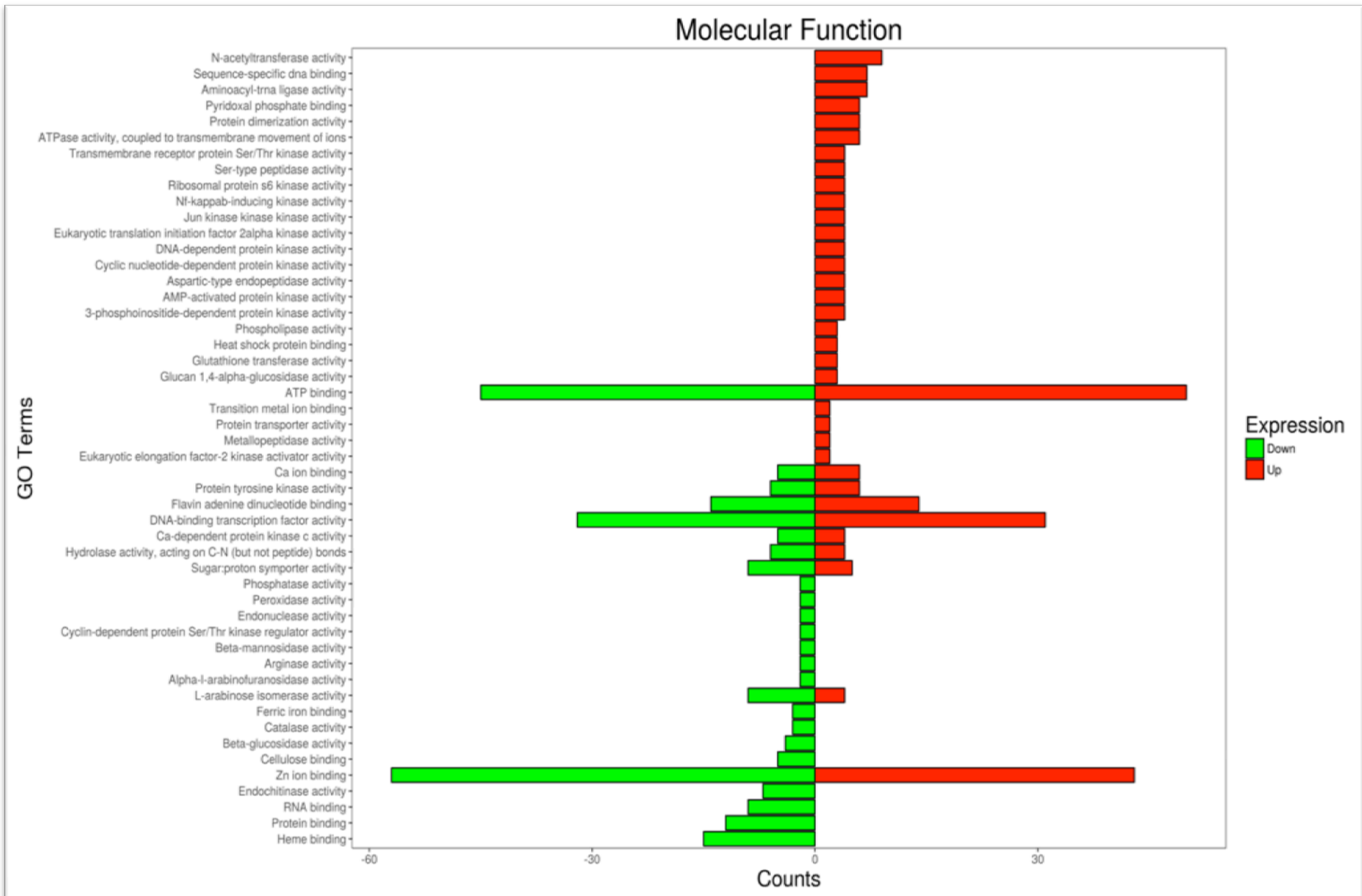


Figura 12. Classificação por termos de GO dos genes identificados como possíveis efetores de *T. asperellum* TR356 durante a interação com as raízes do *Phaseolus vulgaris* em 48 horas (apenas algumas categorias foram selecionadas para a representação no gráfico).

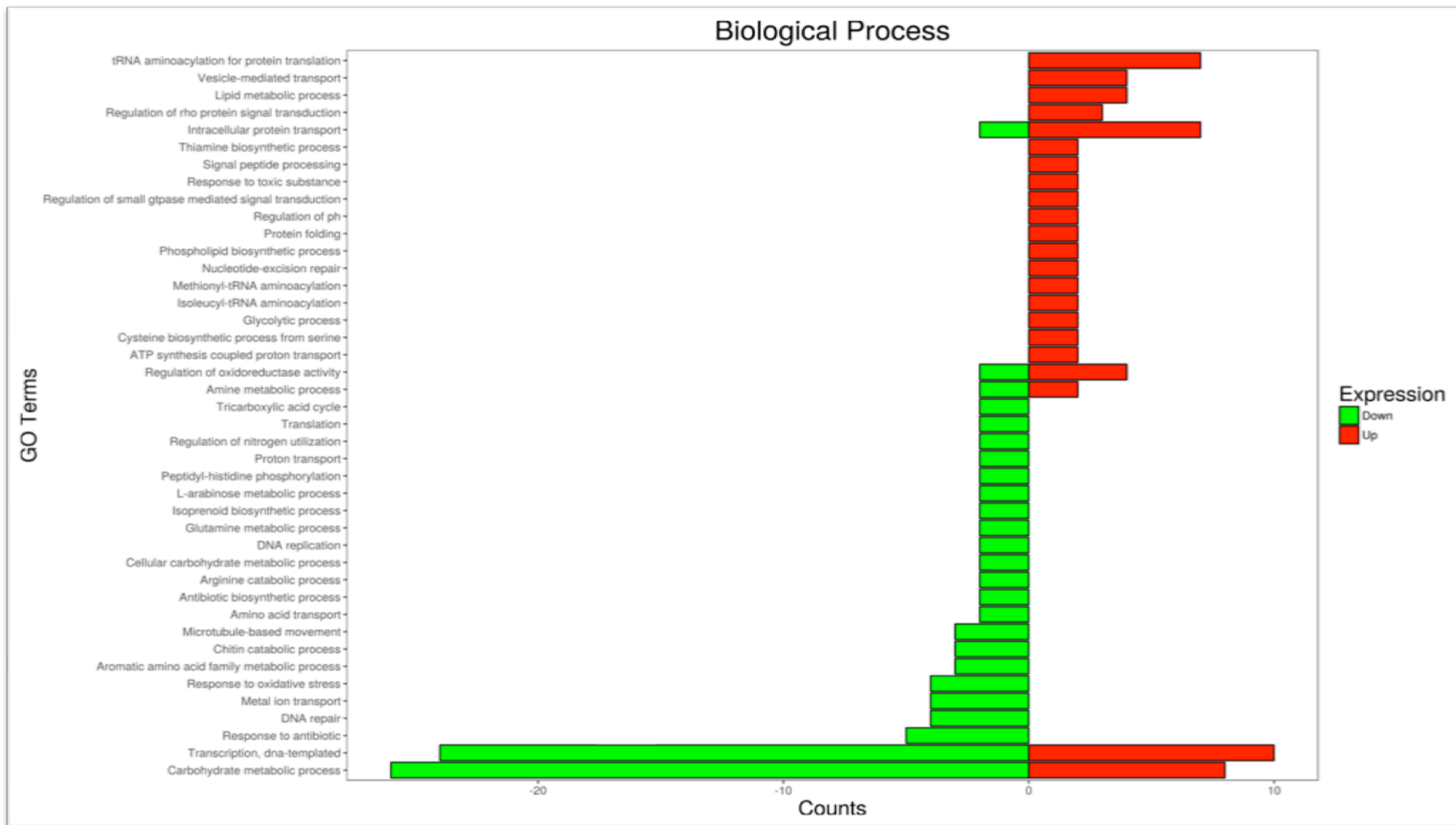


Figura 13. Classificação por termos de GO dos genes identificados como possíveis efetores de *T. asperellum* TR356 durante a interação com as raízes do *Phaseolus vulgaris* em 48 horas (apenas algumas categorias foram selecionadas para a representação no gráfico).

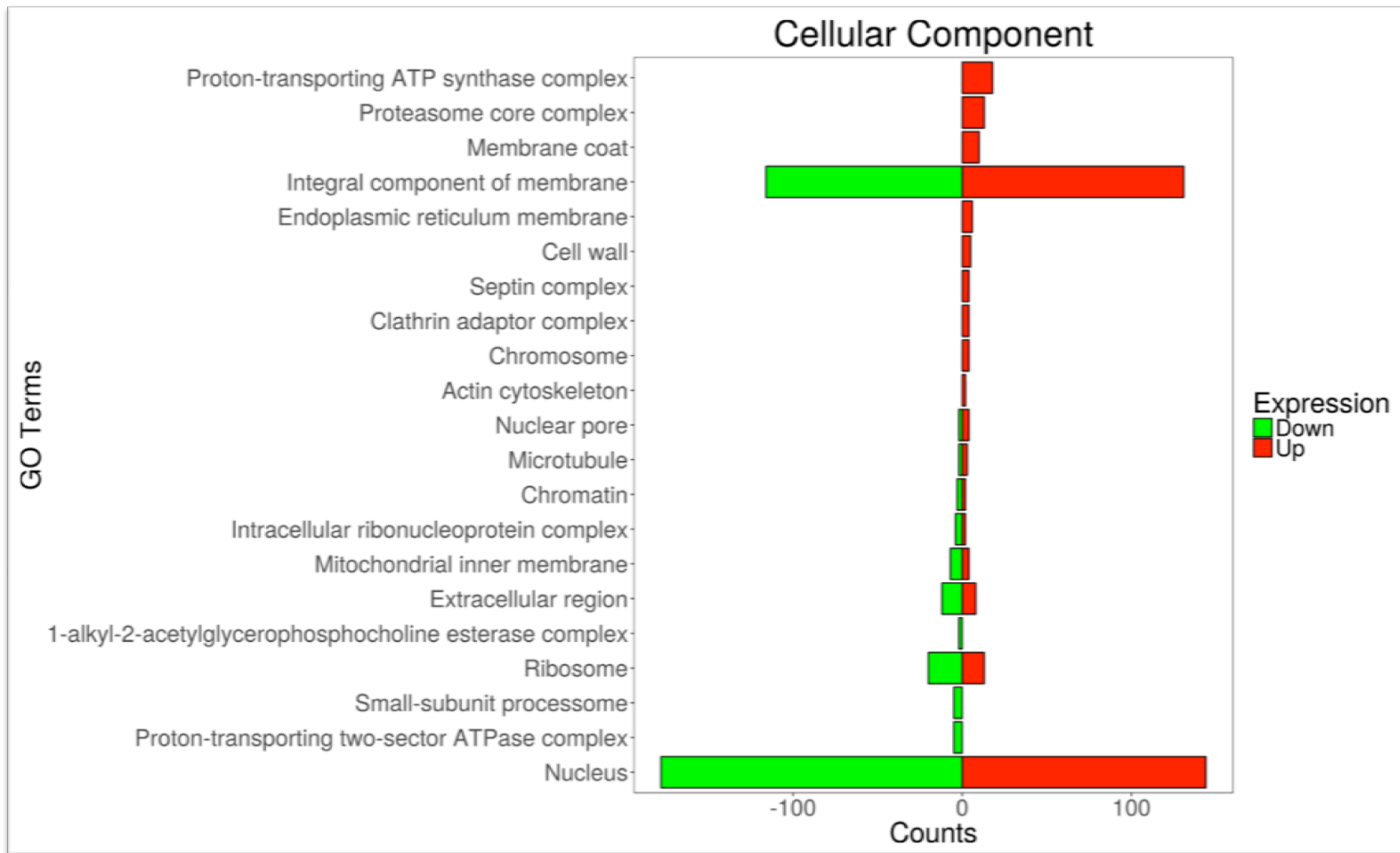


Figura 14. Classificação por termos de GO dos genes identificados como possíveis efetores de *T. asperellum* TR356 durante a interação com as raízes do *Phaseolus vulgaris* em 72 horas (apenas algumas categorias foram selecionadas para a representação no gráfico).

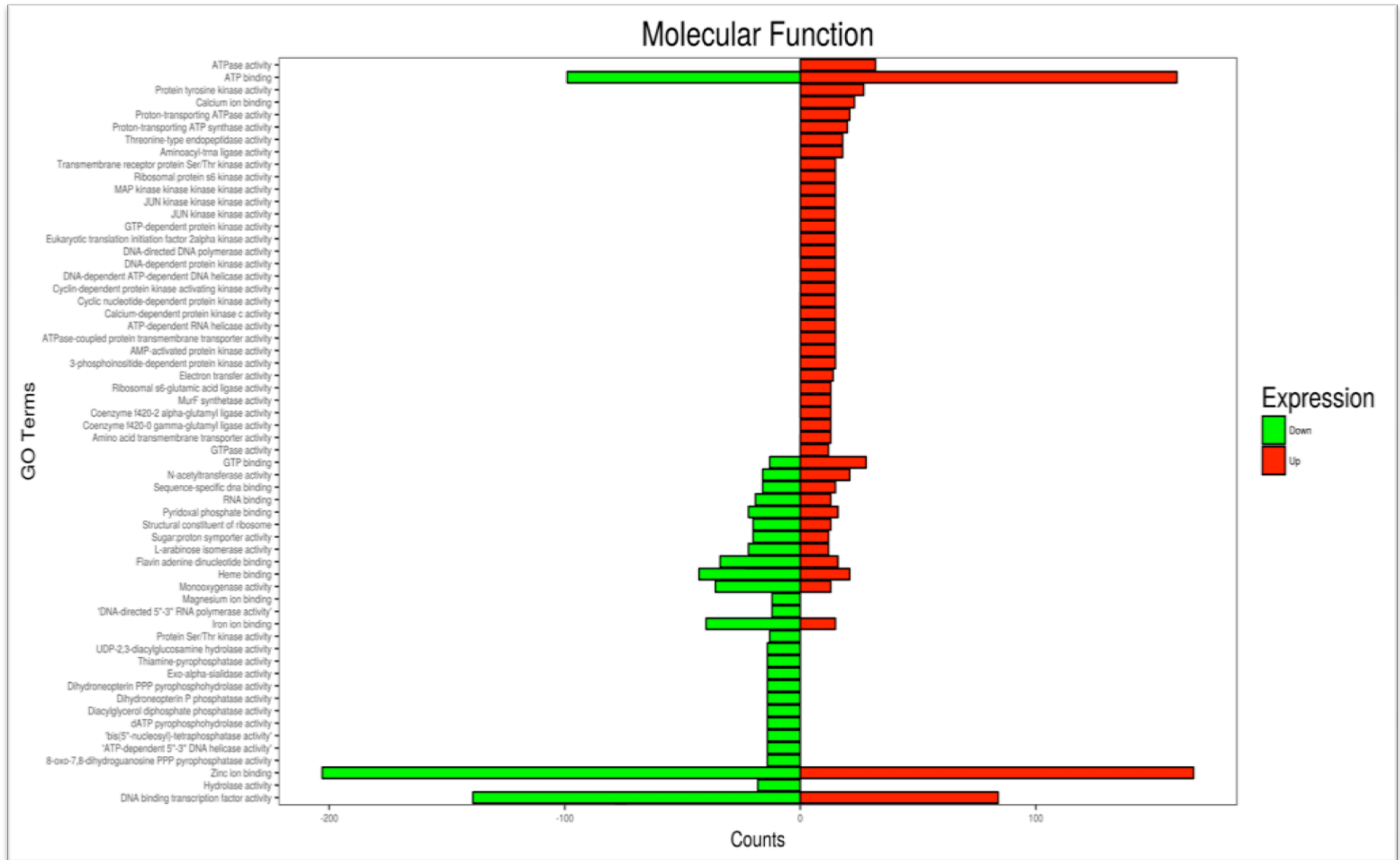


Figura 15. Classificação por termos de GO dos genes identificados como possíveis efetores de *T. asperellum* TR356 durante a interação com as raízes do *Phaseolus vulgaris* em 72 horas (apenas algumas categorias foram selecionadas para a representação no gráfico).

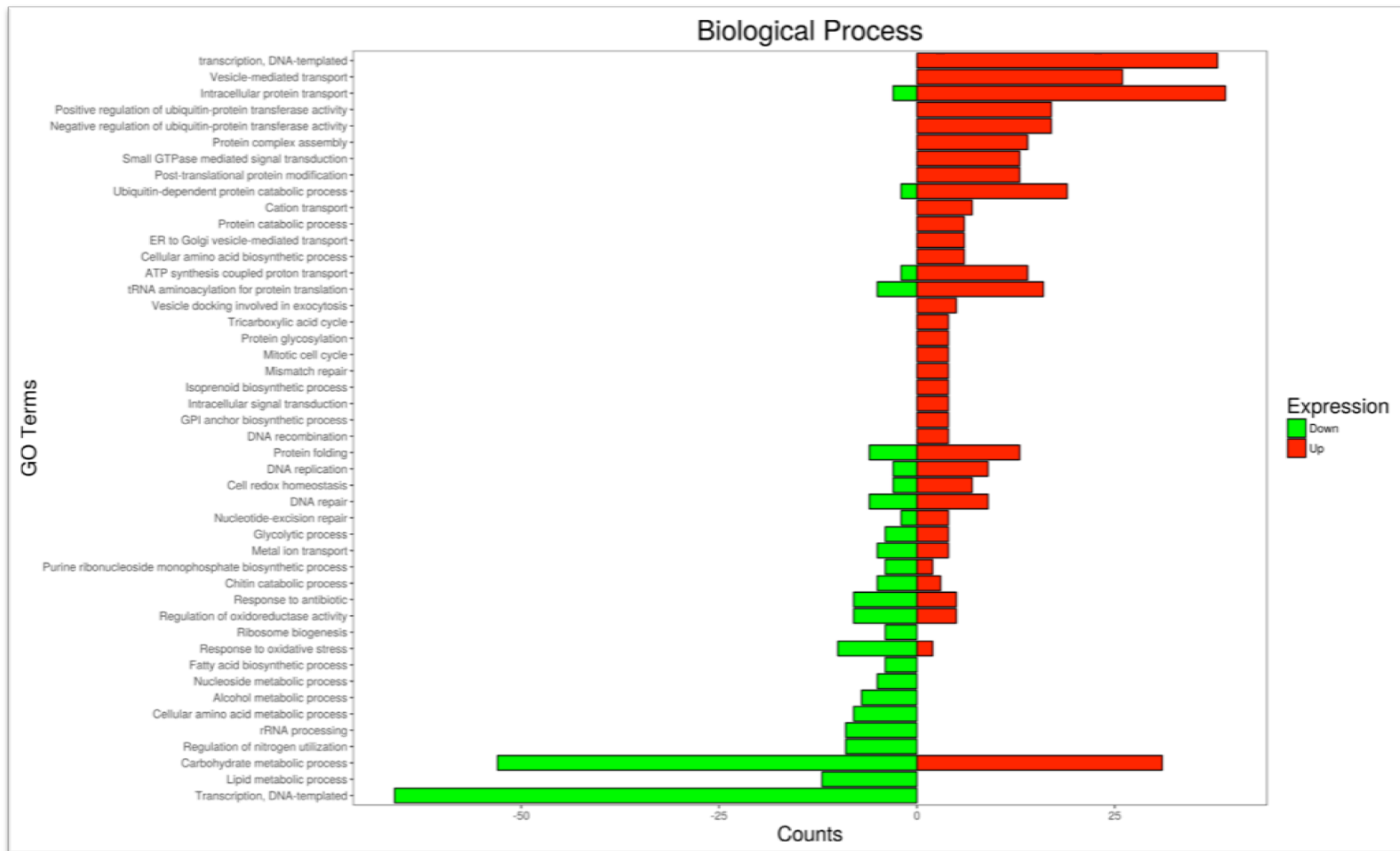


Figura 16. Classificação por termos de GO dos genes identificados como possíveis efetores de *T. asperellum* TR356 durante a interação com as raízes do *Phaseolus vulgaris* em 72 horas (apenas algumas categorias foram selecionadas para a representação no gráfico).

3.2.2 EXPRESSÃO DOS GENES SELECIONADOS DURANTE A INTERAÇÃO *T. asperellum* TR356/FEIJOEIRO COM CAPACIDADE EFETORA

Finalmente, classificamos e agrupamos as proteínas preditas de acordo com as propriedades efetoras identificadas a partir do conjunto completo do proteoma de *Trichoderma* (Tabelas suplementares 1 e 2). Nesta lista de possíveis genes que codificam para efetores de *T. asperellum* selecionamos 8 famílias e 9 sequências, considerando como critério principal que essas sequências fossem representativas para as 8 famílias principais nas quais os genes foram classificados e que tinham preferencialmente um motivo de translocação RxLR ou semelhante a RxLR, são elas:

- i) Proteínas com **domínio CFEM** (*Common in Fungal Extracellular Membranes*) é um domínio de proteína que contém oito cisteínas que, caracteristicamente, o distinguem de outros domínios conhecidos ricos em cisteína. Têm sido associados como receptores de superfície celular, transdutores de sinal, ou como moléculas de adesão em interações patógeno-hospedeiro (Kulkarni et al. 2003).
- ii) **Proteínas tiorredoxina**, que foram identificadas como possíveis efetoras durante a interação fungo-planta por Müller e colaboradores 2008, ou interações micoparasíticas (Horner et al. 2012) e atuando como antioxidantes (Lu Holmgren, 2014);
- iii) **Proteínas com repetições de LysM**, que se ligam a fragmentos de quitina para evitar sua percepção pela planta durante o crescimento do fungo, evitando assim a ativação das respostas imunes das plantas (Kombrink & Thomma, 2013);
- iv) **Proteínas cerato-plataninas**, exclusivas de fungos filamentosos (Kim et al. 2016) capazes de induzir respostas de defesa em plantas como algodão, milho e feijão comum (Djonović et al. 2006; Schmoll & Schuster, 2010);
- v) **Metaloproteases**, conhecidas por serem enzimas proteolíticas de fungos patogênicos associadas à degradação de tecidos (Staats et al. 2013);
- vi) **Cerato-ulmin**, que na década de 90, Bowden et al. (1996) e Zhang et al. (1994) demonstraram que esse grupo de proteínas possui propriedades semelhantes às hidrofobinas II de *Trichoderma spp*, apontando seu envolvimento no desenvolvimento de hifas, esporulação, fixação e colonização da raiz da planta (Dubey, Jensen & Karlsson, 2014), cerato-ulmin também já foi descrita como importante nos processos de ação parasítica (Temple et al. 1997);
- vii) **Serino-proteases**, implicadas no metabolismo fúngico e na formação de apressórios (Donofrio et al. 2006);

viii) **Alginato-liases**, enzimas classificadas como pertencentes à família polissacarídeo liase 7, estão geralmente envolvidas na desconstrução de polissacarídeos complexos, como poliguluronato (ácido gulurónico) e polimanuronato (Wang et al. 2013). No trabalho de Steindorff e colaboradores (2014), os resultados sugerem que esta proteína está relacionada com as lectinas e pode desempenhar papel de mediar o contato físico com o hospedeiro e a elicitação da cascata de sinalização compreendendo proteínas G e MAPKs.

Foi selecionada uma sequência de efetor de *T. asperellum* TR356 para cada uma das 8 famílias descritas anteriormente, que apresentavam funções conhecidas e que estão envolvidas na interação fungo/planta (Tabela 07). Sempre que possível, escolhemos as sequências que contém um motivo de translocação do tipo RxLR ou suas variantes [RKH] x [LYMFIW] [RKH] ou os motivos recentemente discutidos aqui, como W/Y/F-XC. A Tabela 07 lista os efetores selecionados nesse trabalho e suas respectivas famílias, além das estratégias correspondentes que levaram à sua identificação. Esses efetores são descritos com mais detalhes no restante desse trabalho.

Tabela 07. Genes de *T. asperellum* TR356 codificadores de efetores identificados em 48 e 72 horas.

Time	JGI ID	Name	Family	Translocation Motif	Protein Length	Signal Peptide cut off
48 h	32844	tasAly1	Alginate lyase	KTLK	243	22
72 h	444099	tasAly1	Alginate lyase	NA ^a	250	18
72 h	502299	tacfem1	CFEM Domain	YQC	441	22
72 h	296756	tatr1	Thioredoxins	KTLK	498	22
72 h	282175	talysm1	LysM Repeats	RGYR	444	23
72 h	103587	Epl-1	Cerato-platanin	RSLT	139	18
72 h	375957	Tamp1	Metalloproteases	KIFK	348	16
72 h	479303	TasHyd2	Cerato-ulmin	NA ^a	97	16
72 h	303777	tasep1	Serine-proteases	RALR	610	20

NA^a not applicable (não se aplica)

Apenas uma das oito famílias escolhidas da interação fungo/planta foi identificada no secretoma de *Trichoderma* em contato com a planta hospedeira após 48 horas de interação. Entretanto, observamos outras famílias já descritas em estudos anteriores, relacionadas ao micoparasitismo de *Trichoderma*, e essas famílias tiveram alta expressão quando comparadas ao controle, bem como proteases (Steindorff et al. 2014), alginato liases (Qualhato et al. 2013; Steindorff et al. 2014) e glicosil hidrolases (Shaw et al. 2016) (Tabela suplementar 1 e 2).

Em 72 horas de interação, o número de sequências de candidatos a efetores aumentou consideravelmente e estas foram identificadas em pelo menos 67 famílias diferentes. Das 8 famílias selecionadas para identificação de efetores, todas foram identificadas em 72 horas e apenas genes para alginato-liase foram identificados com 48 horas. Todas as 8 sequências selecionadas foram induzidas durante os dois períodos de interação analisados.

O gene **TasHyd1**, responsável pela hidrofobina classe I foi citado por Viterbo & Chet (2006), identificado no secretoma de um isolado de *T. asperellum*, portanto, usaremos a descrição de **TasHyd2** para identificar o gene da hidrofobina classe II (*Hydrophobin class II*), Cerato-ulmin. O nível de transcrição do **TasHyd2** de *T. asperellum* TR356 foi 3,20 vezes maior durante a interação com o feijoeiro quando comparado ao controle. Esta expressão não foi verificada no período inicial (48 horas). Já o gene **tacfem1**, membro da família de domínios CFEM, aumentou sua expressão 4,98 vezes considerando o controle. O gene **Tamp1**, pertencente à família metaloprotease, foi induzido 5,15 vezes em relação ao controle. O gene **tatrx1**, membros da família das tiorredoxinas, aumentou sua expressão 2,80 vezes a mais que o controle. O gene **Tasep1**, pertencente à família das serino-proteases, foi regulado positivamente em 1,60 vezes. O gene **talysm1**, membro da família LysM (*LysM Repeats*), apresentou um aumento de 1,78 vezes na expressão quando comparado ao controle com 72 horas, e em 48 horas de interação, não foi encontrado. Todos esses genes não foram encontrados em 48 horas (Figura 17).

O gene com ID 103587 é anotado no banco de dados do JGI como um **Epl1**, um membro da família cerato-platanina, então usamos a mesma denominação. **Epl1** foi induzido 1,80 vezes durante a interação em 72 horas, e foi reprimido -0,55 vezes em 48 horas quando comparado ao controle. O gene **TasAly** pertence ao alginato-liase e foi induzido 1,40 vezes quando comparado ao controle em 48 horas de interação. O gene **TasAly** também foi identificado em 72 horas e foi induzido 5,10 vezes (Figura 17).

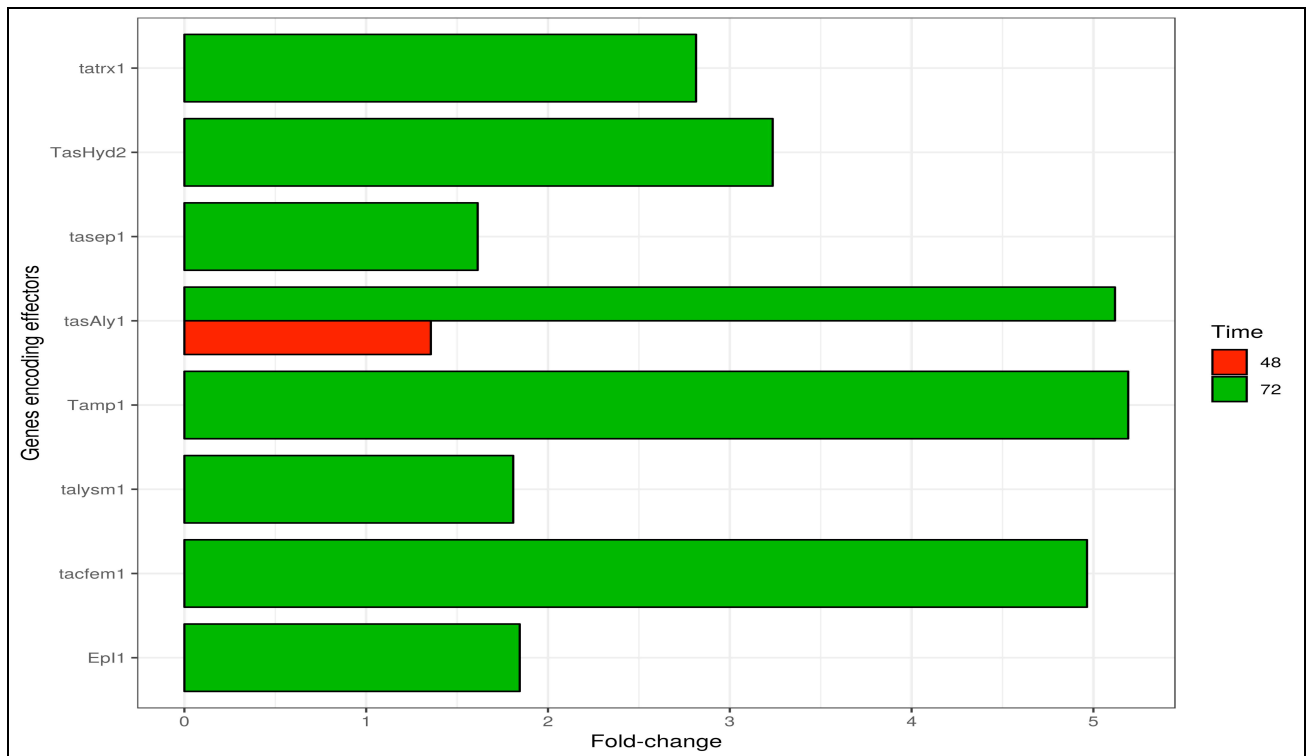


Figura 17. Relação de genes induzidos candidatos a efetores identificados em *T. asperellum* TR356 durante interação com *Phaseolus vulgaris*. Em vermelho o gene identificado durante o tempo de 48 horas de interação e em verde os genes identificados no tempo de 72 horas de interação.

Considerando que no presente trabalho os genes selecionados diferencialmente expressos foram induzidos durante a interação entre *Trichoderma* e *P. vulgaris*, nossos resultados permitem a apresentação de genes que de alguma forma auxiliam no processo de interação fungo/planta. Os genes do fungo que foram induzidos na presença de raízes de feijoeiro foram: Epl-1, talysm1, TasHyd2, tatr1, tacfem1, tasep1, Tamp1 e tasAly1, sugerindo que esses genes podem atuar de alguma forma promovendo uma interação efetiva. O gene tasAly1 foi o único induzido em 48 horas, em 72 horas a expressão do tasAly1 aumentou em torno de 5 vezes. Os demais genes selecionados foram efetivamente induzidos em 72 horas, demonstrando que o aparato transcricional de efetores de *Trichoderma* é maior em nosso período final de análise.

Em relação a cada família gênica e sua possível função, o gene Epl1, membro da família cerato-platanina, foi induzido no período de 72 horas, sua expressão já foi observada em outros trabalhos durante o contato entre fungo/planta hospedeira. No trabalho de Gomes et al. (2015) observou-se que a expressão de Epl-1 está diretamente relacionada ao reconhecimento de *T. harzianum* como um fungo simbiótico durante uma interação com feijoeiro. Salas-Marina et al. (2015), observaram que uma Epl-1 secretada por *T. atroviride* foi capaz de induzir resposta de

resistência local ou sistêmica em tomate (*Solanum lycopersicum*). Assim, é possível determinar por que esse gene foi induzido durante a interação entre *T. asperellum* TR356 e *P. vulgaris* sob nossas condições experimentais. É interessante notar que não surgem novos motivos de sequência ou aminoácidos conservados que diferenciam os efetores cerato-platanina em fungos com compartimento de origem patogênica, mutualista ou saprófita (Hacquard et al. 2016). Nossos resultados mostram que a expressão do gene Epl-1 aumenta na presença da planta, provavelmente atuando como indutor de resistência no hospedeiro.

O membro da família LysM, talysm 1, tem sua expressão aumentada durante o contato físico entre *Trichoderma* e *P. vulgaris*. Os domínios LysM ligam os fragmentos de quitina e podem desempenhar um papel na prevenção da degradação de hifas pelas quitinases da planta, se ligando à quitina da parede fúngica. Existem muitos efetores LysM em fungos filamentosos, estes podem interferir na detecção de quitina pelo hospedeiro, mascarando a interação e interferindo na resposta de defesa da planta (Lamdan et al. 2012). Kombrink et al. (2013) relatam que proteínas LysM podem se ligar a moléculas presentes na quitina, impedindo que elas sejam identificadas pelos receptores de células vegetais, impedindo a resposta imune das plantas. Também tem sido sugerido que esses domínios LysM podem fornecer aos fungos, mecanismo de autoproteção contra suas próprias quitinases (Gruber & Seidl-Seiboth, 2012). Esses dados sugerem que, provavelmente, o LysM atue para prevenir a resposta de defesa do feijoeiro durante a interação com *T. asperellum*, preservando também as hifas do fungo contra a ação das quitinases da planta.

O gene tashyd2, uma cerato-ulmin, membro da família hidrofobina de classe II, foi induzida durante o contato fungo/planta. Essas proteínas são fundamentais durante a interação, permitindo a ligação de hifas fúngicas ao seu hospedeiro. Estudos recentes descrevem essa classe como fundamental para fungos filamentosos durante uma interação, além da similaridade do gene Tashyd2 ao gene HFB7 de *T. virens* (Przylucka et al. 2017). Este estudo também descreve que a expressão de hidrofobina classe II de *T. virens* aumenta nas interações de outros fungos e plantas em resposta a uma diversidade de condições abióticas. Viterbo & Chet (2006) relataram um papel importante da hidrofobina classe I, semelhante a identificada no presente trabalho, na colonização de raízes de plantas por *T. asperellum*. Ruocco et al. (2015) relatam a participação da hidrofobina na interação fungos/plantas induzindo a produção de genes relacionados à defesa e atividade de plantas contra fitopatógenos, indicando sua ação como um potencial efetor. Guzmán-Guzmán et al. (2017) também relatam que a regulação positiva de genes de hidrofobina aumenta a colonização de raízes de tomateiro por *T. virens*. Khang et al. (2008) descrevem que o gene HFB2-6 de *T. asperellum* foi induzido na presença da parede

celular de *A. alternata*, sugerindo sua participação com hospedeiros fúngicos. Vários estudos indicam que essa classe de genes está relacionada ao micoparasitismo. Nossos estudos indicam que esses genes são induzidos durante a interação do *Trichoderma* com raízes de feijoeiro-comum, indicando uma possível ação como efetores.

A expressão do gene *tatr1*, pertencente à família da tiorredoxina, foi observada durante interação entre *T. asperellum* TR356 e feijoeiro. Verificamos que esse gene foi induzido mais tardio do nosso experimento (72 horas), após, o fungo, ter um maior contato com a planta hospedeira, não sendo observado na fase inicial (48 horas). As tiorredoxinas são responsáveis por sustentar um potencial redox adequado (Schmoll et al. 2016). Tobiume et al. (2001) relataram que as tiorredoxinas são fortes candidatas a efetores, pois, desempenham um papel fundamental na inibição da cascata proteolítica que desencadeia a apoptose celular, ligando-se e neutralizando a ação da quinase 1-ASK1-. Alkhalfioui et al. (2008) sugerem que duas tiorredoxinas (*Trxs1* e *Trxs2*) estão intimamente relacionadas à simbiose entre *Medicago truncatula* e *Sinorhizobium meliloti* por sua indução durante uma interação. Wu e colaboradores (2017) identificaram um gene da tiorredoxina em *T. asperellum* após 48 horas, quando o fungo foi exposto a substâncias tóxicas, o que pode evidenciar que esse gene também está associado à desintoxicação celular. O produto do gene *tatr1* de *T. asperellum* TR356, provavelmente desempenha um papel importante na efetividade da simbiose entre o fungo e *P. vulgaris*, provavelmente induzindo a resistência da planta.

Membro da família CFEM, o gene *tacfem1* apresentou expressão durante a interação fungo/feijoeiro. Em *Magnaporthe griseae* (fitopatógeno do arroz) algumas proteínas CFEM codificadoras de Pth11 estão diretamente envolvidas na formação de estruturas responsáveis pela adesão à parede celular da planta (DeZwaan et al. 2013). Proteínas semelhantes foram relatadas em *M. oryzae*, *M. gramar* e *F. graminearum* e estão relacionadas à patogenicidade dessas espécies (DeZwaan et al. 1999). Um membro semelhante foi identificado a partir de *T. atroviride*, *T. virens* e *T. reesei* (Li et al. 2007). O gene PTH 1 de *T. atroviride* foi induzido durante o confronto com *Rhizoctonia solani*, sugerindo sua ação no micoparasitismo de fitopatógenos (Atanasova et al. 2013). O papel dos efetores de CFEM induzidos por *Trichoderma* em uma interação com a planta hospedeira necessita de mais investigação, mas a indução desses efetores de CFEM durante a interação com a planta hospedeira sugere a participação dessas proteínas na comunicação entre o fungo e a planta.

Quanto ao membro da família das metaloproteases, o gene *Tamp1* é induzido durante o contato físico das hifas do fungo com as raízes do *P. vulgaris* em 72 horas de interação. Khang, Park et al. (2008) observaram que o Avr-Pita de *M. grisea* é similar a metaloproteases de

Aspergillus spp. e pode estar relacionado à indução de resistência no arroz. O gene AVR-Pita1, pertencente à superfamília de metaloproteases dependentes de zinco, e foi identificado em *Penicillium citrinum* (Orbach et al. 2000). Guzmán-Guzmán et al. (2017) sugerem que o gene *Tamp1* pode desempenhar um papel como efetor e estar envolvido nos estágios iniciais da interação entre *Trichoderma spp.* e *A. thaliana*. Provavelmente este gene desempenha um papel na indução de resistência de plantas durante a interação, mas seu papel nas interações do *Trichoderma* necessita de mais investigação para reconhecer a função desses genes de maneira mais eficaz.

Em relação aos membros da família das serino-proteases, o gene *tasep1* foi induzido durante a interação de *T. asperellum* RT356 e *P. vulgaris* em 72 horas, não houve identificação de sua expressão na fase inicial (48 horas). As serino-proteases são altamente conservadas em fungos e fundamentais em sua biologia (Pozo et al. 2004). O gene *tvsp1* que codifica uma serino-protease extracelular em *Trichoderma virens* mostrou-se fundamental na colonização e indução de resistência em algodoeiros (Pozo et al. 2004). Guzmán-Guzmán et al. (2017) observaram uma indução do gene *tvsep1* durante a interação entre *Trichoderma spp.* e *A. thaliana* antes e durante o contato. Esses autores também sugerem que os produtos da família das serino-proteases poderiam estar relacionados à proteção das hifas contra a ação degradativa da planta. Em *Magnaporthe grisea* as serino-proteases podem estar diretamente ligadas à infecção por fungos no arroz (Donofrio et al. 2006). A serino-protease tem sido relatada como eficaz no biocontrole de fungos fitopatogênicos, sendo que seu papel na interação entre fungos e plantas necessita de uma melhor investigação.

Finalmente, o gene *tasAly1*, membro da família alginato-liase foi identificado em 48 e 72 horas de interação *T. asperellum*/planta. A alginato-liase foi observada no estudo envolvendo o papel do *Trichoderma* no micoparasitismo, complementando sua atividade clássica de Glicosil Hidrolase (GH) (Steindorff et al. 2014). Esta proteína extracelular foi também identificada em *Aspergillus oryzae* (Singh, Gupta, & Kumari, 2011), *Pseudomonas aeruginosa* (Evans e Linker 1973) *Azotobacter vinelandii* (Gorin e Spencer 1966) e em *Marine Bacterium Vibrio sp.* (Li et al. 2017). Steindorff e colaboradores relataram que a expressão de alginato-liase de *Trichoderma* sugere que este gene está relacionado com as lectinas e pode desempenhar um papel mediador do contato físico com o hospedeiro e elicitação da cascata de sinalização, incluindo as proteínas G e MAPKs. Não há relatos experimentais sobre a ação da proteína alginato-liase como efetor durante o contato entre o fungo e a planta, logo, mais estudos são necessários para esclarecer sua ação.

3.3 CONCLUSÃO

Nosso grupo é o primeiro a investigar a ação de efetores durante a interação de *T. asperellum* com as raízes de *Phaseolus vulgaris*. Estes resultados mostram que os genes selecionados de *T. asperellum* foram induzidos durante o contato entre o fungo e a planta hospedeira, principalmente em 72 horas de interação. O padrão de expressão também sugere que esses genes podem participar no estabelecimento da interação benéfica devido ao seu maior nível de expressão na presença da planta.

Identificamos que as atividades típicas dos efetores de *Trichoderma asperellum* em contato com o feijoeiro-comum incluem: inibição enzimática (hidrolases) no apoplasto; inibição de proteínas relacionadas à defesa da planta; controle e interferência na secreção de proteínas e tráfico de vesículas; inibição de cascatas de sinalização por MAP-quinases; alteração do transcrito envolvido em resposta de defesa e associação entre as hifas do fungo com as células da planta.

Os dados de RNA-seq apresentados neste trabalho não só contribuirá para o entendimento dos mecanismos de interação do *Trichoderma asperellum* com a planta hospedeira, mas também fornecerão informações relevantes sobre a ação das proteínas efetoras durante a interação “*in vivo*” do *Trichoderma* com diferentes espécies de vegetais. Os efetores encontrados no secretoma do *T. asperellum* podem ter um papel importante na associação entre as hifas do fungo com as células da planta, permitindo a sua colonização, promovendo uma resposta à defesa da planta, proteção das células fúngicas e suporte para uma interação bem sucedida. Nossos dados de transcrito representam um avanço importante para o entendimento do processo de simbiose do *Trichoderma* durante a interação com o feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris*). Estudos adicionais para a caracterização funcional de genes que são possíveis candidatos a efetores relatados aqui são necessários para melhor definir os mecanismos exatos envolvidos na simbiose entre *T. asperellum* e a planta hospedeira.

Como perspectivas, sugerimos o emprego de técnicas tanto de genômica, quanto de transcrito, visando a busca por respostas adaptativas da planta às moléculas efetoras, com o intuito de evidenciar a coevolução desse sistema tão importante.

3.4 REFERÊNCIAS

Alkhalfioui F, Renard M, Frendo P, Keichinger C, Meyer Y, Gelhaye E, et al. 2008. A novel type of thioredoxin dedicated to symbiosis in legumes. *Plant Physiol.* 148:424–35.

Atanasova, L., Crom, S. Le, Gruber, S., Couplier, F., Seidl-Seiboth, V., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. 2013. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma mycoparasitism*. *BMC Genomics*, 14(1), 121. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-121>

Bhattacharjee S, Hiller NL, Liolios K, Win J, Kanneganti T-D, Young C, et al. 2006. The malarial host-targeting signal is conserved in the Irish potato famine pathogen. *Plos Pathog.* 2:e50.

Bowden, C. G., E. Smalley, R. P. Guries, M. Hubbes, B. Temple, and P. A. Horgen. 1996. Lack of association between cerato-ulmin production and virulence in *Ophiostoma novo-ulmi*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:556–564.

DeZwaan TM, Carroll AM, Valent B, Sweigard JA. 2013. *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell* 11:2013–2030.

Donofrio, N. M., Oh, Y., Lundy, R., Pan, H., Brown, D. E., Jeong, J. S., ... Dean, R. A. 2006. Global gene expression during nitrogen starvation in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology*, 43(9), 605–617. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.03.005>

Dou D, Kale SD, Wang X, Jiang RHY, Bruce NA, Arredondo FD, et al. 2008. RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. *Plant Cell.* 20:1930–47.

Dubey, M.K., Jensen, D.F., Karlsson, M. 2014. Hydrophobins are required for conidial hydrophobicity and plant root colonization in the fungal biocontrol agent *Clonostachys rosea*. *BMC Microbiology* 14:18

Evans LR, Linker A 1973. Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 116:915–924

Fischer-Parton, S., Parton, R. M., Hickey, P. C., Dijksterhuis, J., Atkinson, H. A. and Read, N. D. 2000. Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *Journal of Microscopy*, 198: 246–259. doi:10.1046/j.1365-2818.2000.00708.x

Godfrey D, Böhlenius H, Pedersen C, Zhang Z, Emmersen J, Thordal- Christensen H. 2011. Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif. *BMC Genomics.* 11:317.

Gomes, E. V., Costa, M. D. N., de Paula, R. G., Ricci de Azevedo, R., da Silva, F. L., Noronha, E. F., ... Nascimento Silva, R. 2015. The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self cell wall protection. *Scientific Reports*, 5(October), 17998. <https://doi.org/10.1038/srep17998>

- Gorin PAJ, Spencer JFT 1966.** Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. Can J Chem 44:993–998
- Guyon K, Balagué C, Roby D, Raffaele S. 2014.** Secretome analysis reveals effector candidates associated with broad host range necrotrophy in the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. BMC Genomics. 15:336.
- 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 Genetics (2017) 18:16 Doi 10.1186/s12863-017-0481-y
- Hacquard, S., Kracher, B., Hiruma, K., Munch, P.C., Garrido- Oter, R., Thon, M.R., Weimann, A., Damm, U., Dallery, J.F., Hainaut, M., Henrissat, B., Lespinet, O., Sacristan, S., Ver Loren van Themaat, E., Kemen, E., McHardy, A.C., Schulze-Lefert, P., O’Connell, R.J., 2016.** Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi. Nat. Commun. 7, 11362.
- Horner NR, Grenville-Briggs LJ, van West P. 2012.** The oomycete *Pythium oligandrum* expresses putative effectors during mycoparasitism of *Phytophthora infestans* and is amenable to transformation. Fungal Biol. 116:24–41. Elsevier Ltd.
- Kale SD, Tyler BM. 2011.** Entry of oomycete and fungal effectors into plant and animal host cells. Cell Microbiol. 13:1839–48.
- Kamoun S. Groovy times: 2007.** filamentous pathogen effectors revealed. Curr Opin Plant Biol. 10:358–65.
- Kamoun, S. 2006.** A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. Annu. Rev. Phytopathol. 44:41-60.
- Khang CH, Park S, Lee Y, Valent B, Kang S. 2008.** Genome Organization and Evolution of the AVR-Pita Avirulence Gene Family in the *Magnaporthe grisea* Species Complex. Mol Plant Microbe Interact. 21:658–70.
- Kombrink, A., & Thomma, B. P. H. J. 2013.** LysM Effectors: Secreted Proteins Supporting Fungal Life. *PLoS Pathogens*, 9(12), e1003769. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003769>
- Kulkarni RD, Kelkar HS, Dean RA, Choi W, Dean RA, et al. 2003.** An eight cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. Trends Biochem Sci. 28:118–21. Elsevier Ltd.
- Lamdan, N.-L., Shalaby, S., Ziv, T., Kenerley, C. M., & Horwitz, B. a. 2015.** Secretome of *Trichoderma* interacting with maize roots: role in induced systemic resistance. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 14(4), 1054–63. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.046607>
- Lévesque CA, Brouwer H, Cano L, Hamilton JP, Holt C, Huitema E, et al. 2010.** Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. Genome Biol. 11:R73. BioMed Central.
- Li M, Yang Q 2007.** Isolation and characterization of a β -tubulin gene from *Trichoderma harzianum*. Biochem. Genet. 45: 529-534.

Li, Y. Wang, L. Fu, Y. Gao, H. Zhao, W. Zhou 2017. Aerobic-heterotrophic nitrogen removal through nitrate reduction and ammonium assimilation by marine bacterium *Vibrio* sp. Y1-5 Bioresour. Technol., 230 pp. 103-111

Lu J, Holmgren A. 2014. The thioredoxin antioxidant system. Free Radic Biol Med. 66:75–87. Elsevier Ltd.

Marshall, R., Kombrink, A., Motteram, J., Loza-Reyes, E., Lucas, J., Hammond-Kosack, K. E., ... Rudd, J. J. 2011. Analysis of Two in Planta Expressed LysM Effector Homologs from the Fungus *Mycosphaerella graminicola* Reveals Novel Functional Properties and Varying Contributions to Virulence on Wheat. *PLANT PHYSIOLOGY*, 156(2), 756–769. <https://doi.org/10.1104/pp.111.176347>

Müller O, Schreier PH, Uhrig JF. 2008. Identification and characterization of secreted and pathogenesis-related proteins in *Ustilago maydis*. Mol Genet Genomics. 279:27–39.

Orbach, M. J., Farrall, L., Sweigard, J. A., Chumley, F. G., and Valent, B. 2000. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. Plant Cell 12:2019-2032.

Pereira JL, Queiroz RM, Charneau SO, Felix CR, Ricart CA, da Silva FL, Steindorff AS, Ulhoa CJ, Noronha EF 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. 30;9(5).

Plett JM, Daguerre Y, Wittulsky S, Vayssières A, Deveau A, Melton SJ, et al. 2014; Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. Proc Natl Acad Sci. 111:8299–304.

Plett JMM, Kemppainen M, Kale SDD, Kohler A, Legué V, Brun A, et al. 2011. A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. Curr Biol. 21:1197–203.

Pozo, M. J., Baek, J.-M., García, J. M., & Kenerley, C. M. 2004. Functional analysis of *tvsp1*, a serine protease-encoding gene in the biocontrol agent *Trichoderma virens*. *Fungal Genetics and Biology*, 41(3), 336–348. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2003.11.002>

Przylucka, A., Bayram Akcapinar, G., Chenthamara, K., Cai, F., Grujuc, M., Karpenko, J., ... Druzhinina, I. S. 2017. HFB7 - a novel orphan hydrophobin of the *Harzianum* and *Virens* clades of *Trichoderma*, is involved in response to biotic and abiotic stresses. *Fungal Genetics and Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.01.002>

Qualhato, T. F., Lopes, F. A. C., Steindorff, A. S., Brandão, R. S., Jesuino, R. S. A., & Ulhoa, C. J. 2013. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: Evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 35(9), 1461–1468. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1225-3>

Ruocco M, Lanzuise S, Lombardi N, Woo SL, Vinale F, Marra R, et al. 2015. Multiple roles and effects of a novel *Trichoderma* Hydrophobin. Mol Plant Microbe Interact. 28:167–79.

Salas-Marina MA, Isordia-Jasso MI, Islas-Osuna MA, Delgado-Sánchez P, Jiménez-Bremont JF, Rodríguez-Kessler M, et al. 2015. The Epl1 and Sml proteins from

Trichoderma atroviride and *Trichoderma virens* differentially modulate systemic disease resistance against different life style pathogens in *Solanum lycopersicum*. *Front Plant Sci.* 6:1–13.

Schmoll, C. Dattenbock, N. Carreras-Villasenor, A. Mendoza Mendoza, et al. 2016. The Genomes of three uneven siblings: footprints of the lifestyles of three *Trichoderma* Species *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 80 pp. 205-327

Singh, S.P. 2001. Broadening the genetic base of common bean cultivars: a review. *Crop Science, Madison*, v. 41, n. 6, p. 1659-1675.

Staats CC, Kmetzsch L, Schrank A, Vainstein MH. 2013. Fungal zinc metabolism and its connections to virulence. *Front Cell Infect Microbiol.* 3:1–7.

Steindorff, A. S., Ramada, M. H. S., Coelho, A. S. G., Miller, R. N. G., Pappas, G. J., Ulhoa, C. J., & Noronha, E. F. 2014. Identification of mycoparasitism- related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. *BMC Genomics*, 15, 204. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-204>

Temple, B., P. A. Horgen, L. Bernier, and W. E. Hintz. 1997. Cerato-ulmin, a hydrophobin secreted by the causal agents of Dutch Elm disease, is a parasitic fitness factor. *Fungal Genet. Biol.* 22:39–53.

Tobiome K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita KI, Takeda K, et al. 2001. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep.* 2:222–8.

Viterbo, A. D. A., & Chet, I. 2006. TasHyd1 , a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization, 7, 249–258. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2006.00335.X>

Wawra S, Trusch F, Matena A, et al. 2016. The RxLR Motif of the Host Targeting Effector AVR3a of *Phytophthora infestans* Is Cleaved before Secretion. *Plant Cell.* 29(6):1184-1195.

Whisson SC, Boevink PC, Moleleki L, Avrova AO, Morales JG, Gilroy EM, et al. 2007. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature.*;450:115–8.

Wu, Q., Zhang, L., Xia, H., Yu, C., Dou, K., Li, Y., & Chen, J. 2017. Omics for understanding synergistic action of validamycin A and *Trichoderma asperellum* GDFS1009 against maize sheath blight pathogen. *Scientific Reports*, 7(January), 40140. <https://doi.org/10.1038/srep40140>

Zhang, L., D. Villion, Y. Sun, P. Kazmierczak, and N. K. Van Alfen. 1994. Virus-associated down-regulation of the gene encoding cryparin, an abundant cell-surface protein from the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Gene* 139:59–64.

Zhou, Lu et al. 2018. “Superresolution and Pulse-Chase Imaging Reveal the Role of Vesicle Transport in Polar Growth of Fungal Cells.” *Science Advances* 4.1 e1701798. *PMC*. Web. 7 Mar.

4. ANEXO

Tabela suplementar 1. Catálogo de candidatos a efetores de *Trichoderma asperellum* TR356. Lista completa dos possíveis genes candidatos a efetores de *T. asperellum* TR356 durante a interação com *Phaseolus vulgaris* em 48 horas. Em amarelo, família selecionada para discussão na Tese. Em laranja, proteína selecionada para discussão na Tese. Em verde, proteínas encontradas nos dois tempos analisados. “na” not aplicable (não há motivo de translocação identificado).

JGI ID	Protein Length	Translocation Motif	Signal peptide cut off	SSCP
Alginate lyase (IPR014895, PF08787)				
32844	243	KTLK	22	yes
441906	250	na	20	no
444099	250	na	18	no
Aspartyl protease (IPR001461, PF00026)				
207401	516	RSFK	20	no
404360	392	KFFK	21	no
449084	354	YPC	16	no
acid phosphatase (IPR004843, PF00149)				
240153	689	RFLH	32	no
270837	770	YSC	20	no
Peroxidase (IPR002889, PF01822)				
463119	1581	RSLK	17	no
470579	913	na	20	no
Hsp70 protein (IPR001023, PF00012)				
46947	942	KSFK	25	no
Fibronectin type III domain (IPR003961, PF00041)				

208285	161	na	24	no
Cupin (IPR011051, PF00190)				
140375	408	RILK	18	no
DnaJ domain (IPR001623, PF00226)				
161012	415	KSIK	19	no
alpha/beta hydrolase fold (IPR016292, PF00561; IPR013094, PF07859)				
431746	432	RMYK	19	no
442321	303	YLC	26	no
Glycosyl hydrolases family 2 (IPR017853, PF00703)				
439586	943	RNIR	20	no
Beta-N-acetylhexosaminidase (IPR015882, PF00728)				
494558	610	KTFK	19	no
Alpha-D-galactosidase (melibiase) (IPR000111, PF02065)				
440149	441	YHC	27	no
Fasciclin domain (IPR000782, PF02469)				
194820	224	RILH	19	no
Peptidase family S41 (IPR005151, PF03572)				
474479	739	KCLK	20	no
mannan endo-1,6-alpha-mannosidase (IPR008928, PF03663)				
484755	450	RSLK	21	no
Metal-independent alpha-mannosidase (GH125) (IPR008928, PF06824)				
144995	545	RVIK	24	no
prenylcysteine oxidase (IPR010795, PF07156)				
367842	558	KFLK	19	no
Chitosanase_fungal (IPR009939, PF07335)				

401302	308	na	19	yes
Glucanosyltransferase (IPR012946, PF07983)				
368416	522	KKYR	22	no
FAD binding domain (IPR006094, PF08031)				
497551	508	na	24	no
<i>No hit</i>				
36470	321	YSC	17	no
193473	408	na	23	no
206561	322	na	18	no
389334	279	na	16	no
404953	610	YSC	20	no
442184	412	KELR	31	no
12616	544	KSIK	16	no
25664	443	RPLR	20	no
31923	361	na	16	no
39898	136	na	19	yes
142332	307	YMC	20	yes
209340	553	na	19	no
246544	308	na	20	yes
254597	438	FPC	20	no
265094	168	FPC	19	no
282582	213	FSC	21	no
378026	124	RNIH	19	yes
389732	514	RRLR	21	no
406887	207	HSFR	18	no

438627	189	KLFR	18	yes
439023	152	na	17	yes
444248	149	na	17	no
445580	323	na	17	no
450723	155	RAMR	23	no
502180	450	RSFR	18	no
511036	142	na	23	no
478263	430	KHFK	29	no

Tabela suplementar 2. Catálogo de candidatos a efetores de *Trichoderma asperellum* TR356. Lista completa dos possíveis genes candidatos a efetores de *T. asperellum* TR356 durante a interação com *Phaseolus vulgaris* em 72 horas. Em amarelo, família selecionada para discussão na Tese. Em laranja, proteína selecionada para discussão na Tese. Em verde, proteínas encontradas nos dois tempos analisados. “na” not applicable (não há motivo de translocação identificado).

JGI ID	Protein Length	Translocation Motif	Signal peptide cut off	SSCP
CFEM domain (IPR014005, PF05730)				
467894	307	na	17	no
69692	204	YQC	17	yes
Thioredoxin (IPR006662, PF00085)				
296756	496	KTLK	22	no
365949	452	na	22	no
454715	368	na	18	no
Cerato-ulmin_hydrophobin (IPR010636, PF06766)				
464064	97	na	16	yes
479303	97	na	16	yes
373385	107	na	16	yes
403021	102	FDC	15	yes
LysM domain (IPR002482, PF01476)				
282175	444	RGYR	23	no
481084	686	YTC	19	no
Cerato-platanin (IPR010829, PF07249)				
103587	139	RSLT	18	no
Alginate lyase (IPR008985, PF08787)				

444099	250	na	18	no
Serine proteases (IPR000209, PF00082; IPR000209, PF09286; IPR009003, PF00089)				
303777	610	RALR	20	no
475054	536	KKIH	15	no
243860	256	na	19	no
394405	943	RALK	18	no
253147	401	KMIR	20	no
Metalloproteases (IPR001384, PF02102)				
375957	348	KIFK	16	no
Serine carboxypeptidase (IPR001563, PF00450)				
50741	551	KDLK	18	no
Aspartyl protease (IPR009007, PF00026)				
231186	406	FDC	18	no
418346	402	FDC	24	no
196288	396	HKMK	17	no
Hsp70 protein (IPR001023, PF00012)				
46947	942	KEIR	25	no
474781	663	KDLK	33	no
Cellulase (glycosyl hydrolase family 5) (IPR001547, PF00150)				
483548	410	RSYK	26	no
467622	444	KLMK	19	no
DnaJ domain (IPR001623, PF00226)				
161012	415	HGIR	19	no
60305	517	RQIK	22	no
alpha/beta hydrolase fold (IPR000073, PF00561)				
445315	344	na	19	no

375006	353	YTC	19	no
Chitinase (IPR011583, PF00704)				
130159	396	RELR	21	no
366664	516	RSMK	18	no
licheninase, Glycosyl hydrolases family 16 (IPR000757, PF00722)				
471178	382	HEYR	25	no
84110	285	KLFH	21	no
65627	476	na	18	no
beta-glucosidase, Glycosyl hydrolase family 3 N terminal domain (IPR001764, PF00933)				
385792	885	RRIK	20	no
457406	892	RTMH	27	no
beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase, contains WSC domain (IPR013994, PF01822)				
470579	913	na	19	no
463119	1581	RSLK	17	no
492743	1581	YKC	17	no
FAD binding domain (IPR016166, PF01565)				
497551	508	na	24	no
211762	575	HNLK	21	no
mannan endo-1,6-alpha-mannosidase, GH76 (IPR005198, PF03663)				
484755	450	RSLK	21	no
371963	598	na	21	no
alpha-glucosidase (IPR012913, PF07915)				
475274	562	RSIR	21	no
283052	501	RQLR	18	no
Glucanosyltransferase, Glycoside_hydrolase_SF (IPR004886, PF07983)				
368416	522	KKYR	22	no

34239	545	KKYR	19	no
calcium ion binding (IPR002048, PF00036)				
261602	200	KFLR	16	no
Fibronectin type III domain (IPR008957, PF00041)				
208285	161	na	24	no
Chaperonin_TCP-1_CS (IPR012719, PF00118)				
470933	87	na	22	no
glucose-1-phosphate uridylyltransferase (IPR011004, PF00132)				
26877	557	na	23	no
Beta-lactamase (IPR012338, PF00144)				
247583	551	RTLH	22	no
Calcineurin-like phosphoesterase (IPR011001, PF00149)				
191302	643	YIC	21	no
peptidylprolyl isomerase (IPR002130, PF00160)				
371399	208	RVIK	27	no
Cupin (IPR006045 , PF00190)				
140375	408	RELH	18	no
Helicase_C (IPR014021, PF00270)				
261381	1665	RHYH	20	no
acid phosphatase (IPR000560, PF00328)				
157147	557	RQIR	21	no
Arginase family protein (IPR010916, PF00491)				
476031	401	RSFH	28	no
alpha-glucosidase (IPR000322, PF01055)				
465405	966	KKIK	30	no
Cutinase (IPR008262, PF01083)				

228308	307	na	20	no
emp24/gp25L/p24 family of membrane trafficking proteins (IPR009038, PF01105)				
217289	220	RVIR	16	no
FAD dependent oxidoreductase (IPR003042, PF01266)				
187800	411	RLIK	23	no
Glycosyl hydrolase, family 47 (IPR001382, PF01532)				
438777	1064	RDIR	21	no
Beta-glucocerebrosidase (IPR001139, PF02055)				
401341	493	WHC	18	no
beta-N-acetylhexosaminidase (IPR017853, PF02838)				
494558	610	KTFK	19	no
Kinase-like_dom (IPR004119, PF02958)				
306661	417	RSMK	25	no
mannosyl-oligosaccharide glucosidase (IPR008928, PF03200)				
189798	815	REIK	20	no
Glycosyl hydrolase family 61 (IPR005103, PF03443)				
467959	373	FVC	20	no
Peptidase family S41 (IPR005151, PF03572)				
474479	739	KCLK	20	no
Endoplasmic reticulum membrane-associated oxidoreductin involved in disulfide bond formation (IPR007266, PF04137)				
451750	588	RIYR	22	no
Oligosaccharyltransferase, alpha subunit (ribophorin I) (IPR007676, PF04597)				
368616	485	KPYR	20	no
UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase (IPR009448, PF06427)				
367109	1488	RPYH	23	no
Protein of unknown function (DUF1349) (IPR009784, PF07081)				

468733	236	RFIK	19	no
TAP-like protein (IPR013595, PF08386)				
448717	611	na	18	no
Killer_tox_Kp4 (IPR015131, PF09044)				
65279	153	YGC	19	yes
<i>No Hit</i>				
36470	321	YSC	17	no
432956	513	KRLK	18	no
477709	724	YSC	19	no
17681	696	FFC	19	no
50106	317	na	18	no
387484	1861	RKIK	23	no
253404	421	RSFH	19	no
220137	416	na	27	no
379992	96	HSIR	18	no
187809	442	na	20	no
388029	150	na	17	yes
206561	322	na	18	no
10870	130	na	19	yes
442184	412	KELR	31	no
188105	186	FTC	23	yes
81438	234	YSC	17	no
521002	262	na	20	no
513432	320	HRYH	20	no
432416	451	na	21	no

392548	218	na	17	yes
302019	86	na	34	yes
461959	256	YTC	17	no
498336	401	KGYH	20	no
444248	149	na	17	no
458186	486	RCYK	26	no
502180	450	RSFR	18	no
516814	404	na	23	no
123342	171	YNC	20	yes
121820	111	na	18	no
113863	87	na	29	no
446808	155	na	17	no
174703	197	YNC	16	no
446640	281	KKLK	35	no
254597	438	FPC	20	no
31923	361	na	16	no
281685	232	na	22	no
265094	168	FPC	19	no
137709	119	KRWR	30	no
12616	544	KSIK	16	no
282582	213	FSC	21	no
240513	576	RSLH	18	no
44131	75	YFC	42	yes
482226	212	RRMR	16	no
163381	234	na	17	yes
193019	99	na	33	no

523127	123	RLLR	24	yes
199618	208	na	16	yes
478263	430	KHFK	29	no
93312	101	RRYR	16	no
65020	101	na	18	no
456957	244	YKC	29	no
406887	207	HSFR	18	no
113437	406	HLLR	18	no
448728	298	RLFK	18	no
246544	64	na	18	yes
215220	198	RVWR	22	no
372599	235	na	18	yes
10743	284	RYFK	21	no
149715	291	YGC	18	no
62685	105	na	27	yes
198570	586	RDLR	15	no
482476	1166	RTWR	20	no
205952	329	na	20	no
227926	86	KGIK	16	no
6294	189	na	18	no
467880	398	KDIK	20	no
277057	119	RRFR	17	no
