

Universidade de Brasília

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana

Análise da associação e do secretoma da interação entre *Trichoderma spp.* de Solo do Cerrado com Feijoeiro Comum, *Phaseolus vulgaris* L.

Francilene Lopes da Silva

Orientador(a): Prof. Dr^a. Eliane Ferreira Noronha

Co-orientadora: Dr^a. Elaine Nascimento Aquino

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

Brasília, DF

Fevereiro de 2014

Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana
Laboratório de Enzimologia

Análise da associação e do secretoma da interação entre *Trichoderma spp.* de Solo do Cerrado com Feijoeiro Comum, *Phaseolus vulgaris* L.

Francilene Lopes Da Silva

Co-orientadora: Dr^a. Elaine Nascimento Aquino

Orientadora: Prof. Dr^a. Eliane Ferreira Noronha

Brasília, DF
Fevereiro de 2014

De tudo ficam três coisas:

A certeza de que estamos sempre
começando...

A certeza de que precisamos
continuar...

A certeza de que seremos
interrompidos antes de terminar...

Portanto, devemos:

Fazer da interrupção um caminho
novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...



(Fernando Pessoa)

Dedico,

Ao meu avô Antonio Sampaio (in memorian),

**“Na simplicidade do conhecimento foi exemplo de
determinação, amor e bondade”.**

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre comigo, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e mostrar o caminho nas horas incertas.

Aos meus pais, Noeme Lopes e Francisco de Assis, exemplo de caráter, responsabilidade e respeito. Por acreditarem em mim, pelo amor e por todo sacrifício para que eu continuasse estudando. Aos meus queridos irmãos, Francisca, Karine, Noé e Maria, pelos conselhos, pelo imenso carinho, amizade, por tudo de bom que já vivemos juntos e pelo que ainda vamos viver. Pelo apoio incondicional as minhas escolhas e por se alegrarem com minhas conquistas. Eu os amo muito!

Ao meu namorado Weliton, pela presença, por nossos sonhos, pelo carinho e apoio nos estudos, por tornar minha vida mais bonita, por alegrar meus dias e sempre encontrar uma maneira de me fazer sorrir.

A minha orientadora em especial, Eliane F. Noronha, por acreditar em mim e me mostrar o caminho da ciência! Pelo apoio, paciência, amizade e ensinamentos ao longo de todos esses anos de convivência, pelo suporte e orientação que permitiram a concretização deste projeto. A senhora sempre terá o meu respeito e admiração!

À minha co-orientadora, Dr. Elaine N. Aquino, pela paciência, apoio e valorização do meu projeto. Seu conhecimento em Proteômica e Bioinformática e sua paciência foram fundamentais para o fechamento deste projeto.

Aos professores Dr. Edivaldo Ximenes e Dr. C. R. Félix “o Neymar da Bioquímica”, pela convivência agradabilíssima e pelos ensinamentos.

Aos professores Dr. Kruger, Dr. Magno e Dr. Wagner, pelo apoio e ensinamentos.

Ao ex-companheiro de bancada, Thales e a pequena grande Débora, minha estagiária eficiente, pela paciência e pela dedicação no auxílio do desenvolvimento desse trabalho. A colaboração de vocês foi de suma importância.

As grandes amigas de infância, Andreza, Daylane e Rafaela, pela força, compreensão e amizade, na alegria ou na tristeza sempre estaremos juntas na caminhada.

Aos amigos de laboratório Antonielle, Brenda, Caio, Helder, Leonora, Juliana, Karen, Paula, Pedro, Priscila, parceiros durante essa caminhada. Obrigada pelas horas de descontração, amizade, respeito, confiança e, acima de tudo, por me ajudarem nas dificuldades encontradas durante a execução deste trabalho e por alegrarem meus dias e noites no Laboratório de Enzimologia.

Aos amigos novatos do laboratório que chegaram e me conquistaram, Aline, Amanda, Bárbara, Carlos, Dayane, Jéssica, Guilherme, Marcela, Raquel, Renata e Samuel, pela convivência, pela ajuda, por muitos bons e agradáveis. Em especial a Renata que me ajudou imensamente em muitos momentos.

Aos amigos Helder e Thais, pela amizade, pelos conselhos, pela prontidão em ajudar, pelo apoio nos momentos difíceis, por muitos momentos maravilhosos.

Aos amigos e colegas de Goiânia Andrei, Fabiano, Marcelo e Rachel pela ajuda, pelas dicas em muitos procedimentos deste trabalho. Em especial ao Andrei, pela paciência e ensinamentos que foram fundamentais para a realização de uma boa parte do trabalho. Agradeço de coração!

As técnicas Marisia e Margarete, por toda a ajuda, paciência e principalmente suporte durante todo o período de realização deste trabalho.

As meninas do Laboratório de microscopia, Ingrid, Márcia, Mariana e Rachel, pela apoio e paciência no preparo das amostras para microscopia.

A secretária do curso, Luciana Medeiros, pelo apoio e atenção e por ser sempre solícita e gentil.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

A Universidade de Brasília, por minha formação, pela infraestrutura e pelo apoio para realização deste trabalho.

A Capes pela concessão da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
RESUMO	17
ABSTRACT	19
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Doenças que impactam o cultivo de feijão.....	23
1. 2. Interação planta-patógeno	25
1. 2. 1. Mecanismo de defesa em plantas	25
1. 1. 2. Resistência induzida em plantas hospedeiras	36
1.3. Fungos do gênero <i>Trichoderma</i>	37
1.4. Interação planta- <i>Trichoderma spp.</i>	39
2. OBJETIVOS	44
2.1. Objetivo geral.....	44
2.2. Objetivos específicos.....	44
3. METODOLOGIA	45
3. 1. Microrganismos utilizados e condições de cultura.....	45
3. 2. Co-cultivo isolados de <i>Trichoderma</i> e planta hospedeira	45
3.2.1. Sistema de Hidroponia	45
3. 2. 2. Germinação das sementes de feijoeiro e obtenção das plântulas	47
3. 2. 3. Preparo do inóculo do isolado de <i>Trichoderma</i> e inoculação das plântulas	47
3. 2. 4. Análise da interação <i>Trichoderma</i> -feijoeiro por Microscopia Eletrônica	48
3. 3. Análise da expressão de proteínas de defesa.....	48
3. 3. 1. Extração de RNAtotal e RT-qPCR.....	48
3.4. Análise do Secretoma.....	50

3. 4. 1. Obtenção do Secretoma.....	50
3.4.2. Digestão e dessalinização de proteínas	51
3.4.3. LC-MS/MS e Identificação de proteínas.....	52
4. RESULTADOS.....	54
4.1. Análise da promoção de crescimento.....	54
4.2. Análise da interação <i>Trichoderma spp./P. vulgaris</i> por microscopia eletrônica de varredura	56
4.3. Análise da expressão de genes de defesa do feijoeiro comum durante a interação com os isolados de <i>Trichoderma</i> – RT qPCR.....	58
4.5. Análise do secretoma da interação <i>T. harzianum</i> 303/02-feijoeiro comum.....	61
4.5. 1. Análise descritiva dos dados de espectrometria de massas por LC-MS/MS.....	61
4.5. 2. Análise <i>Label free</i>	75
4.5.3. Função molecular das proteínas identificadas.....	80
5. DISCUSSÃO.....	82
6. CONCLUSÃO	88
7. PERSPECTIVAS	89
8. ANEXO.....	90
8.2. Tabelas complementares	90
8.2. Participação em Eventos Científicos.....	100
9. REFÊRENCIAS	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Adaptação do modelo ZIG ZAG de Jones & Dangl ilustrando o sistema imunedas plantas. A amplitude final da resistência ou suscetibilidade a doenças é proporcional ao [PTI – ETS + ETI]. Na fase 1, as plantas detectam os MAMPs/PAMPs (diamantes) via PRRs ativando a imunidade desencadeada por PAMPs ou MAMPS (PTI ou MTI). Na fase 2, os patógenos liberam efetores que inteferem na PTI, resultando na suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS). Na fase 3, um efetor (em vermelho) é reconhecido por uma proteína NB-LRR, ativando a imunidade desencadeada por efetores (ETI), uma versão amplificada de PTI que geralmente passa do limiar de indução da resposta de hipersensibilidade (RH). Na fase 4, patógenos podem ganhar novos efetores (em azul) através do fluxo horizontal de genes que podem suprimir a ETI. A seleção natural pode favorece o surgimento de novos alelos da proteína NB-LRR na planta capaz de reconhecer esses novos efetores, resultando novamente em ETI..... página 29

Figura 2. Mudanças na amplitude da defesa vegetal contra patógenos causados por espécies de *Trichoderma* como indicado pelo modelo amplamente usado de Jones & Dangl (setas azuis finas). As setas azuis grossas indicam a resposta da planta na presença do fungo *Trichoderma spp.* são capazes de aumentar os níveis da primeira resposta (MTI > PTI) produzindo uma variedade de MAMPs. Eles também inibem a ação de efetores de patógenos que causam ETS, limitando assim a perda de resistência e, portanto, manter a resposta da planta a um nível acima ou apenas abaixo do limiar eficaz (< ETS). *Trichoderma* também aumentam a ETI causando uma rápida resposta (priming) ou ativando a defesa pela produção de compostos (Avr R) que são reconhecidos especificamente pelos receptores da planta e induzem mecanismos de defesa. Modificado de Lorito *et al.*, 2010..... página 40

Figura 3. Delineamento experimental. O trabalho foi dividido em duas partes principais: a análise da expressão de proteínas de defesa e a análise do secretoma..... página 46

Figura 4. Sistema de co-cultivo, *Trichoderma*-feijoeiro, desenvolvido neste trabalho (A) Feijoeiro comum cultivado na presença do isolado 468/02 de *T. asperellum* (indicado pela

seta preta em B). Raízes de feijoeiro comum (C)..... página 54

Figura 5. Comprimento de feijoeiro após cultivo na presença ou ausência dos isolados 303/02, 457/02 e 468/02 de *Trichoderma spp.*, nos tempos de 24, 48 e 72 horas de interação.* Comparação entre o controle (Planta cultivada sozinha) e o co-cultivo (Planta cultivada na presença dos isolados de *Trichoderma*), ** comparação controle e co-cultivo com o isolado 457/02, *** comparação controle com o 468/02 $p \leq 0,05$. A média realizada para 4 plantas..... Página 55

Figura 6. Comprimento das raízes após cultivo na presença ou ausência dos isolados 303/02, 457/02 e 468/02 de *Trichoderma spp.*, nos tempos de 24, 48 e 72 horas de interação. * Comparação entre o controle (Planta cultivada sozinha) e o co-cultivo (Planta cultivada na presença dos isolados de *Trichoderma*), ** comparação controle e co-cultivo com o isolado 457/02, *** comparação controle com o 468/02 $p \leq 0,05$. A média realizada para 4 plantas..... página 55

Figura 7. Micrografia eletrônica da raiz de feijoeiro comum cultivado na ausência e presença de *T. harzianum* 303/02. Planta cultivada na ausência do isolado de *Trichoderma* nos tempos de cultivo 24, 48 e 72 horas de interação (A, B e C); Fungo 24, 48 e 72 horas (D, E e F) e Co-cultivo 24, 48 e 72 horas respectivamente (G, H e I). As setas pretas indicam pêlos radiculares. (A, B, C, G, H e I aumento x 200; D aumento x 550, E e F x 500).....página 56

Figura 8. Micrografia eletrônica da raiz de feijoeiro comum cultivado na ausência e presença de *T. harzianum* 457/02. Planta cultivada na ausência do isolado de *Trichoderma* nos tempos de cultivo 24, 48 e 72 horas de interação (A, B e C); Fungo 24, 48 e 72 horas (D, E e F) e Co-cultivo 24, 48 e 72 horas respectivamente (G, H e I). As setas pretas indicam pêlos radiculares da planta. (A, B, C e I aumento x 200; D e F aumento x 400; E e H aumento original x 500; G aumento x 650)..... Página 57

Figura 9. Micrografia eletrônica da raiz de feijoeiro comum cultivado na ausência e presença de *T. asperellum* 468/02. Planta cultivada na ausência do isolado de *Trichoderma* nos tempos de cultivo 24, 48 e 72 horas de interação (A, B e C); Fungo 24, 48 e 72 horas (D, E e F) e Co-cultivo 24, 48 e 72 horas respectivamente (G, H e I). As setas pretas indicam os pelos

radiculares da planta (Imagens aumentadas do original 200x)
..... página 58

Figura 10. Análise de expressão relativa de genes relacionados com o isolado 468/02 de *Trichoderma spp.* em co-cultivo com feijoeiro comum. Os dados estão normalizados pela expressão dos genes específicos versus a referência controle, gene β -Actina, apresentados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta Ct = Ct$ gene específico – Ct gene referência e $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct -$ constante arbitrária (o maior ΔCt). Cada amostra foi analisada em triplicata. As barras representam o erro padrão. página 59

Figura 11: Análise de expressão relativa de genes relacionados com o biocontrole do isolado 457/02 de *Trichoderma* em co-cultivo com feijoeiro comum. Os dados estão normalizados pela expressão dos genes específicos versus a referência controle, gene β -Actina, apresentados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta Ct = Ct$ gene específico – Ct gene referência e $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct -$ constante arbitrária (o maior ΔCt). Cada amostra foi analisada em triplicata. As barras representam o erro padrão..... página 60

Figura 12: Análise de expressão relativa de genes relacionados com o biocontrole do isolado 303/02 de *Trichoderma* em co-cultivo com feijoeiro comum. Os dados estão normalizados pela expressão dos genes específicos versus a referência controle, gene β -Actina, apresentados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta Ct = Ct$ gene específico – Ct gene referência e $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct -$ constante arbitrária (o maior ΔCt). Cada amostra foi analisada em triplicata. As barras representam o erro padrão..... página 60

Figura 13. Diagrama de Venn representando o número de proteínas identificadas nos secretomas do isolado 303/02 de *T. harzianum* crescido na presença e ausência de feijoeiro comum. Em fungo (A) foram identificadas 187 proteínas e na condição co-cultivo (B) foram identificadas 158 proteínas.....página 63

Figura 14: Análise de correlação de Pearson (r) entre as condições Co-cultivo e fungo. Todos os dados foram normalizados em \log_2 página 75

Figura 15. Função molecular das proteínas identificadas no secretoma do isolado 303/02 de *T. harzianum*, com 48h de crescimento (Condição Fungo). * A lista completa com as proteínas incluídas neste grupo Outros se encontra disponível nos anexos..... página 80

Figura 16. Função molecular das proteínas identificadas após 48 h no secretoma da interação isolado 303/02 de *T. harzianum* e feijoeiro comum (Condição co-cultivo). * A lista completa com as proteínas incluídas neste grupo Outros se encontra disponível nos anexos..... página 81

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Sistema de classificação de em famílias conforme proposto por Christensen *et al.*..... página 32
- Tabela 2. Lista dos “primers” usados na reação de genes de defesa de feijoeiro usados em qPCR e o tamanho esperado dos fragmentos gerados..... página 50
- Tabela 3. Listagem das proteínas identificadas no secretoma da interação isolado 303/02 de *T. harzianum*/feijoeiro comum quando as sequências foram pareadas contra o banco de *Phaseolus vulgaris*..... página 60
- Tabela 4: Proteínas identificadas nos secretomas do isolado 303/02 de *Trichoderma* crescido na presença, condição co-cultivo, e na ausência, condição fungo, do feijoeiro comum após 48h de cultivo..... página 65
- Tabela 5. Análise das sequências das proteínas Glicosil hidrolase 17 e 18 de uma amostra proteica obtida da interação de dois organismos, feijoeiro e isolado 303/02 de *Trichoderma*. As letras em azul representam os aminoácidos distintos das sequências de proteínas..... página 73
- Tabela 6. Comparação entre os peptídeos das condições Co-cultivo e Fungo 303/02 pela metodologia *Label Free quantification* . utilizando o Banco de *Trichoderma harzianum*. Utilizou-se teste T-student com significância de $p \leq 0,05$ página 77
- Tabela 7. Função Molecular e processo biológico das proteínas identificadas no secretoma do isolado 303/ 02 de *Trichoderma harzianum* na presença e ausência de feijoeiro comum página 90
- Tabela 8. Função molecular e processo biológico das proteínas analisadas pelo método Label free página 97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA: ácido indol-3-acético

AS: Ácido Salicílico

BDA: Batata-Dextrose-Ágar, meio de cultura

C: co-cultivo

cDNA: Ácido desoxiribonucléico complementar

Cht: Quitinases

CID: *collision induced dissociation*

DAMP: *Damage-associated molecular patterns* - Padrões Moleculares Associados à Danos

ETI: *Effector-triggered immunity* - Imunidade Desencadeada por Efetores

ETS: *Effector-Triggered Susceptibility* – Suscetibilidade Desencadeada por Efetores

F: fungo

FDR: *False Discovery Rate*

FTMS: *Fourier Transform Mass Spectrometer*

FWH: *Full Width at Half Maximum*

g: grama

GLU: β -1,3-glucanases

GH: Glicosil hidrolase

GO: *Gene Ontology*

h: hora

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

ISR: Resistência Sistêmica Induzida

Kb: quilobase - 1000 pares de base

KDa: quilodalton – 1000 Da

LFQ: *Label Free quantification*, técnica da proteômica

LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

LOX: lipoxigenases

M: molar

MAMPs: *Microbial associated molecular patterns* - Padrões Moleculares Associados à Micróbios

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

mg: miligrama

mM: milimolar

MS: Murashige & Skoog, meio de cultura

MTI: Imunidade desencadeada por MAMPs

NB-LRR: *Nucleotide-Binding domain Leucine-Rich Repeat*, proteína

nm: nanômetro

nL: nanôlitro

O₂⁻: ânion superóxido

P: Planta

PAMPs: *Pathogen Associated Molecular Patterns* - Padrões Moleculares Associados à Patógenos

PAL: fenilalanina amônia-liase

PEP: *Posterior Error Probability*

PER: peroxidase

PCR: reação em cadeia da polimerase

pH: potencial de hidrogênio

PRRs: *Pattern recognition receptors* – receptors de reconhecimento padrão

PTI: Imunidade desencadeada por PAMPs

RH: Reação de Hipersensibilidade

RNA: Ácido Ribonucleico

RT-qPCR: *Transcriptase reverse-quantitative polymerase chain reaction*- Transcriptase reversa - PCR em tempo real

ROX: espécies reativas de oxigênio

rpm: rotações por minuto

SAR: Resistência Sistêmica Adquirida

SM1: *Small protein 1*, proteína

µg: micrograma

µL: microlitro

RESUMO

Análise da associação e do secretoma da interação entre *Trichoderma spp.* de Solo do Cerrado com Feijoeiro Comum, *Phaseolus vulgaris* L.

Algumas espécies de *Trichoderma* quando em íntima associação com plantas hospedeiras podem desencadear sua resposta de defesa e, desta forma, induzir resistência contra subsequentes infecções fúngicas. No presente trabalho foi analisado a expressão dos genes codificadores de proteínas de defesa (Glu, Chit 1, LOX, PER e PAL) em feijoeiro comum, *Phaseolus vulgaris*, em resposta à associação com os isolados das espécies *T. asperellum* (468/02) e *T. harzianum* (475/2 e 303/2), após 24, 48 e 72 horas de interação; Além disso, foi analisado o secretoma da interação entre o feijoeiro comum e o isolado 303/02 visando mapear proteínas com papel na interação entre *T. harzianum* e feijoeiro comum em um sistema hidropônico. A presença do *T. asperellum* 468/02 e *T. harzianum* 457/02 aumentaram a expressão dos genes de defesa do feijoeiro Chit, Glu e PAL durante as primeiras 24h de interação. Um aumento mais tardio, com 72 h, foi observado na expressão desses mesmos genes de defesa em feijoeiro na presença *T.harzianum* 303/02. O gene PER teve sua expressão aumentada com 48 h de interação para os três isolados. O aumento na expressão do gene LOX foi baixa para os isolados 468/02 e 457/02 e não foi observado aumento para o isolado 303/02. A análise por LC-MS/MS do secretoma de *T. harzianum* 303/02 crescido na ausência da planta hospedeira permitiu a identificação de 185 proteínas, identificadas principalmente com enzimas hidrolíticas (27 %), como as α ou β -1,3-, 1,4 e 1,6 glicanase, quitinases, e algumas proteases (16,5 %) como as serina e aspartato proteases. Uma cerato-platanina e uma alginato liase também foram identificadas nesta condição. A análise do secretoma da condição Co-cultivo (Feijoeiro comum/ *T. harzianum*) permitiu a identificação de 165 proteínas, sendo também a maioria formada por glicosil hidrolases (quitinase and glicanases). Estas mesmas sequências foram pareadas com o banco de dados de *Phaseolus vulgaris*, resultando na identificação de 7 proteínas de plantas: 2 glicosil hidrolases (famílias 17 e 18) proteínas relacionadas a patogênese e inibidores de proteases. Em ambas as condições foram encontradas muitas proteínas sem anotação no banco de dados. Não foram identificadas proteínas no secretoma da planta crescida sozinha. Os resultados obtidos sugerem que os

isolados *T. harzianum* 457 e 303/02 e *T. asperellum* 468/02 agem como moduladores de resposta de defesa da planta. Provavelmente, eles desencadeiam a expressão de genes de defesa ou genes que codificam enzimas que participam da produção de compostos secundários envolvidas na resposta de defesa da planta. Estudos futuros serão realizados para confirmar a capacidade desses fungos de modular a resposta de defesa do feijoeiro comum bem como para mapear proteínas fúngicas envolvidas nesta interação.

Palavras-chaves: *P. vulgaris*, *Trichoderma*, Resistência Induzida, Hidrolases e Proteases

ABSTRACT

Analysis of the association and the secretome of interaction between *Trichoderma spp.* of Cerrado Soil with common bean, *Phaseolus vulgaris* L.

Trichoderma species may trigger their defense responses and induce resistance against subsequent fungal infections. In the present work, the expression pattern of genes encoding defense proteins (Chit, Glu, LOX, PER and PAL) in common bean, *Phaseolus vulgaris*, was evaluated in response to association with *T. asperellum* (strain 468/02) and *T. harzianum* (strains 457/02 and 303/02) after 24, 48 and 72 hours of interaction. In addition, the secretome of this interaction was analyzed to map proteins playing a role in the association between *T. harzianum* and bean in a hydroponic system. The presence of *T. asperellum* 468/02 and *T. harzianum* 457/02 increased the expression of defense genes Chit, Glu and PAL in common bean during the first 24 hours of interaction. By contrast, a late increase, with 72 h, in the expression of these same defense genes in common bean was observed in the presence of *T. harzianum* 303/02. PER gene expression was increased with 48 h of interaction for all isolates. The increase in LOX gene expression was low for 468/02 and 457/02 strains and no increase was observed for 303/02 strain. LC-MS/MS analysis of the secretome *T. harzianum* 303/02 grown in the absence of the host plant led to the detection of 185 proteins, mostly identified as hydrolytic enzymes (27%), such as α or β -1,3-, 1,4 and 1,6 glucanases, chitinases, and some proteases (16.5%), such as serine and aspartate proteases. A ceratoplatanin and an alginate lyase were also identified on this condition. Secretome analysis of the co-culture condition (common bean/*T. harzianum* 303/02 isolate) led to the detection of 165 proteins, mostly identified as glycosyl hydrolases (chitinases and glucanases). These sequences were mapped to *P. vulgaris* database, resulting in the identification of 7 plant proteins, 2 glycoside hydrolases (family 17 and 18), pathogenesis-related proteins and protease inhibitors. No proteins were identified when the plants were grown in the absence of *T. harzianum* 303/02. The results obtained suggested that *T. asperellum* 468/02 and *T. harzianum* (457/02 and 303/02) act as inducers of defense common bean. Probably, they triggered the expression of defense genes or genes encoding enzymes pertaining to secondary compounds pathways with roles in plant defense. *T. harzianum* 303/02 secreted mainly

hydrolases (glycosyl hydrolases and proteases) in the absence or presence of the host plant. Further studies will be carried out to confirm their ability to modulate common bean defense response as well as to map fungal proteins presenting role in this association.

Key-words: *P. vulgaris*, *Trichoderma*, Induced resistance, Hydrolases and Proteases.

1. INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum, *Phaseolus vulgaris*, pertencente à classe Dicotyledoneae, família Fabaceae e à subfamília Faboideae, é uma espécie autógama, diplóide contendo 11 cromossomos e genoma com 650 Mb . Seu genoma é pequeno quando comparado aos de outras espécies vegetais, como a soja (*Glycine max*) e o milho (*Zea mays*) que possuem, respectivamente, um genoma com 2600 Mb e 2500Mb (Vieira *et al.*, 2005).

Esta leguminosa é uma das principais culturas produzidas mundialmente, sendo que no Brasil está entre as culturas de maior relevância socio-econômica. O feijão é a principal fonte de proteína vegetal da dieta básica dos brasileiros, em especial para a população de baixa renda (Guzmán-Maldonado & Parede-López, 1998). Os grãos de feijão são ricos em lisina e limitados em aminoácidos sulfurados, ao contrário dos cereais que são pobres em lisina e ricos em aminoácidos sulfurados, o que torna a dieta de arroz com feijão, típica dos brasileiros, balanceada em termos de aminoácidos essenciais. A composição de aminoácidos nos grãos de feijão foi avaliada por Ribeiro *et al.* (2007) em 19 cultivares de feijão. Os autores observaram, em ordem decrescente, os seguintes aminoácidos essenciais: leucina, lisina, fenilalanina, valina, isoleucina, treonina, histidina e metionina; e aminoácidos não-essenciais: ácido glutâmico, ácido aspártico, arginina, serina, alanina, glicina, tirosina, prolina e cisteína. Somente os aminoácidos leucina, isoleucina, histidina, valina e treonina apresentaram diferença estatística para local, indicando que eles podem variar em razão do local de cultivo.

Em função de suas comprovadas propriedades nutritivas e terapêuticas, o grão de feijão é altamente desejável como componente em dietas de combate à fome e à desnutrição, uma vez que é possível encontrar um teor protéico variando de 15% a 33% (FAO, 2012). Nos últimos anos, o feijão vem ganhando destaque como alimento nutritivo e funcional devido à variedade de substâncias fitoquímicas que possui um potencial benéfico ao consumidor, como polifenólicos, lectinas, ácidos graxos insaturados, entre outros. Cordador-Martinez e colaboradores (2002b) avaliaram o potencial antimutagênico de compostos fenólicos de feijoeiro comum, estes compostos foram capazes de reduzir a atividade mutagênica da Aflatoxina B1 e, também, apresentam também atividade antioxidante (Gonzales *et al.*, 1999; Cordador-Martinez *et al.*, 2002a; Heimler *et al.*, 2005).

O feijoeiro comum possui um papel relevante também na economia do Brasil. O país é o maior produtor e consumidor mundial dessa leguminosa, atingindo uma produção de 3,8 milhões de toneladas na safra de 2011/2012, sendo que a maior parte desta produção é utilizada para atender o mercado interno. Os pequenos produtores de feijão representam uma parte significativa desta produção interna, com atividade caracterizada pelo baixo uso de recursos tecnológicos e por estar voltada, sobretudo, para a subsistência das famílias tendo seu lucro associado às condições climáticas; e principalmente pelos grandes produtores, que utilizam sistema de produção altamente sofisticado, plantio irrigado e de alta produtividade (CONAB, 2012).

Segundo dados do IBGE (2008), esta leguminosa é cultivada em praticamente todos os estados brasileiros, com maior ou menor área colhida e com os mais variados níveis tecnológicos e sistemas de produção. Isto decorre da boa adaptação do gênero *Phaseolus* às mais variadas condições climáticas brasileiras. Os principais estados produtores são Paraná, Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Bahia, correspondendo a mais de 70% da produção mundial, porém, na maioria das regiões produtoras, ainda, tem ocorrido baixa produtividade.

Dependendo da região, o plantio de feijão no Brasil é feito ao longo do ano, em três épocas, portanto, em qualquer mês, haverá produção de feijão em algum ponto do país, o que contribui para o abastecimento interno e reduz a oscilação dos preços. Especialmente para a região nordeste, a cultura do feijão possui grande importância na subsistência das populações rurais, uma vez que, durante o período de plantio e colheita sempre haverá necessidade de mão-de-obra, constituindo-se, então, um fator de geração de renda capaz de promover melhorias substanciais no padrão de vida dessas populações (EMBRAPA, 2005).

Apesar de sua importância econômica e social, esta espécie ainda é pouco estudada em nível genômico, ao contrário de outras culturas de interesse comercial cujo genoma já foi completamente sequenciado (Guo *et al.*, 2007). A falta de caracterização genômica desta espécie dificulta a manipulação de características de interesse e o seu consequente melhoramento. Neste sentido, um consórcio internacional, envolvendo várias universidades e laboratórios federais de diversos países, chamado *Phaseomics* foi iniciado em 2001, tendo como um de seus principais objetivos o desenvolvimento de ferramentas genômicas que possam contribuir para programas de melhoramento do feijoeiro comum.

Este projeto já contribuiu para a construção de várias bibliotecas de cDNA e *P. vulgaris* e espécies relacionadas (Broughton *et al.*, 2003). Em 2011 foram registrados 116.716 ESTs no GenkBank de *P. vulgaris* (NCBI, [HTTP://WWW.ncbi.nlm.gov/sites/gquery](http://www.ncbi.nlm.gov/sites/gquery)) e culminou com o primeiro rascunho do genoma de *P. vulgaris* disponível Phytozome v. 1.0 (www.phytozome.net/commonbean.php). A disponibilidade destes dados contribuirá para o desenvolvimento de técnicas aplicadas ao melhoramento genético dessa leguminosa através do estudo de genes marcadores de defesa ou tolerantes à seca e desenvolvimento de cultivares tolerantes a estresses bóticos e abióticos. Atualmente, o principal objetivo dos programas de melhoramento do feijoeiro no Brasil e no mundo (Phytozome, 2013)

1.1. Doenças que impactam o cultivo de feijão

O feijoeiro comum é uma espécie altamente suscetível a inúmeras doenças, essas doenças estão entre os principais fatores limitantes da qualidade e da produtividade desta cultura. Essas doenças podem ser de origem fúngica, bacteriana, virótica e as provocadas por nematóides, sendo a maioria delas, ocasionada por fungos (Hall, 1996).

Dentre os fungos fitopatogênicos que causam prejuízos à produção agrícola mundial, os de solo merecem destaque por afetarem praticamente todas as plantas cultiváveis, causando perdas de até 100% quando as condições encontram-se favoráveis para o seu desenvolvimento. Dentre eles, ressaltam-se: *Phaseoisariopsis griseola* (mancha angular), *Colletotrichum lindemuthianum* (antracnose), *Sclerotinia sclerotiorum* (mofo branco ou podridão da esclerotinia), *Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli* (murcha-de-fusarium), *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani* (podridões radiculares no feijoeiro e morte súbita na soja), *Uromyces appendiculatus* (ferrugem), *Macrophomina phaseolina* (Podridão cinzenta do caule), *Microbotryum phaseolis* (Carvão), entre outros que são muito importantes por afetarem diversas culturas de importância econômica (EMBRAPA, 2005).

Esses patógenos majoritariamente apresentam uma fase em seu ciclo vital caracterizado pelo parasitismo, na qual ocorre a exploração nutricional do hospedeiro pelo parasita, e conseqüentemente se observa a diminuição no rendimento da cultura devido aos danos causados por esses parasitas. Alguns patógenos, denominados necrotróficos,

caracterizam-se por continuar a nutri-se dos tecidos mortos, mesmo após a senescência da planta hospedeira, caracterizando o saprofitismo. Diferentemente deste grupo, os biotróficos extraem nutrientes unicamente de tecidos vivos acarretando a morte dos tecidos parasitados (EMBRAPA, 2005).

O mofo-branco, causado pelo fungo necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary está entre as doenças de maior importância para a agricultura brasileira, uma vez que, este fungo atinge mais de 300 espécies hospedeiras, dentre elas as de grande importância econômica como o feijão, a soja, tomate e o algodão (EMBRAPA, 2010; Leite, 2005). Geralmente, *S. sclerotiorum* infecta os tecidos das raízes e, com o desenvolvimento da cultura, causa seu apodrecimento e cancro e murcha na base da haste. Esses fungos podem, ainda, colonizar os tecidos acima do solo causando manchas e podridões foliares, geralmente a planta fica recoberta por micélio branco, sinal característico da doença (Adams & Ayers 1979; Huang & Kokko, 1992).

O controle de doenças de plantas, sobretudo as fúngicas, é um dos maiores desafios para a agricultura brasileira (Lobo Jr., 2002) sendo, geralmente, realizado pela aplicação de defensivos químicos tradicionais. Esta técnica, apesar de bastante difundida traz grandes consequências às lavouras como, por exemplo, a seleção de patógenos resistentes, o surgimento de pragas secundárias e inespecificidade, podendo eliminar microrganismos já estabelecidos no solo que são benéficos à planta, aumentando assim sua suscetibilidade aos patógenos. Além da preocupação no que diz respeito à qualidade ambiental e dos malefícios para a saúde do aplicador (Pires *et al.*, 2003). O controle biológico e o desenvolvimento de cultivares resistentes constituem-se, portanto, alternativas eficiente para superar esses problemas decorrentes do uso de métodos químicos para a proteção de plantas.

O controle biológico pode ser definido como sendo a utilização de microrganismos específicos que interferem junto a organismos patogênicos e pragas causadoras de doenças de plantas, visando à redução populacional do patógeno ou o impacto de um organismo patogênico específico tornando-o menos abundante ou menos prejudicial quando comparado à sua ação na ausência do agente de biocontrole (Eilemberg, 2006). Dentre os microorganismos mais utilizados como agentes de biocontroles encontram-se os fungos do gênero *Trichoderma* (Harman, 2006).

O uso de cultivares resistentes ou tolerantes às doenças e fatores edafoclimáticos é um dos métodos mais efetivos para o controle de algumas doenças de plantas. Diversos trabalhos indicam a aplicação dos marcadores moleculares ligados a genes de resistência com o objetivo de facilitar a seleção de genótipos em programas de melhoramento e mapeamento de locos de interesse.

1. 2. Interação planta-patógeno

1. 2. 1. Mecanismo de defesa em plantas

No contexto das interações planta-patógeno, já é conhecido que os patógenos empregam um complexo arsenal molecular para penetrar e colonizar os tecidos da planta hospedeira (Stergiopoulos & De Wit, 2009). Estas moléculas são chamadas efetoras e possuem a função de alterar a estrutura e a função da célula hospedeira para facilitar a infecção e escapar das respostas de defesa da planta hospedeira (Hogenhout *et al.*, 2009).

Por outro lado, as plantas também evoluíram de modo a serem capazes de se defenderem de diversas situações de estresse que podem ser tanto de origem abiótica quanto biótica. As plantas apresentam resposta imune à maior parte dos microrganismos patogênicos, uma vez que possuem mecanismos de defesa pré-formados ou passivos, os quais proporcionam proteção não específica contra uma ampla gama de patógenos (Thatcher *et al.*, 2005). Esse tipo de imunidade baseia-se nas características estruturais das plantas, na presença de substâncias inibitórias aos patógenos, ou ainda na disponibilidade limitada de nutrientes (Heitefuss, 2001).

Uma série de barreiras está presente na superfície do tecido vegetal visando impedir a entrada de microrganismos patogênicos. Essas barreiras incluem características físicas da planta como a presença de cutícula, casca lenhosa das árvores e espessamento da parede celular com suberina e cutícula, ceras epicuticulares, a cutina e tricomas. Além de barreiras físicas, a infecção por microrganismos patogênicos pode ser impedida pela ação de metabólitos secundários expressos constitutivamente pela planta. Esses metabólitos incluem compostos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, terpenóides e alcalóides, entre outros (Stergiopoulos & De Wit, 2009).

Se o patógeno consegue ultrapassar as barreiras de defesa pré-formadas das plantas, respostas adicionais são induzidas, a fim de impedir ou limitar o crescimento do patógeno. Uma resposta de defesa bem sucedida depende da rápida ativação de uma série de genes que atuam na produção de compostos antimicrobianos (Fitoalexinas) e de espécies reativas de oxigênio (ROX), lignificação da parede celular e produção de enzimas que degradem a parede celular do patógeno (Van Loon *et al.*, 2006b).

O tipo de resposta desencadeada pela planta hospedeira dependerá dos mecanismos e substâncias que o patógeno apresenta ou produz durante o ataque. Patógenos biotróficos caracterizam-se por induzirem alterações no metabolismo do hospedeiro para favorecer seu próprio crescimento, sem que haja morte das células vegetais infectadas. Por outro lado, os patógenos necrotróficos matam as células do hospedeiro para metabolizar seu conteúdo e obter os nutrientes. A diferença entre os mecanismos de patogênese destes tipos de patógenos determinaram a evolução do sistema de defesa das plantas, de modo que elas desenvolveram mecanismos distintos, porém interligados, de resposta a diferentes patógenos (Ferrari *et al.*, 2003).

As primeiras respostas induzidas após a percepção do patógeno pelo hospedeiro ocorrem no ponto de entrada deste pela deposição de papilas ricas em calose e a lignificação da parede celular, formando uma barreira contra a disseminação do patógeno tanto necrotrófico quanto biotrófico (Flors *et al.*, 2005).

Ao longo da evolução as plantas desenvolveram um complexo sistema de defesa. Jones & Dangl (2006), criou o modelo Zigzag que propõe a existência de duas linhas de defesa na planta. A primeira confere defesa basal contra todos os patógenos em potencial e utiliza proteínas receptoras localizadas na membrana plasmática das células vegetais (PRRs – *Pattern Recognition Receptors*) que reconhecem estruturas microbianas conservadas, denominadas Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs – *Pathogen Associated Molecular Patterns*) ou a Micróbios (MAMPs – *Microbial associated molecular patterns*). De forma semelhante, as plantas respondem às moléculas endógenas liberadas pela invasão do patógeno, como oligômeros de parede celular ou fragmentos cuticulares, chamados de padrões moleculares associados à danos (DAMPs – *Damage-associated molecular patterns*) (Coll *et al.*, 2011).

A estimulação de PRRs leva a uma cascata de transdução de sinal e a ativação da imunidade desencadeada por PAMPs, MAMPs e DAMPs (PTI, MTI ou DTI) do inglês *PAMP, MAMPs or DAMPs - triggered immunity* (PTI, MTI or DTI). O mecanismo de defesa PTI ocorre imediatamente após o contato com o patógeno e é considerada a primeira linha de defesa induzida na planta e reconhece características microbianas conservadas, que normalmente possuem funções estruturais ou enzimáticas fundamentais para o desenvolvimento do microrganismo, como a quitina e a flagelina (De Wit, 2007; Jones & Dangl, 2006). Como exemplo de PAMPs pode-se citar a quitina, principal componente estrutural da parede celular de fungos, e a flagelina, subunidade proteica que compõe o filamento flagelar, elementos importantes no reconhecimento entre patógenos e plantas hospedeiras, e no caso da flagelina na virulência de fitobactérias (Zipfel & Felix, 2005).

Além da quitina e da flagelina, os PAMPs incluem outras moléculas microbianas como os lipooligosacarídeos de bactérias gram-negativas, fator bacteriano de alongação - Tu (EF-Tu), glicanas bacterianas e glicoproteínas de oomicetos, entre outros (Zhang & Zhou, 2010). As PRRs envolvidas no reconhecimento dos MAMPs e PAMPs são divididas em dois principais grupos: receptores quinase e os menos abundantes denominados *Receptor-like proteins* (Dodds & Rathjen, 2010). Durante o processo infeccioso, muitos fitopatógenos são capazes de liberar um grande número de moléculas efetoras que são translocadas para o citoplasma vegetal e suprimindo a PTI, e contribuem para a virulência do patógeno, resultando em suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS - *Effector - triggered Susceptibility*) (Stergiopoulos & De Wit, 2009).

Em contrapartida, na segunda linha de defesa, a planta responde com um sistema especializado de defesa baseado no reconhecimento indireto de proteínas efetoras dos patógenos por proteínas polimórficas NB-LRR (*Nucleotide-Binding domain Leucine-Rich Repeat*) codificadas pelos genes R da planta. A “hipótese guarda” explica que o reconhecimento indireto entre produtos do gene R e Avr, segundo este modelo, as proteínas R atuam monitorando a presença e modificações de proteínas alvos pelos efetores do patógeno. Essas proteínas NB-LRR são capazes de reconhecer efetores de patógenos de diversos reinos, resultando na imunidade desencadeada por efetores (ETI- *Effector-triggered immunity*) (Jones & Dangl, 2006).

A resistência a doenças mediada por NB-LRR é efetiva apenas contra patógenos que crescem somente em tecidos hospedeiros vivos, biotróficos obrigatórios ou hemibiotróficos (biotróficos facultativos), mas não contra patógenos que matam o tecido do hospedeiro durante a colonização, necrotróficos (Jones & Dangl, 2006).

O reconhecimento do patógeno via NB-LRRs em plantas, conduz a inibição do crescimento do patógeno, o qual é frequentemente, mas não sempre, acompanhado pela reação de hipersensibilidade (RH). A ETI é uma resposta mais acelerada e amplificada da PTI (Stergiopoulos & De wit, 2007; Jones & Dangl, 2006).

Uma visão geral do sistema imune das plantas pode ser representada pelo modelo ZIG ZAG de Jones & Dangl (2006), conforme pode ser visto na figura 1.

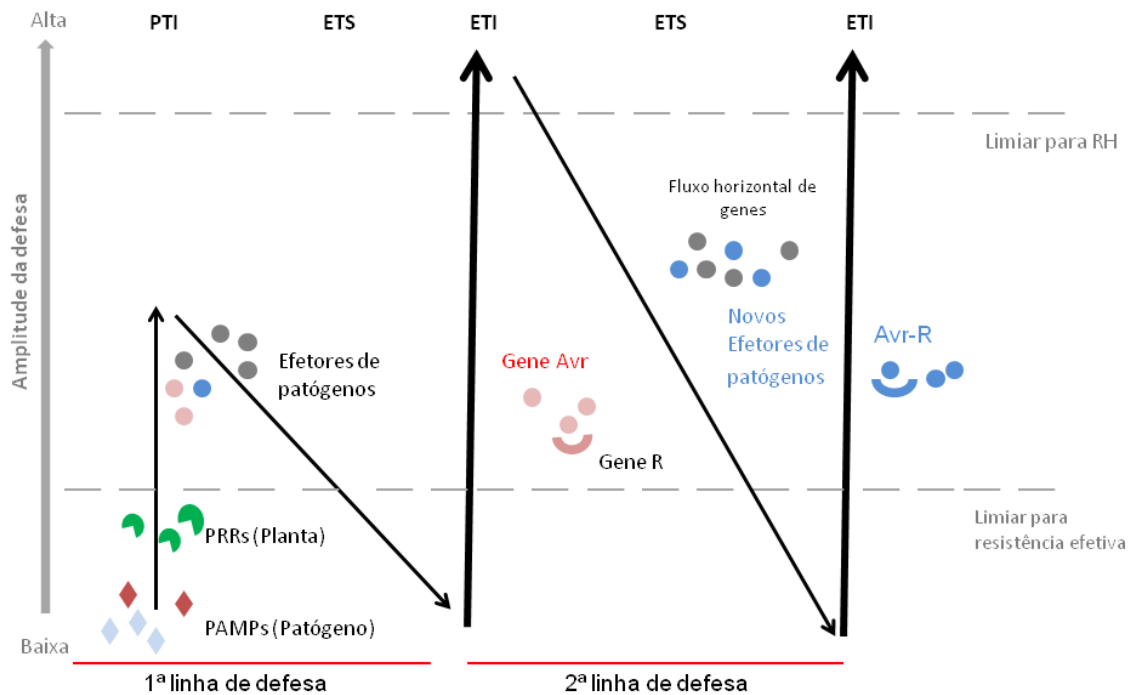


Figura 1. Adaptação do modelo ZIG ZAG de Jones & Dangl ilustrando o sistema imune das plantas. A amplitude final da resistência ou suscetibilidade a doenças é proporcional ao $[PTI - ETS + ETI]$. Na fase 1, as plantas detectam os MAMPs/PAMPs (diamantes) via PRRs ativando a imunidade desencadeada por PAMPs ou MAMPs (PTI ou MTI). Na fase 2, os patógenos liberam efetores que interferem na PTI, resultando na suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS). Na fase 3, um efector (em vermelho) é reconhecido por uma proteína NB-LRR, ativando a imunidade desencadeada por efetores (ETI), uma versão amplificada de PTI que geralmente passa do limiar de indução da resposta de hipersensibilidade (RH). Na fase 4, patógenos podem ganhar novos efetores (em azul) através do fluxo horizontal de genes que podem suprimir a ETI. A seleção natural favorece o surgimento de novos alelos da proteína NB-LRR na planta capaz de reconhecer esses novos efetores, resultando novamente em ETI.

As proteínas efetoras ou simplesmente efetoras são definidas como fatores de virulência que alteram a estrutura e função das células hospedeiras promovendo a infecção, além de melhorar o potencial de colonização do tecido celular, sobrevivência e reprodução dos patógenos, ou ainda, podem desencadear respostas de defesa em função do reconhecimento por proteínas R (Kamoun, 2009; Oliva *et al*, 2010).

1.1.2.1. Reação de hipersensibilidade

A reação de hipersensibilidade ou resposta hipersensitiva (RH), é considerada um dos principais eventos da resposta de defesa das plantas contra o ataque de patógenos e pode ser definida como um mecanismo de resistência local caracterizada pela morte celular rápida e programada de células vizinhas ao sítio de infecção do patógeno na planta. Este comportamento é ocasionado pela liberação de compostos tóxicos, permitindo o isolamento do patógeno em um local onde não há nutrientes necessários para sua sobrevivência, podendo levar à sua morte evitando, assim, sua disseminação pelos tecidos vegetais (Agrios, 2004; *Bowell et al.*, 2002).

A explosão oxidativa é um dos eventos iniciais da RH, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio (ROXs) incluindo o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Até pouco tempo, o H_2O_2 era visto apenas como um composto tóxico para a célula. Atualmente, sabe-se que ele pode atuar como uma molécula sinalizadora que controla diferentes respostas e estímulos, tanto em células animais como vegetais (Finkel, 2000).

Para que o H_2O_2 atue como molécula sinalizadora, sua síntese e degradação devem ser reguladas sincronicamente (*Neill et al.*, 2002b). O H_2O_2 é continuamente gerado por diversas vias durante o metabolismo normal da planta. Para evitar danos à própria célula, um controle rigoroso de seus níveis faz-se necessário. Este controle é feito, principalmente, pela enzima catalase, que o converte em a água e oxigênio molecular (Yang & Poovaiah, 2002).

Outra importante fonte geradora de H_2O_2 é por meio de enzimas específicas, como por exemplo, xantina oxidase, amina oxidase, peroxidase da parede celular (*Bolwell et al.*, 2002). O estresse oxidativo gerado a partir do ataque de fitopatógenos gera uma síntese rápida deste composto, com consecutiva liberação no apoplasto (*Bolwell*, 1999)

O papel do H_2O_2 no mecanismo de defesa de plantas ainda é controverso. Sua participação na defesa de plantas contra o ataque de patógenos biotróficos é conhecida, sabe-se que ele atua na indução da morte celular no local da infecção impedindo, assim, o crescimento e desenvolvimento do patógeno nos tecidos do hospedeiro (*Neill et al.*, 2002a).

As principais alterações decorrentes da RH é a indução da produção de um grande número de proteínas solúveis, que são conhecidas como proteínas relacionadas à patogênese ou Proteínas PR, destacando-se as peroxidases, quitinases e β -1,3-glucanases. Outras respostas paralelas à infecção são o aumento da expressão de genes relacionados à síntese de fitoalexinas e fenilalanina amônia liase, além da deposição de lignina e aumento dos níveis de ácido salicílico (Verbene *et al.*, 2000).

1. 1. 2. 2. Proteínas PR

Das alterações decorrentes da interação planta-patógeno, a síntese de proteínas relacionadas à patogênese ou proteínas PR é uma das mais evidentes. As proteínas PR foram identificadas primeiramente em folhas de fumo (*Nicotiana tabacum*) com reação hipersensível à infecção pelo vírus do mosaico do fumo (Van Loon & Van Kammen, 1970, Van Loon & Van Strien, 1999). Mais tarde em 1990, Bowles mostrou que estas proteínas localizavam-se intra e extracelularmente, e que se acumulavam em tecidos vegetais intactos ou em cultura de células após o tratamento com elicitores ou ataque de patógenos.

Algumas dessas proteínas PR encontram-se expressas, embora em baixos níveis, de forma constitutiva em plantas, ou seja, em condições normais. Entretanto, seus níveis são aumentados quando as plantas são submetidas a condições de estresse. Há outras que, embora não sejam detectadas em condições fisiológicas normais, têm seus genes correspondentes expressos, sendo detectados nos tecidos vegetais após injúria, devido o ataque de patógenos e/ou pragas e sob condições de estresses ambientais do tipo salinidade, seca e baixas/altas temperaturas (Martins-Miranda, 2002).

Essas proteínas podem ter sua expressão aumentada mediante a ação de substâncias sinalizadoras, chamados de elicitores, de origem tanto endógena (ação da planta hospedeira) quanto exógena (ação do patógeno) (Christensen *et al.*, 2002). Além do aumento na expressão dos genes das proteínas PR ser promovido por organismos vivos (indução biótica) isto pode ocorrer, também, quando plantas são expostas a elicitores de origem abiótica. Dentre eles incluem-se o cloreto de mercúrio, etanol, bromo, ácido acetilsalicílico, ácido

jasmônico, etileno, ácido salicílico (AS) e ácido 1,2,3-benzotiadiazol-7-carbotióico (BTH) (Okushima *et al.*, 2000; Latunde-Dada & Lucas; 2001; Fernandes *et al.*, 2006).

Acredita-se que a ativação de diversos genes de proteínas PR seja regulada pela cascata de transdução de sinais mediada pelo AS, como demonstrado por Hammond-Kosack & Jones (2000) que observaram que a ação sinérgica do etileno e AS no aumento da expressão destes genes. Muitas proteínas PR possuem tanto atividade antifúngica como atividade antibacteriana “*in vitro*” como, por exemplo, quitinases, β -1,3-glucanases e proteínas que se ligam à quitina. A degradação de polissacarídeos estruturais da parede celular de fungos ou alterações na sua arquitetura, promovidas por estas enzimas, podem prejudicar o desenvolvimento do microrganismo, impedindo seu crescimento (Zareie *et al.*, 2002).

Atualmente as proteínas PR estão classificadas em 17 famílias (PR-1 a PR-17) como mostradas na tabela 1 conforme descrito por Christensen e colaboradores (2002). Essa classificação levou em consideração as sequências de aminoácidos, atividades biológica e enzimática de cada proteína. Além de promover a reação de hipersensibilidade, o acúmulo de proteínas PRs no local de infecção está geralmente associado à obtenção de Resistência Sistêmica Adquirida contra uma gama de patógenos (Durrant & Dong, 2004).

Tabela1. Sistema de classificação de em famílias conforme proposto por Christensen *et. al.*

Família	Função
PR1	antifúngica
PR2	β -1,3-glucanase
PR3	quitinase tipo I, II, IV e VII
PR4	quitinase I e II
PR5	osmotina
PR6	inibidora de protease
PR7	endoproteinase
PR8	quitinase tipo III
PR9	peroxidase
PR10	proteína semelhante a ribonuclease
PR11	quitinase tipo V
PR12	defensina
PR13	tionina
PR14	proteína relacionada ao transporte de lipídeos
PR15	oxalato oxidase
PR16	proteína semelhante a oxalato redutase
PR17	função desconhecida

1. 1. 2. 3. Enzimas e Compostos secundários com papel na resposta de defesa em plantas

- **Família PR-09: Peroxidases**

Enzimas com atividade de peroxidase (PER) (E. C. 1. 11. 1. 7) já foram descritas em plantas, animais e em microrganismos, são conhecidas por participar de vários processos fisiológicos de grande importância (Hoagland, 1990). Com relação à participação na resposta de defesa de plantas, esta enzima participa da biossíntese do hormônio vegetal etileno, catalisa a oxidação de compostos fenólicos, os quais são acumulados em resposta à infecção, catalisa a oxidação do ácido indol-3-acético (AIA) (Hoagland, 1990) e catalisa a oxidação e eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico na presença de hidrogênio, formando lignina em resposta ao ataque de patógenos (Pieterse, 2005). Alterações na atividade das peroxidases têm sido relacionadas à resposta ou suscetibilidade em diferentes patossistemas, como demonstrado por Hammerschmidt & Kuc (1982) que observou que a inoculação da primeira folha verdadeira de pepineiro (*Cucumis sativus* L.) com o fungo *Colletotrichum lagenarium* elevou a atividade de PER na segunda folha e aumentou a velocidade de lignificação das paredes celulares de suas células.

- **Família PR 03, 04, 08 e 11: Quitinases**

Quitinases (Cht) (E. C. 3. 2. 1. 14) são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas do polímero de quitina resultando na produção de oligômeros e monômeros de N-acetilglicosamina, que podem ser absorvidos e metabolizados por diferentes organismos (Ulhoa & Pederby, 1993). Estas proteínas têm sido relatadas principalmente como inibidoras do crescimento fúngico e por sua ação antibacteriana, apresentando atividade lisozima-like sobre a parede celular bacteriana (Van Loon & Van Strien, 1999).

- **Família PR-02: B-1,3-glucanase**

As β -1,3-glucanases (GLU) (E. C. 3. 2. 1. 39) são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas do polímero de β -1,3-glucana, composto que juntamente com a quitina são os principais constituintes da parede celular de fungos. As β -1,3-glucanases são classificadas em 3 classes: a classe I possui proteínas básicas localizadas nos vacúolos do

mesófilo e células da epiderme, enquanto as classes II e III são proteínas ácidas localizadas extracelularmente (Van Den Bulcke *et al*, 1989).

No processo de indução de resistência, uma pequena quantidade de GLU é sintetizada e secretada para o espaço intercelular e, com o crescimento do fungo parasita ou simbiote nesse espaço, essa enzima inicia o processo de degradação de sua parede celular. Os oligossacarídeos liberados nesta hidrólise agem como elicitores da resposta de defesa da planta hospedeira, aumentando a expressão dos genes que codificam GLU e Cht que são acumuladas no vacúolo. Quando o fungo invasor consegue penetrar na célula, os vacúolos são rompidos liberando as enzimas que irão inibir a ação do patógeno (Mauch & Staehelin, 1989). Para *P. vulgaris* foi demonstrado que a inoculação de hipocótilos com um isolado não patogênico do fungo *Rhizoctonia solani* eleva a atividade de peroxidases, quitinases e glucanases, protegendo a planta contra subseqüentes invasões pelos patógenos *R. solani* e *C. lindemuthianum* (Xue *et al.*, 1998).

- **Lipoxigenase**

As lipoxigenases (LOX) (E. C 1.13. 11. 12) pertencem à classe das oxirredutases, enzimas chaves na via biossintética do ácido jasmônico. As LOXs são isoenzimas que catalizam a dioxigenação de ácidos graxos poliinsaturados contendo o sistema cis, cis-1,4-pentadieno (ácido linoléico (LA), α -linolênico ou araquidônico) para a formação dos respectivos derivados hidroperóxidos, originando moléculas reativas (Farmer & Ryan, 1990). Em vegetais, os principais substratos para as LOXs são o ácido Linoléico e Linolênico e os produtos da via da lipoxigenase têm sido associado às estratégias de defesa e mecanismos de resistência da planta contra patógenos e ferimentos e são encontradas em partes distintas das plantas como cotilédones, frutos e folhas. A indução da expressão do gene LOX por ferimento e jasmonatos foi descrito em diversas espécies vegetais como, *Arabidopsis*, tomate, batata e tabaco e maracujá. (Feussner & Wasternack, 2002).

- **Composto secundários**

Em continuidade ao processo de defesa das plantas, após o reconhecimento do patógeno, ocorre a síntese de barreiras físicas (papilas), aumento da lignificação da parede celular e a síntese de compostos fenólicos secundários de defesa, dentre os quais se destacam as fitoalexinas e as enzimas fenilalanina amônia-liase e Chalcona isomerase, estes desempenham importante na defesa vegetal.

As fitoalexinas, observadas na RH, são compostos secundários de baixo peso molecular, sintetizados pelas plantas e acumuladas em seus tecidos em resposta a invasão do patógeno. Esses compostos só aparecem em tecidos infectados e sua taxa de produção depende dos genótipos e tipo de interação estabelecida entre hospedeiro e patógeno, como exemplo, pode ser citado o acúmulo mais precoce da faseolina (fitoalexina do feijoeiro comum) nas plantas na interação incompatível do que na interação compatível, isto é, quando não há doença (Bailey, 1974).

Segundo Lo e colaboradores (1996), as fitoalexinas atuam na inibição da germinação e alongação do tubo germinativo e redução ou inibição do crescimento do micélio de fungos fitopatogênicos. Em geral, as fitoalexinas não estão presentes nas plantas antes da infecção, mas são sintetizadas rapidamente após o ataque de microrganismos ou após o tratamento com elicitores abióticos e bióticos (Stangarlin *et al.*, 2008).

- **Fenilalanina amônia liase**

A Fenilalanina amônia liase (PAL) (E. C. 4. 3. 1. 5), enzima chave nas vias de síntese dos compostos fenólicos na via metabólica de síntese dos fenilpropanóides, catalisando a desaminação do aminoácido L-fenilalanina, convertendo-o em ácido *trans*-cinâmico e amônia. O ácido *trans*-cinâmico é utilizado para a síntese de diferentes compostos fenólicos (ácido 4-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico e ácido sináptico), precursores para a síntese de ésteres, cumarinas, flavanóides e ligninas. A produção desta enzima é controlada durante o crescimento vegetal, mas também é induzida em células vizinhas ao local de infecção por vários estímulos ambientais, como infecção, ferimentos, contaminação por metais pesados, luz e reguladores de crescimento (Rahman & Punja 2005).

1. 1. 2. Resistência induzida em plantas hospedeiras

A capacidade das plantas de se defenderem contra invasores está relacionada à capacidade de detectá-los (Cluzet *et al.*, 2004; Stadnik & Maraschin, 2004). A percepção de moléculas químicas sinalizadoras liberadas pelo patógeno, os elicitores que podem ser de natureza química diversa, desencadeia uma série de mecanismos de sinalização que, geralmente iniciam-se com um influxo de cálcio e uma explosão oxidativa, seguida da síntese de moléculas sinalizadoras. Um elicitore em potencial deve disparar várias respostas de defesa, não causar grandes alterações no metabolismo primário da planta e assegurar a proteção contra doenças. Uma gama de moléculas pode atuar como elicitores, incluindo oligo e polissacarídeos, peptídeos, lipídeos e proteínas (Cluzet *et al.*, 2004).

Quando este processo é desencadeado, ocorre uma redução no tamanho e/ou número de lesões causadas no hospedeiro pelo patógeno, ocasionando um atraso no desenvolvimento da doença, geralmente observado na proteção contra fungos, bactérias e vírus ou frente à fatores externos (Stadnik & Maraschin, 2004).

Os indutores de resistência ou elicitores podem ser classificados, quanto à origem, em: abióticos e bióticos. Dentre os abióticos podemos citar a utilização de luz UV, injúrias mecânicas, compostos químicos como fosfatos, derivados de ácido salicílico, ácido 2,6 dicloroisonicotínico e o acilbenzolar-S-metil. O acilbenzolar-S-metil (Bion^R, Syngenta), é um análogo funcional do ácido salicílico (Walters & Heil, 2007) que é comercializado no Brasil para controlar a antracnose, além de outras doenças causadas por bactérias e vírus na cultura do feijoeiro (Agrofit, 2010). Dentre os fatores bióticos pode-se citar a pré-inoculação com patógenos virulentos e avirulentos como pseudomonas (Ton *et al.*, 2002) ou ainda, com o uso de fungos do gênero *Trichoderma*.

O contato com microrganismos patogênicos e não patogênicos desencadeia um amplo mecanismo de defesa em plantas. Dois mecanismos são reconhecidos: Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) e a Resistência Sistêmica Induzida (ISR). A SAR é geralmente desencadeada no local da infecção, oferecendo resistência sistêmica duradora contra subsequentes ataques de patógenos e está relacionada com a ativação de genes PR, sendo mediada por uma via de sinalização envolvendo o ácido salicílico (AS). Esta resposta é inicialmente localizada na região de infecção, como tentativa de impedir e/ou retardar a

penetração do patógeno. Em seguida, esta resistência passa a ocorrer em locais da planta distantes do local da infecção pelo patógeno, ou do local de aplicação dos agentes eliciadores abióticos (Durrant & Dong, 2004).

Ao contrário da SAR, a ISR não é mediada pelo AS, ela requer o ácido jasmônico e o Etileno e não envolve o acúmulo de proteínas PR. A ISR é resultado da colonização das raízes das plantas por algumas rizobactérias não patogênicas, esta é um estado fisiológico de capacidade defensiva reforçada onde as defesas da planta são potencializadas contra subsequentes patógenos e parasitas (Yedidia *et al.*, 1999; Woo *et al.*, 2006).

1.3. Fungos do gênero *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* pertencente ao filo Ascomycota e compreende um grupo de fungos filamentosos saprófitas, anamórficos e que apresentam esporulação abundante, com conídios pequenos, unicelulares e de fácil disseminação pelo ar (Samuels, 2006). Sendo geralmente encontradas como componentes da microbiota em quase todos os tipos de solos, na rizosfera de plantas e em matéria orgânica em decomposição vivendo livre ou parasitando outros fungos (Viterbo *et al.*, 2004; Druzhinina & Kubicek, 2005).

Esses fungos caracterizam-se por utilizarem uma grande variedade de compostos como fonte de carbono e nitrogênio, e serem resistentes a inibidores produzidos por outros microrganismos e tolerantes a diferentes tipos de fungicidas (Papavizas, 1985). Os fungos do gênero *Trichoderma* são de grande importância econômica para a agricultura uma vez que eles estão entre os principais fungos utilizados como agentes no controle de doenças fúngicas (Harman, 2006; Harman *et al.*, 2004).

O conhecimento sobre esses fungos como agentes de controle de pragas e patógenos de plantas remonta a centenas de anos. Em 1932, Weindling, em seu trabalho pioneiro, demonstrou, *in vitro*, a capacidade de *Trichoderma lignorum* de parasitar diferentes patógenos de solo. A partir de então, outros trabalhos têm sido desenvolvidos visando à utilização de espécies do gênero *Trichoderma* para controle biológico de fungos fitopatogênicos (Benítez *et al.*, 2004; Harman, 2000).

No Brasil, a primeira publicação sobre o uso desse fungo como agente de controle biológico de doenças de plantas foi na década de 1950, quando Foster descreveu a inativação do vírus do mosaico do fumo (TMV) por filtrados da cultura de *Trichoderma spp.*. O antagonista reduziu em até 90% a capacidade infectiva do vírus em folhas de fumo (*Nicotiana glutinosa*).

Atualmente 90% dos microrganismos utilizados como antagonistas para o controle de fungos fitopatogênicos correspondem a diferentes isolados de *Trichoderma spp.* (Bénitez *et al.*, 2004). O sucesso das espécies de *Trichoderma* como bicontrolador é devido a sua agressividade no combate aos fungos fitopatogênicos do solo, assim como sua capacidade de parasitar as estruturas de sobrevivência dos fungos como esporos, escleródios ou clamidósporos, que persistem no solo por longos períodos (Mello, 2000).

As formulações à base de linhagens de *Trichoderma spp.* disponíveis no mercado incluem: Pó molhável, suspensão concentrada de esporos, óleo emulsionável, grãos colonizáveis e esporos secos. No Brasil, existe o Trichodermil, contra vários fungos de solo; o Biotrich, com ação preventiva contra os gêneros *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Phyium*, *Phomopsis* e *Rosilinia*; o Biomix, utilizado para o controle de Oídio e o Trichonat PM contra *Botrytis*, *Phytophthora*, *Verticilium*, *Colleotrichum*, *Armillaria*, *Rhizopus*, *Crinipelisentre* estão entre os produtos mais conhecidos e comercializados.

Uma das espécies de *Trichoderma* mais utilizada em estudos de controle biológico de fitopatógenos é *T. harzianum* (Melo & Azevedo, 1998; Kubicek *et al.*, 2001; Benítez *et al.*, 2004). Porém tem aumentado o número de trabalhos mencionando o papel de outras espécies como agentes de biocontrole como, por exemplo, *T. asperellum*. Essa espécie tem se mostrado efetiva como agente de controle biológico contra os fungos fitopatogênicos *R. solani*, *F. sporotrichioides* e *F. oxysporum* diminuindo a incidência de doenças germinativas em sementes de arroz (Trillas *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2006).

Os mecanismos de ação utilizados por *Trichoderma spp.* para o controle de fitopatógenos baseiam-se na competência rizosférica, através da competição por nutrientes e espaços, na antibiose pela produção de antibióticos, no micoparasitismo e pela indução de resistência e resposta de defesa e/ ou promoção de crescimento em plantas hospedeiras (Melo,

1998; Yedidia *et al.*, 1999; Benítez *et al.* 2004; Harman, 2004). Nos últimos anos, as pesquisas com *Trichoderma spp.* têm dado atenção ao potencial de uso destas espécies como indutoras de resposta de defesa em plantas hospedeiras protegendo-as de uma subsequente infecção (Woo *et al.*, 2006; Djonovic *et al.*, 2007).

1.4. Interação planta-*Trichoderma spp.*

Os estudos recentes com *Trichoderma spp.* mostraram que algumas espécies de *Trichoderma* quando em íntima associação com plantas hospedeiras podem desencadear a resposta de defesa e, assim, induzir resistência na planta hospedeira a subseqüentes infecções fúngicas (Djonovic *et al.*, 2006a).

Estes fungos podem ativar a resposta da planta aumentando sua imunidade básica ou a imunidade desencadeada pelos MAMPs – MTI ou ainda reduzindo a suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS) e aumentando a imunidade desencadeada por efetores (ETI) indicados no modelo amplamente aceito Zig-Zag de Jones & Dangl (2006), conforme pode ser visto na figura 2.

Algumas espécies de *Trichoderma* são capazes de induzir uma resposta mais forte em comparação com a imunidade da planta desencadeada por patógeno (MTI > PTI) pela produção de uma variedade de MAMPs com as hidrofobinas, proteínas tipo expansinas, metabólitos secundários, enzimas com atividade antimicrobiana, chamados de efetores ou proteínas efetoras. *Trichoderma spp.* são capazes de neutralizar os efetores dos patógenos que interferem com MTI, isto reduz a ETS e limita a perda de resistência mantendo a resposta da planta a um nível acima ou um pouco abaixo do limiar eficaz (figura 2). Por fim, *Trichoderma spp.* podem também melhorar ETI causando uma rápida resposta (*priming*) ou ativá-lo, pela liberação de compostos que, como acontece com algumas moléculas de patógenos, são especificamente reconhecidos por receptores celulares de plantas (Lorito *et al.*, 2010).

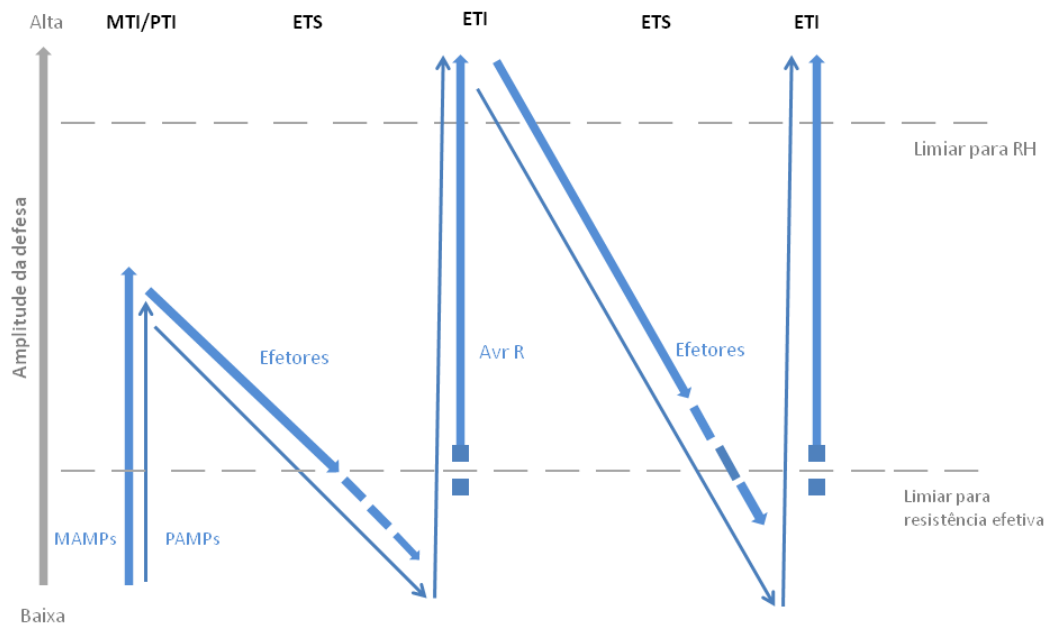


Figura 2. Mudanças na amplitude da defesa vegetal contra patógenos causados por espécies de *Trichoderma* como indicado pelo modelo amplamente usado de Jone & Dangl (setas azuis finas). As setas azuis grossas indicam a resposta da planta na presença do fungo *Trichoderma spp.* que são capazes de aumentar os níveis da primeira resposta (MTI > PTI) produzindo uma variedade de MAMPs. Eles também inibem a ação de efetores de patógenos que causam ETS, limitando assim a perda de resistência e, portanto, manter a resposta da planta a um nível acima ou apenas abaixo do limiar eficaz (< ETS). *Trichoderma* também aumentam a ETI causando uma rápida resposta (priming) ou ativando a defesa pela produção de compostos (Avr R) que são reconhecidos especificamente pelos receptores da planta e induzem mecanismos de defesa. Modificado de Lorito *et al.*, 2010.

O processo molecular e bioquímico envolvido na indução de resistência em plantas por *Trichoderma* não é totalmente compreendido, mas já se sabe que proteínas elicitoras produzidas pelo patógeno são reconhecidas por receptores na planta, e uma vez que este reconhecimento acontece, é desencadeada uma cascata de sinais que pode levar a respostas de defesa ou susceptibilidade (Hammerschmidt, 2007). A interação dessas moléculas determinam a adesão e o reconhecimento do *Trichoderma* e, posteriormente, a indução de resistência na planta.

Os elicitores de defesa envolvidos na indução de resistência incluem metabólitos secundários liberados pelas hifas do fungo, proteínas com atividade enzimática com as serina

e aspartato proteases, xilanases, quitinases, celulasas e glucanases (Morán-Diez *et al.*, 2009; Shores, 2010), proteínas ou peptídeos de baixa massa molecular (6 a 42kDa) (Sallas-Marina *et al.*, 2011), ácidos graxos, lipídeos e seus derivados, polissacarídeos e oligossacarídeos, por exemplo quitina e quitosana (Mathys *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2012).

Harman e colaboradores (2004) descreveram três diferentes classes de compostos produzidos por fungos do gênero *Trichoderma* que induzem resposta de defesa e resistência em plantas: proteínas com ou sem função enzimática, proteínas homólogas a proteínas codificadas por genes Avr e oligossacarídeos ou compostos de baixa massa molecular liberados da parede celular do fungo ou da planta pela ação de hidrolases produzidas pelo *Trichoderma spp.*

Algumas classes de proteínas participam da interação *Trichoderma*-planta e age diretamente contra patógenos. Pequenas proteínas extracelulares ricas em cisteínas produzidas e secretadas pelas hifas de algumas espécies de *Trichoderma*, principalmente quando na presença de uma planta hospedeira estão envolvidas tanto com micoparasitismo como com indução de resistência, sendo um elicitor capaz de desencadear reações de defesa tanto local como sistemicamente.

A proteína SM1 (*Small protein 1*) rica em cisteína pertence a uma família de proteínas, fitotóxicas Djonovic *et al.* (2006a), identificou, purificou e caracterizou uma proteína elicitora de defesa secretada por *T. virens*, SM1, essa proteína não causou danos em plantas hospedeiras (*Oryza Sativa* e *Gossypium hirsutum* L) ou apresentou atividade contra microrganismos, mas na sua presença foi observado o aumento na expressão gênica sistêmica de quitinase, β 1-3 glicanase, peroxidase, hidroximetilglutaril CoA redutase (HMG) e de lipoxigenase, sendo todas proteínas relacionadas a resposta de defesa. Esses autores demonstraram ainda que a SM1 é expressa pelo fungo sob diferentes condições nutritivas e que a expressão de SM1 é melhorada quando este se encontrava na presença de uma planta-hospedeira.

Tuci e colaboradores (2011) confirmaram os resultados de Djonovic *et al.* (2006), mostrando que a presença de *Trichoderma harzianum* e *T. asperellum* dispara a resposta de resistência sistêmica da planta hospedeira. Yedidia e colaboradores (1999) demonstraram que fungos do gênero *Trichoderma* induzem também a expressão de outras proteínas e compostos de defesa em plantas hospedeiras, como as peroxidases, compostos fenólicos e substâncias que aumentam a resistência mecânica da célula hospedeira. Desta forma, podem inibir ou

restringir a invasão de tecidos vegetais pelo patógeno. Posteriormente em 2006, Harman demonstrou que quando inoculado às raízes de tomateiro, o isolado T22 da espécie *T. harzianum*, aumenta a sua resistência a doenças causadas por patógenos foliares, reduzindo em até 80% os seus sintomas.

Nos últimos anos, tem aumentado a atenção dada aos estudos da interação entre *Trichoderma spp* e plantas, incluindo estudos moleculares de componentes bioativos específicos produzidos pelo fungo que esteja associado com indução de mecanismo de defesa, colonização da raiz ou promoção de crescimento da planta hospedeira. As novas técnicas genômicas e proteômicas tem contribuído para a identificação de marcadores moleculares envolvidos na comunicação entre *Trichoderma spp.* e plantas hospedeiras.

Marra *et al.* (1999) analisaram o proteoma da interação de *T.atroviride/P. vulgaris/B. cinerea* e *R. solani* com o objetivo de identificar proteínas relacionadas à patogênese ou possíveis genes de resistência expressos durante a interação, assim como Segarra e colaboradores (2007) analisaram por uma abordagem proteômica a alteração no padrão de expressão de proteínas em pepino, quando cultivado na presença do isolado T 34 de *T. asperellum*.

Esses e outros estudos mostram que o proteoma e o transcriptoma da planta muda como consequência da interação com metabólitos de *Trichoderma* ou por sua colonização radicular (Alfano *et al.*, 2007; Marra *et al.*, 1999; Segarra *et al.*, 2007), porém ainda há poucos dados sobre as proteínas secretadas que modulam a resposta de defesa da planta hospedeira.

Uma alta diversidade de proteínas é encontrada no proteomas de fungos filamentos. Essa heterogeneidade deve-se à múltiplas modificações pós-traducionais, como glicosilação, fosforilação, sulfonação, acetilação, metilação, entre outras, que são extremamente importantes porque determinam a função, estabilidade e localização das proteínas (Kim *et al.*, 2007).

Devido à alta complexidade dos proteomas, uma estratégia geralmente adotada é o estudo de frações específicas do proteoma total, ou seja, os sub-proteomas: Sub-proteoma de organelas (mitocondria, cloroplasto), glicoproteoma (proteínas glicosiladas) Fosfoproteoma (Proteínas fosforiladas) e secretoma (conjunto de proteínas secretadas por um organismo) (Kim *et al.*, 2007).

O Secretoma foi definido pelo Tjasma *et al.*, (2000) como o conjunto de enzimas e demais proteínas secretadas por um determinado tipo celular ou por um conjunto de células, assim como a maquinaria responsável pela secreção dessas proteínas. Análises do secretoma de fungos filamentosos são indispensáveis para conhecer a identidade e função do arsenal de enzimas hidrolíticas extracelulares que participam da degradação de compostos lignocelulósicos, e outras proteínas envolvidas no micoparasitismo e promoção de crescimento e/ou indução de resistência na planta hospedeira.

A identificação dessas proteínas poderá contribuir para uma maior compreensão dos mecanismos de indução de defesa em feijoeiro, assim como para a identificação de genes que possam ser utilizados no desenvolvimento de novos e mais resistentes cultivares de feijão.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem duas metas principais: a) Analisar, em nível transcricional, a expressão de genes codificadores de proteínas de defesa em feijoeiro comum em resposta à associação com os isolados das espécies *T. asperellum* (468/02) e *T. harzianum* (475/2 e 303/2); b) Analisar a interação entre o feijoeiro comum e o isolado 303/02 em condição de co-cultivo visando a identificação de proteínas diferencialmente secretadas durante esta interação.

2.2. Objetivos específicos

- Estabelecer sistema de cultivo em hidroponia que permita a posterior obtenção do secretado da interação, micélios dos isolados de *Trichoderma* e planta hospedeira;
- Analisar a expressão de genes de defesa em raízes de feijoeiro após 24, 48 e 72 horas de interação com os isolados 468/02, 475/2 e 303/02;
- Analisar o secretoma da interação *T. harzianum* (isolado 303/02) e feijoeiro comum após cultivo em hidroponia, para plantas cultivadas na presença ou ausência do isolado por abordagem proteômica.

3. METODOLOGIA

3. 1. Microrganismos utilizados e condições de cultura

Os isolados de *Trichoderma spp.* utilizados neste trabalho foram: 468/02 (*T. asperellum*) 457/02 e 303/02 (ambos *T. harzianum*). Estes isolados foram selecionados como modelo levando em consideração estudos prévios onde apresentaram os valores mais significativos na inibição do crescimento do fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum*, na redução de sintomas de mofo branco em feijoeiro em testes de campo, produção de antibiótico *in vitro*, assim como por apresentarem a expressão da proteína de defesa SM1 e por aumentar a produção de feijoeiro em testes em campo (Freitas *et al.*, 2013).

Estes isolados foram coletados em diferentes regiões de solos do Cerrado, áreas cultivadas e mata nativa do Brasil e foram gentilmente cedidas pela CNPAF, EMBRAPA arroz e feijão – GO. Os isolados foram cultivados e mantidos em meio de cultura sólidos Batata-dextrose-ágar (BDA) por sete dias à temperatura ambiente. Uma suspensão de esporos foi feita utilizando-se glicerol 50%, esta suspensão é mantida no -80°C e repicado mensalmente.

3. 2. Co-cultivo isolados de *Trichoderma* e planta hospedeira

3.2.1. Sistema de Hidroponia

Um sistema de cultivo que possibilitasse a germinação, o crescimento e a interação do feijoeiro com os isolados de *Trichoderma* semelhante ao descrito por Djonović e colaboradores (2006) e por Yedidia e colaboradores (1999) foi desenvolvido. Este permitiu o contato da plântula com o meio sem sua total imersão: tubos cônicos de 50 mL adaptados foram colocados em frascos de 250 mL contendo 50 ml de meio Murashige and Skoog (MS) acrescido de vitaminas de Gamborg preparado de acordo com as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich), selados com papel filme. 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 trocado por

meio MS fresco acrescido de 0,05 % de sacarose, que serviu como primeira fonte de carbono para o desenvolvimento dos esporos do isolado do fungo.

Para analisar a resposta de defesa de feijoeiro, quando crescido na presença e ausência dos isolados de *Trichoderma*, foram realizados os seguintes cultivos em hidroponia: Isolados de *Trichoderma* cultivados na ausência da planta hospedeira (Condição fungo), Isolados de *Trichoderma* cultivados na presença da planta hospedeira (Condição Fungo/Planta ou co-cultivo) e Planta hospedeira cultivada na ausência dos isolados de *Trichoderma* (Condição Planta). Para uma melhor compreensão do delineamento experimental e execução do projeto, este foi dividido em duas partes principais: a análise da expressão dos genes codificadores de proteínas de defesa e a análise do secretoma, conforme pode ser visto na figura 1.

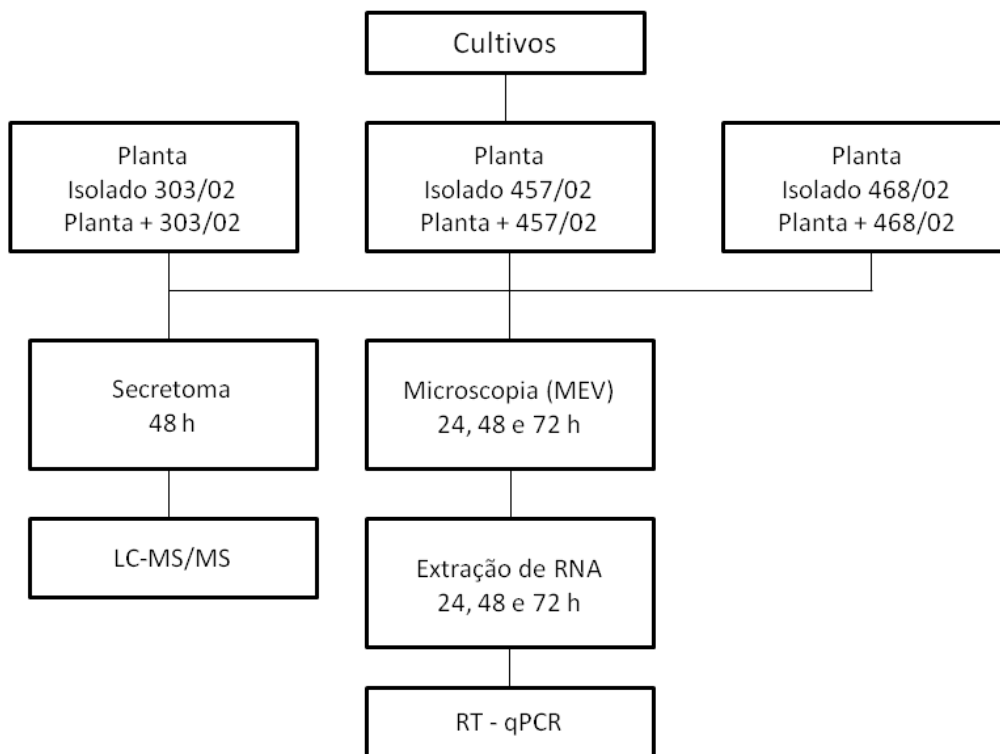


Figura 3. Delineamento experimental. O trabalho foi dividido em duas partes principais: a análise da expressão de proteínas de defesa e a análise do secretoma.

3. 2. 2. Germinação das sementes de feijoeiro e obtenção das plântulas

A assepsia das sementes de feijoeiro da cultivar Pérola foi realizada pela sua imersão em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 1 % de cloro ativo por um período de 07 minutos, seguida de três lavagens, de um minuto, com água autoclavada, todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar. Após a assepsia, as sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri de vidro contendo meio Ágar-glicose a 2 % (m/v), ambos autoclavados anteriormente. As sementes foram mantidas em câmara de germinação a 28 °C com fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de escuro, durante três dias.

3. 2. 3. Preparo do inóculo do isolado de *Trichoderma* e inoculação das plântulas

Cinco discos das culturas dos isolados 468/02, 475/2 e 303/2 crescidos em meio BDA foram removidos e cultivados em 50 g de arroz parboilizado umedecido com 25 mL de água destilada, anteriormente, autoclavado a 120 °C por 20 minutos, em Erlenmeyer de 250 mL. 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 ressuspendido em 100 mL de água destilada autoclavada. A concentração da solução de esporos foi contada em câmara de Neubauer.

Uma solução com 10^7 esporos/mL de cada isolado foi inoculada diretamente nas raízes das plântulas crescidas por três dias, constituindo assim a condição de co-cultivo. Como controle, o feijoeiro foi cultivado sem a presença do fungo. As plantas foram mantidas em câmara de germinação a 28 °C até o tempo de coleta. Foram realizados cultivos independentes para cada condição.

Após 24, 48 e 72 h da inoculação dos esporos do fungo, as plantas foram coletadas, as raízes foram removidas, lavadas (para retirar o excesso do fungo na condição de co-cultivo) com água autoclavada, e armazenadas no -80 °C até a extração de RNA. Foram realizados 03 Bioensaios independentes para cada isolado e de cada bioensaio foram coletadas 05 plantas para os três tempos de interação e condições. Estas cinco plantas foram reunidas, constituindo um “pool” que foi considerado como sendo a réplica biológica e a partir desta réplica foram realizadas as triplicatas técnicas.

3. 2. 4. Análise da interação *Trichoderma*-feijoeiro por Microscopia Eletrônica

A colonização das raízes de feijoeiro, pelos isolados de *Trichoderma* 468/02, 457/02 e 303/02, foram acompanhadas por microscopia eletrônica de varredura para determinar os tempos de interação que seriam utilizados nas análises por RT- qPCR.

Uma parte da raiz da planta, com aproximadamente 3 cm, crescida na presença destes isolados, com 24, 48 e 72 h de interação, foi extraída e incubada por 4 horas em uma solução de Karnovsky 0,05 M pH 7.2, seguida de 3 lavagens com Tampão Cacodilato de Sódio 0,05 M pH 7.4 e incubação em de Tetróxido de Ósmio 1 % por 1 hora no escuro. Posteriormente os pedaços de raízes foram lavados 2 vezes com água destilada e desidratados com incubações sucessivas, de 15 minutos, com soluções de acetonas nas concentrações de 30, 50, 70, 90 e 100 %.

Após a última incubação as amostras foram lavados 5 vezes com dióxido de carbono (CO₂) líquido à 4 °C e secadas no ponto crítico com CO₂ de 30 a 37 °C no equipamento CPD 030-Balzers e metalizada no ouro no equipamento Sputter Coater 050, para posterior visualização no microscópio eletrônico de varredura JSM 840. O mesmo foi feito para as amostras controle: planta e fungo sozinhos, nos mesmos tempos. As análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas no laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília – UnB.

3. 3. Análise da expressão de proteínas de defesa

3. 3. 1. Extração de RNAtotal e RT-qPCR

As extrações dos RNAs dos tecidos radicular das 05 plantas crescidas na presença ou ausência dos isolados 468/02, 475/02 e 303/02, após 24, 48 e 72 horas de cultivo, foram realizadas com a utilização do Kit Invitrap® Spin Plant RNA Mini Kit (50) da Invitex conforme as instruções do fabricante. As preparações foram utilizadas em seguida as análises de qualidade utilizando NanoDrop (Thermo scientific). As amostras com valores considerados aceitáveis (razões 260/280 nm e 260/230 nm > 2,00 foram utilizadas na PCR quantitativa (RT – qPCR). A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose desnaturante

1% o que permite inferir a integridade do RNA purificado, se este for íntegro ele pode ser utilizado para análises de expressão gênica.

5 ug do RNA total extraído de cada amostra das condições planta e co-cultivo foram tratados com DNase I (Fermentas), em seguida foi realizada a transcrição reversa em cDNA na presença de oligo(dT), em um volume final de reação de 20 µL usando o Kit Revertaid™ First Strand cDNA Synthesis (Fermentas). O cDNA sintetizado foi diluído em 80 µL de água e usado como molde para as reações de PCR em tempo real. Cada reação (20 µL) continha 10 µL de MAXIMA® SYBR-green PCR Master mix Kit (Invitrogen), primers iniciadores 5' e 3' (Tabela 2) (500 nM) e 10 µL de cDNA e água livre de nuclease. O experimento foi realizado em triplicata para cada amostra e para os tempos 24, 48 e 72 horas.

As condições de ciclagem foram: 10 minutos a 95°C (1 ciclo), 15 segundos a 95°C seguido por 1 minuto a 60 °C (40 ciclos). Foi feita, também, a curva de Melting nas seguintes condições: 10 segundos a 95 °C, seguido por 1 minuto a 60 °C e uma rampa final a 90 °C com a coleta contínua de dados (1 ciclo) para observação da formação de dímeros de primers e amplificação não específica. Utilizou-se o software Step One Plus™ real-time PCR System da Applied Biosystems ®.

Os oligonucleotídeos utilizados na amplificação de q-PCR foram desenhados para os seguintes genes de defesa do feijoeiro: Beta-1,3-Glicanase (Glu), Quitinase 1 (Chit), Peroxidase (PER), Lipoxigenase 1 (LOX) e Fenilalanina amônia liase (PAL) (Tabela 2). Os genes Glu, Chit e PER foram escolhidos para a análise de expressão por serem genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese. O gene LOX é um gene marcador associado com ISR e o gene PAL está relacionado com a síntese de lignina e compostos fenólicos. Nas análises de quantificação relativa por reações de RT- qPCR é necessário utilizar um gene normalizador, que deve ser constitutivo e não variar diante das condições experimentais, neste trabalho os transcritos de β-actina foram usados como controle endógeno para normalização da quantidade do RNA total presente em cada reação como pode ser visto na tabela 2.

Tabela 2. Lista dos “primers” usados na reação de genes de defesa de feijoeiro usados em qPCR e o tamanho esperado dos fragmentos gerados.

Identificação do Gene	Nº de Acesso	Primers para qPCR (5' to 3')		Tamanho do Amplicon (bp)
		Forward	Reverse	
Chitinase Classe 1	AY357300.2	CGGCACTGTGACGAACATCATCAA	AAGAATCCGATGCGGTCTTGAACC	84
1,3-beta-D-glicanase	DQ093563.1	AATCAAGCAGCTCTGCAAGCACTC	AAGTTCAGCACGTTCCCTTTGCACC	134
Peroxidase Clas 3	AF485265.1	TTGTTATTCTTGGAGGGCCCGACT	TGGCTAAGATTGGCACTACCCAGT	118
Lipoxigenase	U76687.2	TGCTTGCTGGTGTAAATCCTTGCC	AATGCCTCTCCACAGTGAGTCCA	154
Fenilalanina Amônia liase	M11939.1	TGAAAGTACAAGGGCTGCTTAT	CCCAACTCCTCTCTCACAAAC	105
Actina	EU581898.1	AAATCCTGACCGAGCGTGGTTACT	TTGGCAGTTTCCAATTCCTGCTCG	121

3.4. Análise do Secretoma

3.4.1. Obtenção do Secretoma

Para a análise do secretoma foi utilizado o isolado de *Trichoderma* 303/02. As sementes de feijão foram esterilizadas e germinadas conforme descrito no item 3. 2. 2.

Após 48 h da inoculação do fungo, o meio das condições de cultivo denominadas: Planta, Co-cultivo e Fungo foram coletados para a análise das proteínas secretadas – secretoma - de cada tratamento. O secretado produzido por 10 cultivos independentes de cada condição foram reunidos constituindo uma amostra composta. Ao todo foram realizados 03 bioensaios para cada condição de cultivo.

Os secretomas reunidos foram então filtrados em membrana Millipore de 0.22 µM, ao filtrado foi acrescido ázida sódica para a concentração final de 0,02 % (m/v) e estes dialisados contra água à 4 °C com 4 trocas a cada uma hora. Posteriormente as amostras foram concentradas por liofilização, e em seguida realizou-se a precipitação de proteínas.

As proteínas foram precipitadas em presença de ácido tricloroacético (TCA) 10 % (v/v), 2-mercaptoetanol (0,07 % v/v) em acetona, homogeneizadas e incubadas a -20 °C por 1 hora em agitação intermitente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm a 4

°C por 20 minutos e, em seguida, lavadas em acetona e 2-mercaptoetanol (0,07 % v/v) e secas em speedvac por 30 minutos. Para a determinação da concentração de proteínas, as amostras foram ressuspensas em bicarbonato de amônio 100 mM e sonicada até a sua total solubilização (Lakshman *et al.*, 2008).

A quantificação de proteínas nas amostras foi determinada utilizando o Quick Start™ Bradford, método modificado de Bradford, empregando albumina de soro bovino como padrão. O ensaio foi realizado incubando-se 150 µL de amostra protéica e 150 µL do reagente de Bradford por 5 min, conforme as instruções do fabricante, seguido da leitura de absorbância a 595 nm. A partir da quantificação, 100 µg de proteínas de cada condição, foram colocadas em microtubos de 2 mL e liofilizado novamente para redução do volume final.

3.4.2. Digestão e dessalinização de proteínas

Uma alíquota da amostra acima mencionada contendo 100 µg de proteína já liofilizada foi ressuspensa com uma solução de bicarbonato de amônio 100 mM, reduzidas com 10 mM de DTT por 1 hora a 30 °C e, então, alquilada com 40 mM de iodoacetamida por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado tampão uréia e tiouréia nas concentrações finais de 1 M e 0,3 M respectivamente e tripsina 1:50 (tripsina:proteína) na concentração final de 16 ng/µL, seguida de incubação overnight (12-16 h) a 37 °C para que ocorresse a clivagem triptica. Ao final da digestão foram adicionados 2 µL de ácido trifluoroacético (TFA), na concentração final de 0,1 %, para acidificação da solução e parada da reação.

Para a dessalinização da amostra utilizou-se uma ultra-micro spin column C18, com etapas de: limpeza da coluna, com 03 ciclos de lavagem com 200 µL de 0,1 % de TFA em acetonitrila, centrifugação a 100 g por 1 minuto cada; equilíbrio da coluna, com 3 ciclos de lavagem da coluna com 200 µL de 0,1 % de TFA em água milliQ, centrifugação 100 g por 1 minuto cada; adição de 100 µg de proteínas da amostra na coluna e centrifugada a 50 g por 2 minutos em seguida, a amostra foi lavada com 3 ciclos de lavagem da coluna com 200 µL de 0,1 % de TFA em água milliQ (100 g/1 minuto cada) e a eluição dos peptídeos da coluna se

deu em 2 ciclos de 70 μ L de acetonitrila 80 %, centrifugação de 50 g por 2 minutos cada. A amostra foi seca à vácuo sob centrifugação (Speedvac).

3.4.3. LC-MS/MS e Identificação de proteínas

As amostras foram ressuspendidas em 20 μ L ácido fórmico 0,1 % e a quantificação a concentração dos peptídeos em 1 μ L de cada amostra foi realizada por meio do protocolo *Qubit Quantification Platform*, composto pelo aparelho Qubit fluorômetro (Invitrogen) e pelos reagentes do kit Quant-it (Invitrogen). As amostras foram normalizadas na concentração 1 μ g/ μ L com ácido fórmico 0,1 %. Foram injetadas 4 μ L de cada amostra em uma cromatografia em fase reversa, acoplada ao espectrômetro de massa por fonte de ionização nanoelectrospray, seguido por separação em uma nanocoluna (18,5 cm x75 μ m) contendo matriz com partículas de 3 μ m, Reprisil C18 (Dr. Maish). A cromatografia foi realizada em um sistema Ultra-nano LC (Ekseigent) acoplado a um espectrômetro de massa Orbitrap LTQ Velos (Thermo).

As amostras foram carregadas primeiramente para a coluna de captura e dessalinizadas em ácido fórmico 0,1 % durante 23 minutos. Depois do carregamento e da dessalinização foi iniciado o gradiente de separação cromatográfica, realizada a uma taxa de fluxo de 200 nL / min. A fase móvel A consistiu de 0,1 % (v/v) de ácido fórmico em água ultra pura, e a fase móvel B consistiu de 95 % de acetonitrila em 0,1 % (v/v) de ácido fórmico. O gradiente utilizado foi: 2 a 40 % de solvente B em 205 min; rampa até 95 % B em 1 minutos e manutenção desta concentração durante 34 min antes de iniciar o equilíbrio da coluna para a análise da amostra subsequente. Os peptídeos eluídos foram introduzidos diretamente no espectrômetro de massa através da fonte de íons Nanospray II (Thermo).

A tensão da fonte foi ajustada para 1,8 kV, temperatura do capilar a 200 °C e tensão da lente para 150 V. O valor-alvo AGC foi de 500.000 para ion trap MSn, e de 1.000.000 para *Fourier Transform Mass Spectrometer* (FTMS). Os dados de fragmentação foram obtidos em uma aquisição dependente dos dados em um modo de alta-baixa (*DDA high-low*) selecionando os 10 picos mais intensos para fragmentação. Os espectros de peptídios intactos (MS1) foram obtidos no analisador Orbitrap (350 a 2000 m/z) a uma resolução de 60.000 (*Full Width at Half Maximum*- FWHM - a 400m/z) e, para cada MS1 espectros modo profile

foram submetidos à fragmentação por CID (*collision induced dissociation*) no analisador por armadilha iônica linear (*linear ion trap*), com a energia de colisão normalizada de 40 % de ativação. Exclusão dinâmica foi habilitada em rejeição de carga 1.

A qualidade dos espectros oriundos do Orbitrap foi analisada no software Xcalibur 2.2 (Thermo). A comparação entre os cromatogramas e os peptídeos experimentais com os teóricos obtidos no banco de dados específicos foram realizados no software MaxQuant versão 1.3.0.5. A identificação foi considerada verdadeira quando utilizado o *False Discovery Rate* (FDR) = 1 %, máximo de *Posterior Error Probability* (PEP) ≤ 1 e peptídeos únicos ≥ 2 . A abordagem inicial foi a identificação descritiva de cada condição comparadas aos bancos de fungo *Trichoderma harzianum* CBS 226.95 versão 1.0, disponível no site <http://genome.jgi.doe.gov/Triha1/Triha1.home.html>. e ao banco do feijoeiro *Phaseolus vulgaris* versão 1.0, disponível no site <http://www.phytozome.org/commonbean.php>. A predição da função molecular e do processo biológico das sequências protéicas para as condições Planta, Fungo e Co-cultivo foi realizada através do *Gene Ontology* presentes nos bancos de dados descritos acima.

A proteômica *Label Free quantification* (LFQ) compara a intensidade relativa dos picos de peptídeos em diferentes amostras biológicas concomitantemente com métodos de normalização de dados, utilizando a transformação logarítmica na base 2, gerando dados quantitativos da abundância de proteínas em diferentes condições, sendo analisados no software Perseus versão 1. 4. 0. 20. Neste trabalho, a LFQ visou à comparação entre os peptídeos entre as condições co-cultivo e fungo quando pareados ao banco do fungo *T. harzianum*. Essa comparação levou em consideração a intensidade dos peptídeos (MS1) de cada condição. Após o pareamento realizou-se o teste estatísticos (teste T-student com significância de $p \leq 0,05$) e a avaliação das proteínas exclusivas, onde somente foram consideradas como tal, quando apresentava intensidade nas 3 réplicas biológicas de uma condição e ausente na outra. A correlação entre as réplicas foi realizada pelo teste de Pearson (r).

4. RESULTADOS

4.1. Análise da promoção de crescimento

A metodologia de co-cultivo desenvolvida neste trabalho possibilitou a obtenção das plantas hospedeiras (feijoeiro) e suas raízes para os experimentos de RT-qPCR e obtenção do secretoma desta interação (Figura 4).



Figura 4. Sistema de co-cultivo, *Trichoderma*-feijoeiro, desenvolvido neste trabalho (A) Feijoeiro comum cultivado na presença do isolado 468/02 de *T. asperellum* (indicado pela seta preta em B). Raízes de feijoeiro comum (C).

Para as primeiras 24 horas de crescimento não foi observada diferença significativa no tamanho de feijoeiro cultivado na ausência ou presença dos isolados 468/02, 457/02 e 303/02 de *Trichoderma*. No entanto, esta diferença é significativa a partir 48h de cultivo com valores inferior para as plantas cultivadas na presença dos isolados (Figura 5). Não houve variação significativa no tamanho das raízes das plantas crescidas na presença dos isolados de *Trichoderma* quando comparado ao comprimento das raízes sem o fungo até as 48 h de interação, a diferença foi significativa com 72 h (Figura 6). Apesar desta diferença no crescimento das plantas não houve dano aparente nas folhas ou raízes do feijoeiro.

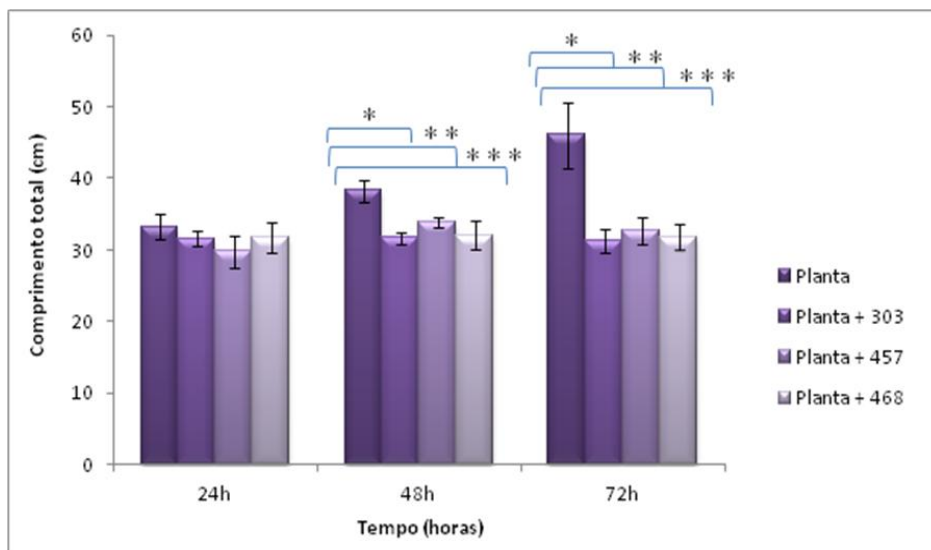


Figura 5. Comprimento de feijoeiro após cultivo na presença ou ausência dos isolados 303/02, 457/02 e 468/02 de *Trichoderma spp.*, nos tempos de 24, 48 e 72 horas de interação. * Comparação entre o controle (Planta cultivada sozinha) e o co-cultivo (Planta cultivada na presença dos isolados de *Trichoderma*), ** comparação controle e co-cultivo com o isolado 457/02, *** comparação controle com o 468/02 $p \leq 0,05$. A média realizada para 4 plantas.

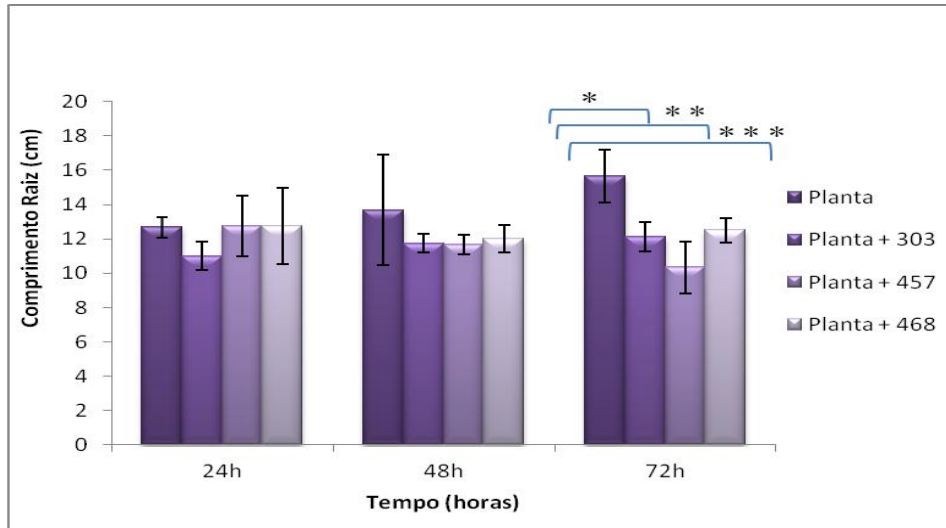


Figura 6. Comprimento das raízes após cultivo na presença ou ausência dos isolados 303/02, 457/02 e 468/02 de *Trichoderma spp.*, nos tempos de 24, 48 e 72 horas de interação. * Comparação entre o controle (Planta cultivada sozinha) e o co-cultivo (Planta cultivada na presença dos isolados 303/ 02 de *Trichoderma*), ** comparação controle e co-cultivo com o isolado 457/02, *** comparação controle com o 468/02, $p \leq 0,05$. A média realizada para 4 plantas.

4.2. Análise da interação *Trichoderma spp./P. vulgaris* por microscopia eletrônica de varredura

Os três isolados de *Trichoderma*, 468/02, 457/02 e o 303/02, colonizaram as raízes de feijoeiro comum após 24, 48 e 72 horas de interação (Figuras 7, 8 e 9). Esta colonização visualmente é mais intensa a partir de 48 horas sendo que para o último tempo avaliado praticamente não se observa a raiz hospedeira livre de associação com o micélio dos isolados de *Trichoderma* (Figura 7I, 8I e 9I).

Os tempos de 24, 48 e 72 horas de interação foram, portanto, determinados como os tempos de coleta das plantas para as análises de expressão de genes de defesa por qRT-PCR e 48 horas para a coleta e análise do secretoma da interação feijoeiro comum-*Trichoderma* 303/02.

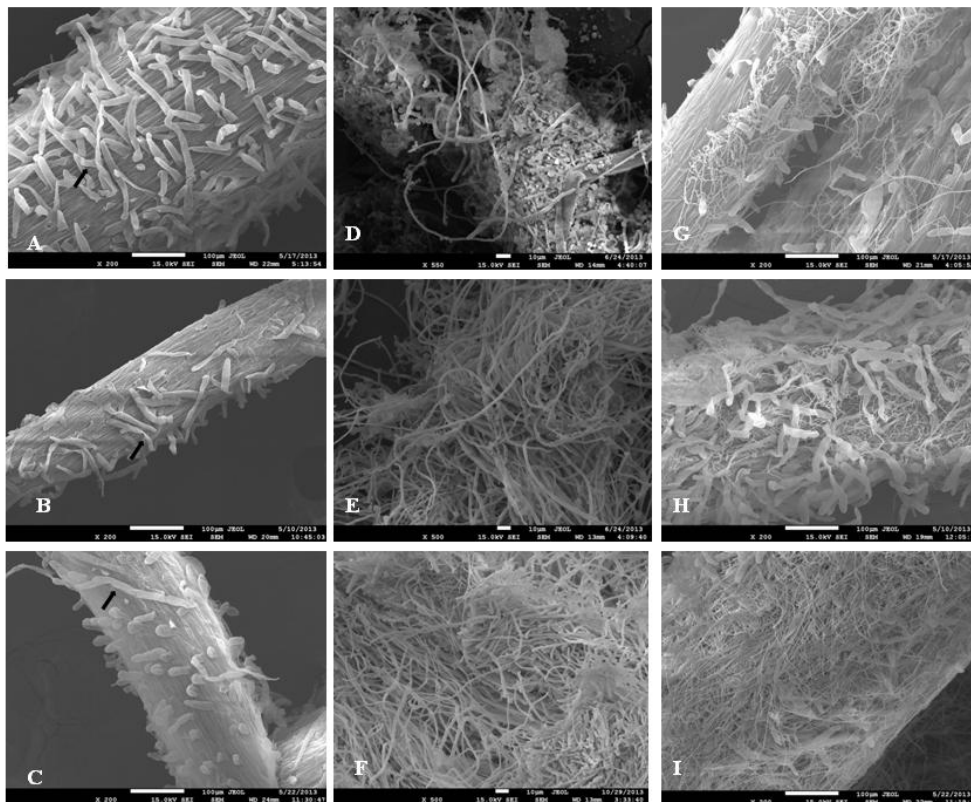


Figura 7. Micrografia eletrônica da raiz de feijoeiro comum cultivado na ausência e presença de *T. harzianum* 303/02. Planta cultivada na ausência do isolado de *Trichoderma* nos tempos de cultivo 24, 48 e 72 horas de interação (A, B e C); Fungo 24, 48 e 72 horas (D, E e F) e Co-cultivo 24, 48 e 72 horas respectivamente (G, H e I). As setas pretas indicam pêlos radiculares. (A, B, C, G, H e I aumento x 200; D aumento x 550, E e F x 500).

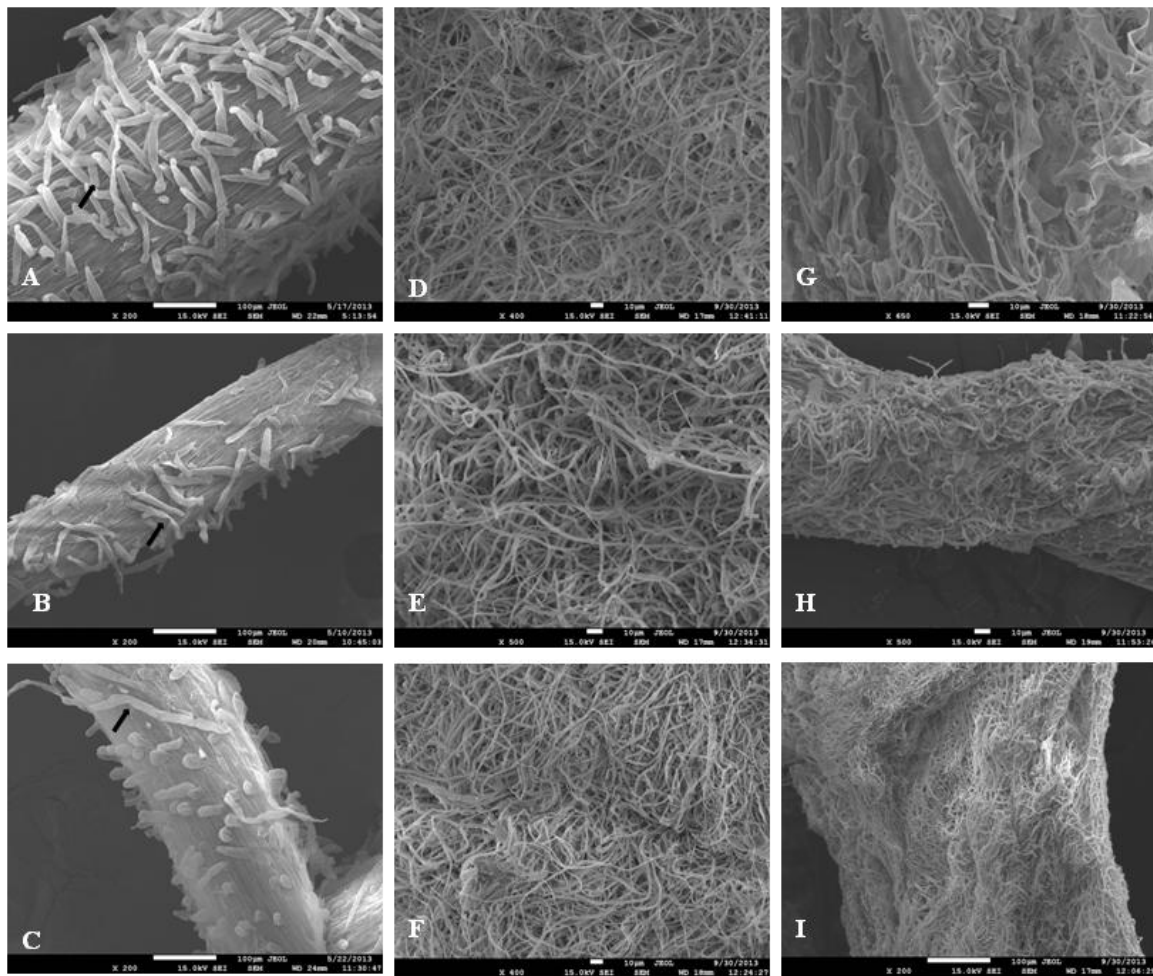


Figura 8. Micrografia eletrônica da raiz de feijoeiro comum cultivado na ausência e presença de *T. harzianum* 457/02. Planta cultivada na ausência do isolado de *Trichoderma* nos tempos de cultivo 24, 48 e 72 horas de interação (A, B e C); Fungo 24, 48 e 72 horas (D, E e F) e Co-cultivo 24, 48 e 72 horas respectivamente (G, H e I). As setas pretas indicam pêlos radiculares da planta. (A, B, C e I aumento x 200; D e F aumento x 400; E e H aumento original x 500; G aumento x 650).

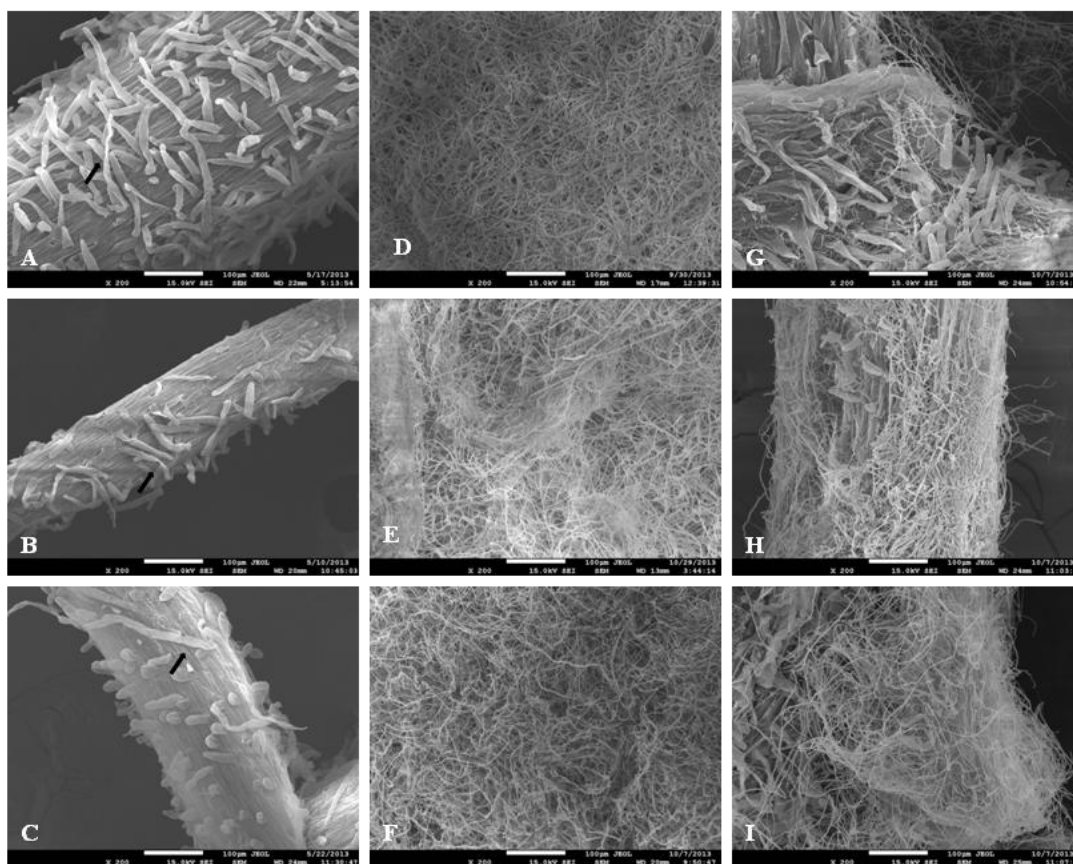


Figura 9. Micrografia eletrônica da raiz de feijoeiro comum cultivado na ausência e presença de *T. asperellum* 468/02. Planta cultivada na ausência do isolado de *Trichoderma* nos tempos de cultivo 24, 48 e 72 horas de interação (A, B e C); Fungo 24, 48 e 72 horas (D, E e F) e Co-cultivo 24, 48 e 72 horas respectivamente (G, H e I). As setas pretas indicam os pelos radiculares da planta (Imagens aumentadas do original 200x).

4.3. Análise da expressão de genes de defesa do feijoeiro comum durante a interação com os isolados de *Trichoderma* – RT qPCR

As plantas de feijoeiro cultivadas na presença do isolado 468/02 de *T. asperellum* apresentaram aumento na concentração dos transcritos dos genes codificadores das enzimas de defesa Chit e GLU e PAL nos três tempos de cultivos analisados. O valor de expressão relativa foi maior nas primeiras 24 horas de co-cultivo feijoeiro/*Trichoderma spp.*, além disto este valor foi superior para Chit 1 quando comparado com o obtido para GLU. O gene PER apresentou padrão de expressão diferente do observado para os demais genes analisados. O maior valor de expressão relativa foi detectado após 48 horas de interação, com diminuição

neste valor após 72 h, enquanto que o aumento na expressão de LOX foi justamente maior com 72 h de interação. O aumento na expressão relativa do gene PAL foi observado maior nas primeiras 24h de interação (Figura 10).

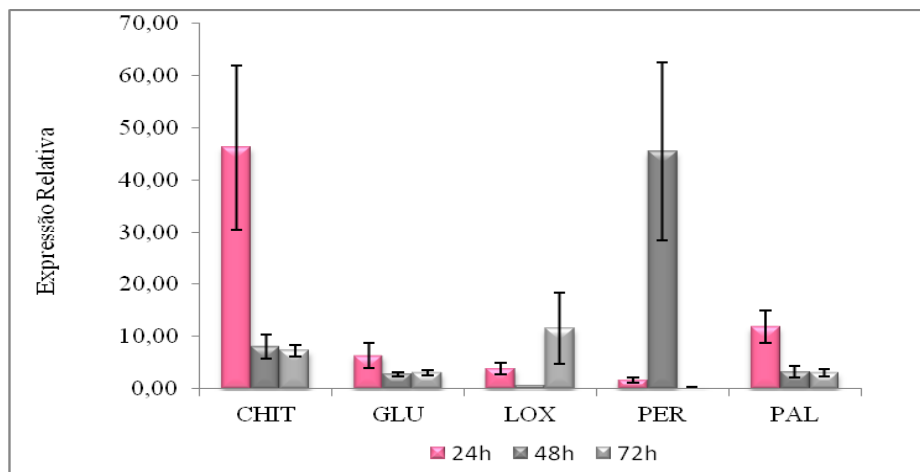


Figura 10. Análise de expressão relativa de genes relacionados com o isolado 468/02 de *Trichoderma asperellum* em co-cultivo com feijoeiro comum. Os dados estão normalizados pela expressão dos genes específicos versus a referência controle, gene β -Actina, apresentados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde $\Delta C_t = C_t$ gene específico – C_t gene referência e $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t -$ constante arbitrária (o maior ΔC_t). Cada amostra foi analisada em triplicata. As barras representam o erro padrão.

A figura 11 mostra os resultados da expressão relativa dos genes de defesa Chit 1, GLU, LOX 1, PER e PAL do feijoeiro durante a interação com o isolado 457/02. Conforme pode ser observado nessa figura, houve aumento na expressão dos genes Chit 1, GLU e PAL. O valor de expressão relativa foi maior nas primeiras 24 horas de co-cultivo feijoeiro/*Trichoderma harzianum*, sendo respectivamente 18,8; 12,19 e 12,04 vezes mais expressos nas plantas tratadas com o agente de biocontrole do que no controle, planta sozinha. O maior aumento na expressão relativa do gene PER foi detectado com 48 horas de interação, sendo 17,33 vezes mais expresso no feijoeiro quando crescido com o isolado 457/02, o gene LOX também deve uma maior expressão com 48 de interação.

As plantas de feijoeiro cultivadas na presença do isolado 303/02 de *T. harzianum* também apresentaram aumento na concentração dos transcritos dos genes codificadores das enzimas de defesa Chit e GLU e PAL nos três tempos de cultivos analisados, porém houve um perfil distinto no aumento da expressão relativa das interações com os outros dois isolados

(Figura 12). A expressão dos genes Chit 1, GLU e PAL foi aumentando ao longo do tempo de interação, com 72h de interação esses genes foram respectivamente 142,7, 43,8 e 45,05 vezes mais expressos com relação à planta controle. Enquanto que praticamente não houve aumento na expressão relativa do gene PER e LOX.

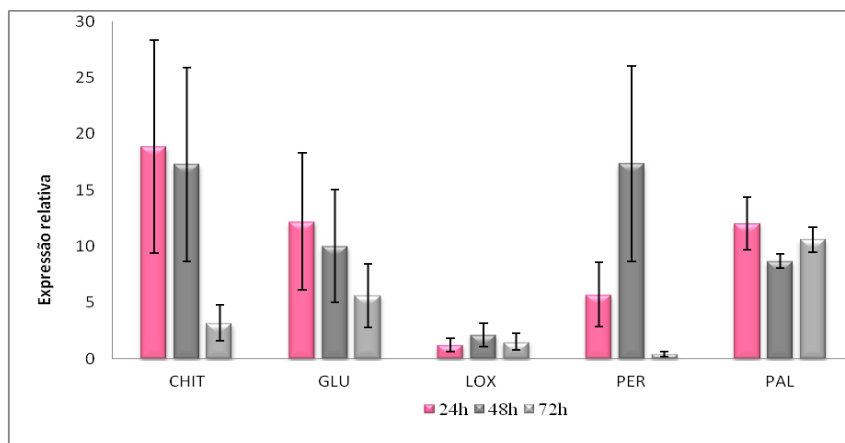


Figura 11: Análise de expressão relativa de genes relacionados com o biocontrole do isolado 457/02 de *Trichoderma harzianum* em co-cultivo com feijoeiro comum. Os dados estão normalizados pela expressão dos genes específicos versus a referência controle, gene β -Actina, apresentados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta Ct = Ct$ gene específico – Ct gene referência e $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct -$ constante arbitrária (o maior ΔCt). Cada amostra foi analisada em triplicata. As barras representam o erro padrão.

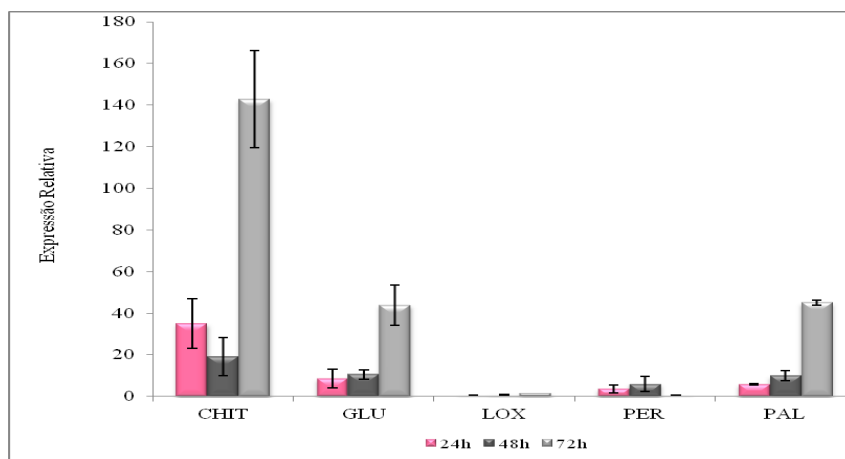


Figura 12: Análise de expressão relativa de genes relacionados com o biocontrole do isolado 303/02 de *Trichoderma harzianum* em co-cultivo com feijoeiro comum. Os dados estão normalizados pela expressão dos genes específicos versus a referência controle, gene β -Actina, apresentados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta Ct = Ct$ gene específico – Ct gene referência e $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct -$ constante arbitrária (o maior ΔCt). Cada amostra foi analisada em triplicata. As barras representam o erro padrão.

4.5. Análise do secretoma da interação *T. harzianum* 303/02-feijoeiro comum

4.5.1. Análise descritiva dos dados de espectrometria de massas por LC-MS/MS

Quando as sequências das proteínas da condição de Co-cultivo foram alinhadas contra o banco de dados de *P.vulgaris* foram identificadas apenas 07 proteínas, conforme pode ser visto na tabela, sendo 2 Trypsin/ protease inhibitor, 2 GHs, famílias 17 e 18 e 2 proteínas relacionadas a patogêneses (tabela 3).

Não foram identificadas proteínas no secretoma da condição Planta.

Quando as sequências das proteínas da condição de Fungo e Co-cultivo foram alinhadas contra o banco de dados de *Trichoderma harzianum* foram identificadas 187 e 158 proteínas nos secretomas das condições: fungo e co-cultivo, respectivamente, sendo que destas 135 proteínas são comuns a ambos os tratamentos (Figura 13). O alinhamento das sequências dos secretomas das condições co-cultivo e planta contra o banco de dados de *P. vulgaris* levou à identificação de 7 proteínas na condição de co-cultivo e nenhuma para a condição planta.

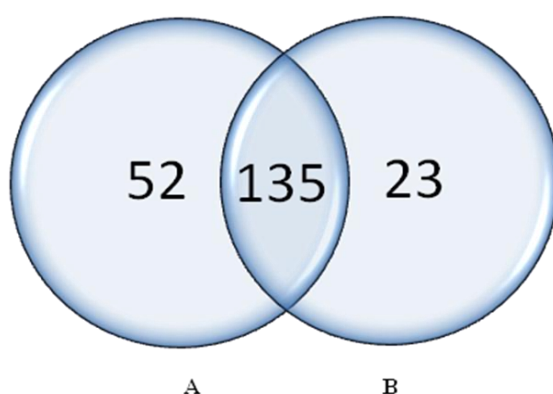


Figura 13. Diagrama de Venn representando o número de proteínas identificadas nos secretomas do isolado 303/02 de *T. harzianum* crescido na presença e ausência de feijoeiro comum. Em fungo (A) foram identificadas 187 proteínas e na condição co-cultivo (B) foram identificadas 158 proteínas.

Das 23 proteínas que foram identificadas no secretoma da condição: feijoeiro comum na presença do isolado 303/02 (Co-cultivo), 6 são glicosil hidrolases das famílias, 2, 12, 28, 35, 92 e GH-D. Foram identificadas, ainda, peptidase (aspartato endopeptidase, serinoendopeptidase, peptidase A1, e Peptidase S51), uma Ribonuclease T2, uma desidrogenase FMN-dependente, uma proteína contendo domínio de ligação à celulose, uma amidohidrolase, dentre outras sem anotação no banco de dados como pode ser visto na tabela

Das 52 proteínas identificadas no secretoma da condição fungo foram encontradas 12 glicosil hidrolases, 7 peptidases (aspartato endopeptidases, 3 subtilases, 2 serinoendopeptidases), foram identificadas outras proteínas com atividade hidrolítica e contendo domínio de ligação à celulose, os Citocromos P450 e B5, cupina, uma alginato liase, uma proteína relacionada a defesa, Barwin-related endoglucanase entre outras sem anotação (Tabela 4).

Das 135 proteínas identificadas que são comuns a ambos os tratamentos foram encontradas 39 glicosil hidrolases, 18 peptidases (2 aspartato endopeptidases, 4 serina endopeptidases, 3 subtilisinas, 4 metalopeptidases 2 carboxipeptidase, 1 com atividade catalítica e 1 com atividade de peptidase). Foram identificadas, ainda, 3 ribonucleases, 3 pectinas liases, 11 oxidoreductases, 7 catalases, 1 glicose desidrogenase, glicosidases, lipases e esterases. Além destas foram identificadas uma proteína de adesão (*invasin/Intimin cell-adhesion*), uma pequena proteína secreta (*small secreted protein*) e uma cerato-platanina (Tabela 4).

Tabela 4: Proteínas identificadas nos secretomas do isolado 303/02 de *Trichoderma* crescido na presença, condição co-cultivo, e na ausência, condição fungo, do feijoeiro comum após 48h de cultivo.

Accession number	Name protein (NCBI) or Domain	Molecular Function	PEP	Matched peptides	Unique peptide	Sequence coverage (%)	Mol. weight [kDa]	Parameters of expression
71962	Glycosyl hydrolase, clan GH-D	hydrolase activity	1,99E-11	4	4	11,3	67,48	C
362876	Glycoside hydrolase, family 2	hydrolase activity	8,91E-10	2	2	2,6	98,91	C
112585	Glycoside hydrolase, family 12	cellulase activity	2,82E-03	2	2	6,8	26,61	C
88799	Glycoside hydrolase, family 28	polygalacturonase activity	3,42E-09	3	3	7,2	47,98	C
222278	Glycoside hydrolase, family 35	beta-galactosidase activity	1,80E-24	6	6	6,9	111,50	C
508873	Glycosyl hydrolase 92	No annotation	2,89E-08	2	2	2,9	96,40	C
507934	Amidohydrolase 3	hydrolase activity	4,19E-23	2	2	5,8	60,67	C
145824	Peptidase A1	aspartic-type endopeptidase activity	1,32E-06	2	2	11,5	38,34	C
506924	Peptidase S51	serine-type peptidase activity	9,42E-14	3	3	11,9	30,35	C
1889	Protease-associated PA	peptidase activity	2,34E-06	2	2	6,7	52,92	C
104414	Ribonuclease T2	endoribonuclease activity	5,55E-16	4	4	19,3	35,57	C
92277	bZIP transcription factor, b ZIP-1	No annotation	5,19E-03	2	2	7,8	61,17	C
383927	K Homology, type 1	RNA binding	1,22E-02	2	2	18,4	39,29	C
496346	FMN-dependent alpha-hydroxy acid dehydrogenase	FMN binding	8,18E-18	4	4	17,2	41,97	C
88968	Cellulose-binding region, fungal	hydrolase activity	2,38E-31	4	4	6,8	88,04	C
491972	Beta-Ig-H3/fasciclin	No annotation	1,87E-06	2	2	9,7	37,11	C
511404	Extracellular membrane protein, 8-cysteine region	No annotation	6,00E-15	4	4	26,4	18,79	C
95636	FAD linked oxidase	catalytic activity	5,82E-13	4	4	7,9	56,44	C
74943	Predicted protein	No annotation	5,11E-06	2	2	16,9	13,82	C
9834	Uncharacterised conserved protein UCP028846	catalytic activity	1,24E-03	2	2	3,6	58,39	C
3216	No annotation	No annotation	1,20E-09	3	3	8,9	58,24	C
499734	No annotation	No annotation	7,45E-95	2	2	6	58,41	C
513561	No annotation	No annotation	1,46E-20	5	5	16,5	43,76	C
86322	Glycoside Hydrolase	No annotation	5,01E-112	6	6	39,3	29,82	F

99043	Glycoside hydrolase, superfamily	No annotation	1,30E-30	4	4	11,9	50,52	F
94444	Glycoside hydrolase, clan GH-D	hidrolase activity	3,97E-134	8	8	26,9	52,80	F
499264	Glycoside hydrolase, catalytic core	No annotation	1,02E-04	2	2	4,5	50,29	F
148225	Glycoside hydrolase, Chitinase active site	hydrolase activity	7,14E-39	3	3	11	41,61	F
127782	Glycoside Hydrolase Family 3 protein	hydrolase activity	1,47E-62	7	7	11,9	92,76	F
14278	Glycoside Hydrolase Family 5 protein	hydrolase activity	8,05E-07	2	2	8,2	45,01	F
441083	Glycoside Hydrolase Family 5 protein	hydrolase activity	2,61E-50	3	3	17,4	44,39	F
524327	Glycoside hydrolase, family 25	lysozyme activity	4,15E-14	5	5	28,9	24,11	F
129594	Glycoside Hydrolase Family 55 protein	No annotation	5,79E-93	12	12	19,5	107,29	F
152795	Glycoside hidrolase family 71 protein	No annotation	2,87E-87	7	7	23,7	65,01	F
96795	Glycosil hydrolase family 93 protein	No annotation	3,34E-09	2	2	12,1	38,53	F
103277	Peptidase A1	aspartic-type endopeptidase activity	3,42E-06	2	2	5,7	49,24	F
86893	Peptidase A1	aspartic-type endopeptidase activity	5,49E-57	7	7	28,2	39,59	F
210061	Peptidase A1	aspartic-type endopeptidase activity	8,53E-45	3	3	11,8	40,40	F
485406	Peptidase A1	aspartic-type endopeptidase activity	1,74E-18	2	2	4,1	52,51	F
493562	Peptidase A1	aspartic-type endopeptidase activity	4,68E-260	10	10	41,6	42,33	F
91534	Peptidase G1	aspartic-type endopeptidase activity	1,24E-05	2	2	10,7	22,02	F
98848	Peptidase G1	aspartic-type endopeptidase activity	5,38E-31	2	2	9,8	24,03	F
479338	Peptidase S8 and S53	subtilase activity	3,42E-10	2	2	4	71,32	F
99104	Protease S8 tripeptidyl peptidase	subtilase activity	1,67E-56	4	4	10,5	67,50	F
133093	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin	serine-type endopeptidase activity	1,30E-05	3	3	7,6	88,34	F
154554	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin	subtilase activity	2,80E-178	3	3	9,3	67,22	F
510269	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin	erine-type peptidase activity	4,24E-45	5	5	18,6	65,50	F
514427	Peptidase S60	ferric iron binding	2,30E-09	3	3	8,8	49,25	F
98670	Tripeptidyl peptidase a	serine-type endopeptidase activity	6,64E-30	4	4	15	66,25	F
41132	Guanine-specific ribonuclease N1 and T1	RNA binding	4,30E-12	2	2	47,6	11,23	F
619	polysaccharide lyase family 7 protein	No annotation	2,29E-42	3	3	21,5	25,63	F
551452	Alginate Lyase 2	No annotation	1,59E-24	4	4	29	25,74	F
81377	Cutinase	catalytic activity	1,64E-10	3	3	16,8	30,54	F
98691	Fungal chitosanase	No annotation	4,87E-04	2	2	18,3	23,93	F

497285	Phosphoesterase	hidrolase activity	1,83E-28	3	3	6,4	68,98	F
7497	Cellulose-binding region, fungal	hidrolase activity	2,91E-116	11	11	23,4	53,16	F
500888	Cellulose-binding region, fungal	hidrolase activity	1,03E-33	4	4	16,6	41,80	F
511848	Cytochrome P450	monooxygenase activity	1,27E-07	2	2	13,1	25,47	F
507747	Cytochrome b5	transition metal ion binding	5,03E-10	2	2	34,6	14,53	F
509274	ATPase, F1/V1/A1 complex	hydrogen ion transmembrane transporter activity	2,91E-10	2	2	3,6	59,56	F
510668	ATPase, F1/V1/A1 complex	nucleotide binding/hydrogen-exporting ATPase activity	1,19E-21	4	4	13,1	54,86	F
503899	Mitochondrial carrier protein	transporter activity	2,16E-12	2	2	8,3	32,40	F
143083	PROKAR-LIPOPROTEIN	No annotation	1,87E-28	7	7	19,8	41,85	F
127315	PROKAR-LIPOPROTEIN	No annotation	1,72E-57	5	5	25,4	41,82	F
553057, 494360 and 59504	Ubiquitin	structural constituent of ribosome	1,75E-07	2;2;2	2;2;2	28,9	34,30	F
487539	Cupin 1	nutrient reservoir activity	8,73E-38	6	6	21,4	52,85	F
150179	Glycolipid anchored surface protein GAS1	No annotation	6,18E-130	10	10	27,2	57,16	F
84435	Barwin-related endoglucanase	No annotation	2,79E-34	5	5	46,8	11,25	F
270898	Hypothetical protein CCM_03743	No annotation	1,22E-46	8	8	32,2	40,34	F
36398	No annotation	No annotation	2,54E-34	3	3	30,7	19,96	F
485526	No annotation	No annotation	3,29E-40	2	2	10,4	29,51	F
493163	No annotation	No annotation	3,88E-05	2	2	5,3	39,97	F
493539	No annotation	No annotation	4,04E-09	2	2	8	22,90	F
494876	No annotation	No annotation	4,24E-03	2	2	10,5	26,51	F
514178	No annotation	No annotation	2,65E-12	4	4	5,1	136,80	F
15655	Glycoside hydrolase	No annotation	4,34E-72	8	8	27	52,22	F and C
21292	Glycoside hydrolase, catalytic core	No annotation	6,96E-151	14	14	27,8	51,89	F and C
72349	Glicoside hydrolase, catalytic core	No annotation	6,46E-111	11	11	47	42,34	F and C
498572	Glycoside hydrolase, catalytic core	No annotation	3,02E-89	7	7	37,8	28,13	F and C
509593	Glycoside hydrolase, catalytic core	No annotation	9,88E-44	3	3	18,5	38,99	F and C
93168	Glycoside hydrolase, clan GH-D	hidrolase activity	1,59E-299	6	6	27,1	50,56	F and C
509041	Glycoside hydrolase, clan GH-D	hidrolase activity	1,63E-134	16	16	43,7	48,26	F and C
16405	Glycoside Hydrolase, Family 2	hidrolase activity	2,31E-93	14	14	19,1	106,20	F and C
502570	Glycoside hydrolase, family 2	hidrolase activity	7,85E-81	19	19	37,7	68,39	F and C

99736	Glycoside hydrolase, family 3	hidrolase activity	0	24	24	42,1	91,24	F and C
502198	Glycoside hydrolase, family 3, N-terminal	hydrolase activity	2,79E-13	4	4	7,2	86,61	F and C
504610	Glycoside hydrolase, family 3, N-terminal	hydrolase activity	2,23E-35	6	6	11,1	84,25	F and C
71613	Glycoside hydrolase - family 3, N-terminal	hidrolase activity	2,88E-122	13	13	25,1	78,24	F and C
119344	Glycoside hydrolase, family 5	hidrolase activity	1,98E-48	4	4	15,2	47,95	F and C
93404	Glycoside hydrolase, family 5	hydrolase activity	5,27E-160	21	21	50,7	45,54	F and C
99972	Glycoside hydrolase, family 5	hydrolase activity	6,34E-09	4	4	9,3	49,96	F and C
508689	Glycosil hydrolase, family 6	hidrolase activity	4,15E-211	11	11	37,6	41,76	F and C
91773	Glycoside hydrolase family 10	hidrolase activity	0	14	14	62,5	34,99	F and C
115099	Glycoside hydrolase, family 11	hydrolase activity	8,13E-40	3	3	20,4	23,82	F and C
91916	Glycoside hydrolase family 12	cellulase activity	3,82E-54	4	4	17,9	25,48	F and C
81392	Glycosil hydrolase family 15	catalytic activity	0	14	14	35,8	67,29	F and C
150678	Glycoside hydrolase, family 16	hidrolase activity	7,79E-70	6	6	25,7	31,51	F and C
49445	Glycoside hydrolase, family 17	hydrolase activity	6,52E-18	6	6	23,3	35,34	F and C
9664	Glycoside hydrolase, family 18	hidrolase activity	5,84E-112	5	5	30,7	33,44	F and C
101028	Glycoside hydrolase, family 18	hidrolase activity	1,56E-263	17	17	69,5	46,35	F and C
487349	Glycoside hydrolase, family 18	hydrolase activity	2,83E-74	3	3	17	41,96	F and C
505895	Glycoside hydrolase, family 18	hydrolase activity	7,98E-106	7	7	44,7	36,12	F and C
484147	Glycoside hydrolase, family 20	beta-N-acetylhexosaminidase activity	2,87E-123	15	15	33,9	67,24	F and C
513145	Glycoside hydrolase, family 30	glucosylceramidase activity	7,12E-80	7	7	32,9	51,85	F and C
96491	Glycoside Hydrolase - family 31	hidrolase activity	9,93E-58	8	8	13,7	101,39	F and C
494994	Glycoside hydrolase, family 43	hydrolase activity	7,66E-35	5	5	17	55,04	F and C
487999	Glycoside hydrolase, family 47	mannosidase activity	0	20	20	56,9	55,65	F and C
513600	Glycoside hydrolase, family 62	No annotation	2,08E-77	6	6	33,9	34,56	F and C
120660	Glicoside hydrolase, family 71	hidrolase activity	0	19	19	57,4	51,86	F and C
525334	Glicoside hydrolase, family 71	No annotation	1,33E-66	10	10	29,3	67,46	F and C
155668	Glycoside hydrolase, family 71	No annotation	1,70E-109	9	9	17,4	63,53	F and C
497624	Glycoside hydrolase, family 71	No annotation	1,28E-123	9	9	33	46,63	F and C
479664	Glycoside hydrolase, family 81	No annotation	9,62E-15	4	4	6	92,19	F and C
506888	Glycosil hydrolase 92	No annotation	7,22E-167	14	14	26,1	89,04	F and C

84143	Glycosyl hydrolase 92	No annotation	9,33E-128	16	16	24,7	89,62	F and C
496107	Alpha/beta hydrolase fold-1	hydrolase activity	4,54E-36	6	6	29,9	37,27	F and C
155725	Peptidase A1	aspartic-type endopeptidase activity	8,55E-102	4	4	28,2	37,06	F and C
74616	Peptidase A1	aspartic-type endopeptidase activity	0	15	15	41,6	44,81	F and C
526221	Peptidase S1 and S6	catalytic activity	1,01E-62	8	8	38,4	25,88	F and C
506423	Peptidase S1 and S6, chymotrypsin/Hap	serine-type endopeptidase activity	2,41E-62	6	6	29,1	25,41	F and C
97128	Peptidase S28	serine-type peptidase activity	8,83E-22	5	5	13	56,32	F and C
149523	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin	serine-type endopeptidase activity	1,41E-39	4	4	12,4	57,60	F and C
477752	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin	serine-type endopeptidase activity	1,98E-23	6	6	8,3	92,57	F and C
110777	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin	subtilase activity	1,00E-109	5	5	30,1	42,48	F and C
487795	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin	subtilase activity	5,74E-170	17	17	25,4	101,48	F and C
511032	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin	subtilase activity	0	14	14	56,6	39,03	F and C
92805	Peptidase M, neutral zinc metallopeptidases	metallopeptidase activity	1,02E-240	21	21	39,8	72,71	F and C
502174	Peptidase M, neutral zinc metallopeptidases	metallopeptidase activity	7,28E-237	6	6	26,5	33,91	F and C
514267	Peptidase M14, carboxypeptidase A	carboxypeptidase A activity	9,27E-149	19	19	55,7	46,96	F and C
494007	Peptidase M14, carboxypeptidase A	carboxypeptidase activity	7,62E-212	13	13	50,5	46,52	F and C
500705	Peptidase M20	metallopeptidase activity	8,39E-23	4	4	12,7	51,82	F and C
501003	Peptidase M28	peptidase activity	0	12	12	48,2	40,00	F and C
507454	Peptidase M35, deuterolysin	metalloendopeptidase activity	9,42E-148	5	5	21,3	36,75	F and C
511763	Peptidase M36, fungalysin	metallopeptidase activity	3,47E-88	12	12	25,4	68,94	F and C
523270	Gamma-glutamyltranspeptidase	gamma-glutamyltransferase activity	2,88E-27	6	6	12,4	60,92	F and C
153694	Ribonuclease T2	endoribonuclease activity	9,32E-78	7	7	40,9	42,47	F and C
520729	Ribonuclease/ribotoxin	endoribonuclease activity	2,53E-37	5	5	54,5	14,55	F and C
81381	Ribonuclease t1	ribonuclease activity	4,80E-54	4	4	60,6	14,63	F and C
556268	Guanine-specific ribonuclease N1 and T1	ribonuclease activity	1,54E-13	3	3	36,6	13,46	F and C
366985	Serine proteinase **	No annotation	1,76E-17	3	3	16,3	32,60	F and C
482068	Proteinase inhibitor I7, squash	endopeptidase inhibitor activity	1,33E-45	2	2	3,1	164,75	F and C
112874	Pectin lyase fold/virulence factor	No annotation	1,89E-301	20	20	46,4	79,65	F and C
294827	Pectin lyase fold/virulence factor	No annotation	0	18	18	37,1	83,26	F and C
523201	Pectin lyase fold/virulence factor	No annotation	0	32	31	64,2	79,41	F and C

99422	Ferrulic acid esterase **	No annotation	1,69E-139	9	9	43,9	32,28	F and C
133058	Phosphoesterase	catalytic activity	6,91E-47	10	10	31	48,17	F and C
506417	Carboxylesterase, type B	No annotation	6,20E-37	5	5	16,5	61,88	F and C
513492	Alpha-L-arabinofuranosidase B	alpha-N-arabinofuranosidase activity	2,78E-51	9	8	21,6	51,28	F and C
503269	Alpha-L-arabinofuranosidase B	alpha-N-arabinofuranosidase activity	0	17	16	48,4	52,63	F and C
98222	Glucose-methanol-choline oxidoreductase, N-terminal	oxidoreductase activity	5,11E-73	12	12	39,1	59,34	F and C
508260	Acetohydroxy acid isomeroreductase C-terminal	ketol-acid reductoisomerase activity	0	19	19	50	44,81	F and C
510302	FAD dependent oxidoreductase	oxidoreductase activity	3,47E-172	16	16	51,2	49,36	F and C
501007	Catalase-peroxidase 2 **	catalase activity	3,34E-140	10	10	29,8	51,63	F and C
523580	Catalase-peroxidase	No annotation	1,92E-103	13	13	26,5	85,52	F and C
510303	Amine oxidase	oxidoreductase activity	0	24	24	33,7	69,55	F and C
145790	FAD linked oxidase, N-terminal	oxidoreductase activity	0	21	21	47,4	61,97	F and C
526009	FAD linked oxidase, N-terminal	oxidoreductase activity	9,18E-87	8	8	24	62,99	F and C
17170	FAD linked oxidase, N-terminal	oxidoreductase activity	2,03E-107	10	10	20,1	61,57	F and C
17842	FAD linked oxidase, N-terminal	oxidoreductase activity	1,34E-85	10	10	30	60,08	F and C
526112	FAD linked oxidase, N-terminal	oxidoreductase activity	3,14E-228	5	5	13,4	52,35	F and C
496217	FAD linked oxidase, N-terminal	oxidoreductase activity	1,25E-48	12	12	33,1	53,61	F and C
507229	FAD linked oxidase, N-terminal	oxidoreductase activity	4,82E-39	7	7	12,1	60,68	F and C
507873	FAD/NAD(P)-binding domain	No annotation	3,47E-41	4	4	12,3	62,86	F and C
92302	Superoxide dismutase, copper/zinc binding	metal ion binding	1,20E-293	6	6	60,7	14,90	F and C
2738	beta--endoglucanase **	No annotation	2,02E-99	8	8	24,6	73,02	F and C
506446	Carbohydrate-binding WSC	No annotation	1,40E-60	7	7	20,2	63,09	F and C
477855	Carbohydrate-binding WSC	No annotation	4,07E-126	11	11	13,8	117,59	F and C
142270	Beta-lactamase	Beta -lactamase activity	9,78E-24	6	6	15,8	63,52	F and C
4655	Lipase, active site	catalytic activity	1,03E-205	12	12	52,5	41,54	F and C
526309	secretory lipase	No annotation	2,19E-91	6	6	22,8	47,99	F and C
84515	Six-hairpin glycosidase-like	catalytic activity	9,65E-27	11	11	21,5	76,55	F and C
118590	Six-hairpin glycosidase-like	catalytic activity	1,88E-185	8	8	49	36,79	F and C
939	Lytic transglycosylase-like	catalytic activity	1,59E-24	2	2	9,9	26,38	F and C
489901	Alpha-1,2-mannosidase, putative	No annotation	1,18E-200	17	17	27,3	86,04	F and C

492278	ATPase, F0 complex, subunit A	hydrolase activity	2,42E-145	7	7	54,7	24,82	F and C
481512	Neutral/alkaline nonlysosomal ceramidase	No annotation	1,13E-230	17	17	30,6	79,70	F and C
503028	Putative isomerase YbhE	No annotation	1,03E-88	8	8	33,8	31,47	F and C
123184	Glycolipid anchored surface protein GAS1	No annotation	6,35E-90	8	8	24,3	56,20	F and C
510362	Peptidoglycan-binding LysM	No annotation	9,34E-112	6	6	18,6	59,82	F and C
511791	Amidase signature enzyme	No annotation	1,14E-138	17	17	35,8	62,55	F and C
93015	Cellulose-binding region, fungal	hidrolase activity	4,18E-05	2	2	4,7	40,39	F and C
73177	Aminoacyl-tRNA synthetase, class I	aminoacyl-tRNA ligase activity	1,46E-119	14	14	31,9	61,41	F and C
86843	Tyrosinase	oxidoreductase activity	3,18E-51	5	5	12	60,05	F and C
82004	Soluble quinoprotein glucose dehydrogenase	catalytic activity	2,69E-98	10	10	27,2	53,88	F and C
87202	Rare lipoprotein A	No annotation	1,50E-63	4	4	30,9	15,93	F and C
100314	Fasciclin domain	No annotation	2,29E-15	2	2	8,1	44,17	F and C
132526	MD-2-Related lipid-recognition	No annotation	1,45E-14	6	6	45,3	19,18	F and C
97878	Actin-binding FH2	No annotation	3,00E-57	5	5	21,4	34,52	F and C
273717	Invasin/intimin cell-adhesion	No annotation	2,23E-90	11	11	19,8	84,90	F and C
96469	Small secreted protein	No annotation	8,31E-20	3	3	21,1	15,41	F and C
78961	Cupredoxin	No annotation	1,91E-30	4	4	23	20,47	F and C
81319	Conidiospore surface protein	No annotation	6,40E-60	4	4	20,9	42,00	F and C
1760	EC86 protein	No annotation	1,99E-21	7	7	58	13,17	F and C
530250	Blue (type 1) copper domain	copper ion biding	2,53E-10	2	2	11,8	21,93	F and C
497470	Periplasmic binding protein-like II	No annotation	2,35E-25	4	4	21,1	40,70	F and C
508110	Cerato-platanin	No annotation	7,77E-227	5	5	73,9	14,36	F and C
486629	N/apple PAN	No annotation	1,08E-10	2	2	5,7	53,59	F and C
513288	NHL repeat	No annotation	1,79E-44	5	5	14,8	38,34	F and C
239112	Protein of unknown function DUF 1486	No annotation	1,52E-48	5	5	47	15,46	F and C
118476	Hypothetical protein GLRG_10823	No annotation	1,56E-79	6	6	58,3	19,19	F and C
518220	Hypothetical protein TRIVIDRAFT_30	No annotation	1,39E-17	3	3	18,3	15,65	F and C
90982	Hypothetical protein TRIVIDRAFT_15	No annotation	3,45E-40	7	7	15	56,64	F and C
78103	Hypothetical protein TRIVIDRAFT_63	No annotation	4,73E-05	3	3	8,9	17,96	F and C
480133	No annotation	No annotation	7,89E-32	3	3	19,7	23,98	F and C

506734	No annotation	No annotation	8,49E-06	2	2	10,8	20,97	F and C
506744	No annotation	No annotation	2,52E-70	5	5	48,1	14,47	F and C
507042	No annotation	No annotation	1,56E-235	12	12	64,1	30,78	F and C
510457	No annotation	No annotation	0	10	10	48,3	46,56	F and C
511312	No annotation	No annotation	1,13E-207	9	9	62,1	21,39	F and C
514104	No annotation	No annotation	1,59E-25	4	4	10,3	40,10	F and C

** Nome das proteínas encontradas no NCBI, qu não tinham anotação no banco de dados de *Trichoderma harzianum*.

PEP-*Posterior Error Probability* ≤ 1 .

Nos parâmetros de expressão C significa co-cultivo e F fungo, representando as condições de cultivo das quais foram identificadas as proteínas.

Para confirmar a possibilidade de diferenciar as proteínas de uma amostra com misturas proteicas oriunda de dois organismos diferentes apenas com o pareamento dos bancos específicos, foram analisadas as sequências de 2 Glicosil hidrolases, 17 e 18, encontradas na condição co-cultivo quando pareadas nos banco de planta e de fungo.

Essa análise resultou em proteínas com sequências diferentes e peptídeos identificados distintos, concluído que são glicosil hidrolases diferentes. Confirmando assim a importância da identificação de peptídeos únicos realizado pelo MaxQuant para a confiabilidade do resultado.

Tabela 5. Análise das sequências das proteínas Glicosil hidrolase 17 e 18 de uma amostra proteica obtida da interação de dois organismos, feijoeiro e isolado 303/02 de *Trichoderma*. As letras em azul representam os aminoácidos distintos das sequências de proteínas.

Glicosil hidrolase 17 - Cocultivo (Banco Planta)

MASQFPRNQRFSFAAFIIIFQIFTVNIITTADAQIGVCYGMGNIPSA
NEVINIYRSNNIRMR **IYDPNQAAIQAIR**NSGIEIIIGVPNSDIQGIATN
ADTARQWVQRNVINFWPSVKIKYIavgNEVSPVGGSSWYAQYVIPA
VQNVYQAVRAQGIHDQIKVSTAIMTIIGNSYPPSQGSFRGDVRSYI
DPIIGYIIYASAPIIVNVYPYFSYSGNPRDISIPYAIFTSPNVVVR **DGQY**
GYQNIFDAMIDSVHAAIDNTRIGYVEVVVSESGWPSDGGFGATYDN
ARVYIDNIVRRAGRGSRRRPSKPTETYIFAMFDENQKSPEIEK **HFGIF**
KPSKEKKYPFGFGAQRDAKIVVDEFNATYPIKSDM

Glicosil hidrolase 17 - Cocultivo (Banco Fungo)

MKISSTIATGVAIAAGVSAGQK **NYIGFNsgNTIPDESAK**FEK **DFIAEF**
TTAQKIVGAPGTFNAVRIYTNIQAYSTNTPIEAFSAAVKTKTYIIIGV
WASGTTNINNEIAAITAAVKQFGTDFTDIVIGISIGSEDIYRDSATGRT
NKAGVGNGPQEIIIGFINDYKKAFANTPMASVPIGHVDTWDAWVNGT
NKVVIDAVDWIGVDEYPFYETGKGNDISNAGKIFDAAYQTTIGVANG
KPVWVTETGWPITGPDWDEAKPSVANAKSYWDQIGCQRIFNK **VPTF**
WYNIRDSNPANQVKFGISQSSSTPSFDITCPPESSESSSAITKPT

Glicosil hidrolase 18 - Co-cultivo (Banco de Planta)

MAFNSIAFNVRKWKCACTAFINNITTKYFTTRSEENIIFFTVPMAYS
KKFSFIIPFIIIMIHIHESTAKIKGGYWFTASGSPASNINSTIFNHIFCAF
ADIDPNTYKVTISSSNAAQFSSFTQTVQQKNPSVKTIISIGGGASNPST
FSAMASQSSSRKSFIDSSIQARSNNFHGVDIDWEYPPSSSDMQNIGI
IAREFR **TSIISEGR**NSGKAPIIITA AFFYSYNYYSIDYPAKAINESFDI

NVMAYDFHGPWFNRPNR **TAPPAGIYFQR**NSGAYQVSGDIGIRSWIAA
GVAAQKIAIGIPYYGYAWRIVNANNNGIYAPATGSFAFGDGSMGYN
QIRAFVSNRARC VYNSTVVTDYCYSGTTWIGYDDVQSVTAKVNYC
KKNIGIFYVWHVVGADDNWVISQTAYRTMG

1. Glicosil hidrolase 18 - Co-cultivo (Banco de Fungo)

MFVRNAVVAITGIIASISNAIPAKRAVDAGNARIVIYWGAEDDSTTISD
VCSDDSYGIVNIAFINR **FFAAGGWPEISMSGIDNSSDAQQSAGATGIK**
DGSGIVDAIKQCQSAG KIVIISIGGADADVTIQSDSDGEK **IADTIWNIF**
GGGTENAEIRPFGDVKIDGFDIDNESGDSTGYIAMTQRFRSNFQSDTS
KTTYITAAPQCPFPDASEPIDVCKEINYVWVQFYNNGDCNIAQSDFK
NSVQTWSSGIGNATIFIGAIASGADGDQGYVDADTIVSSIQDVKNMNI
PNYGGAMIWEAQIAVKNGNFQKQIAAGI

1. Glicosil hidrolase 18 - Co-cultivo (Banco de Fungo)

MIFSKAIAAAGIATAAYAAPTATVEKRAAGGKIVVYWGAEDDSTTIA
NVCADPSYDIVNIAFISRFFAGGGYPEISISTIGGPSAAQKSAGATNIQ
DGTSIVPAIQACQAAGKIVIISMGGAVDFS AVTITGDAQGQQIADTV
WNIFIGGTANPTIRPFGSVK **IDGV DIDNETGNPTGYIAMAQR**FKSNFA
KDTSKKYYITAAPQCPFPDASEPINVCQIADYIWWQFYNNDCNIAQS
GFNTAVKNWSK SIGNATIFIGAIASGADGDQGFVSSSTIISAYQGVSAI
NIPNIGGIMIWEAQIAVKNGNYQKTIKAGISSGSGTTPPPTQSSTPSGGS
GTC SWAGHCAGASC GSDDDCSDSITCNSGVCGTAGSTPPPATCSWEG
HCIGASC GNDDDCSDPYSCKNGVCSN

2. Glicosil hidrolase 18 - Co-cultivo (Banco de Fungo)

MTRIIDASFIIPVIASTIFGTASAQSTCATKGKPAKVIQGYWENWDG
SANGVHPGFGWTPIENPVIAQNGYNVINA AFPVIISDGTAIWEDGMDA
TVK **VATPAEMCQAK**AAGATIIMSIGGATAGIDISSSTVADK **FISTIVPI**
IKQYNFDGIDIDIETGIVGSGSIGTISTSQANIIRIIDGVIAQMPSNFGIT
MAPETAYVTGGSVVYGSIWGSYIPIIKKYVDNNGRIWWINMQYYNGDMY
GCSGDSYAAGTVQGFTAQTDCINNGITIQTGTTIK **VPYNMQVPGIPAQS**
GAGGGYMTPSIVGQAWDHYNGAIKGIMTWSINWDGSKNWT FADNIIR
I

4.5. 2. Análise *Label free*

O padrão de dispersão dos dados sugere que há uma maior correlação entre as réplicas biológicas (intra-classe) do que entre as condições Fungo e co-cultivo (inter-classe). A melhor correlação intra-classe encontrada foi os dados da C I com C III, ambos do co-cultivo, onde foi encontrado um r^2 igual a 0,963, indicando alta correlação, porém ao comparar o mesmo C I com o F III, foi observado uma baixa correlação, r^2 igual a 0,0159, como pode ser observado na figura 14. Esses valores possibilitaram a comparação pelo método *Label-free* entre as condições sem grande interferência da variação biológica como pode ser observado na tabela 5.

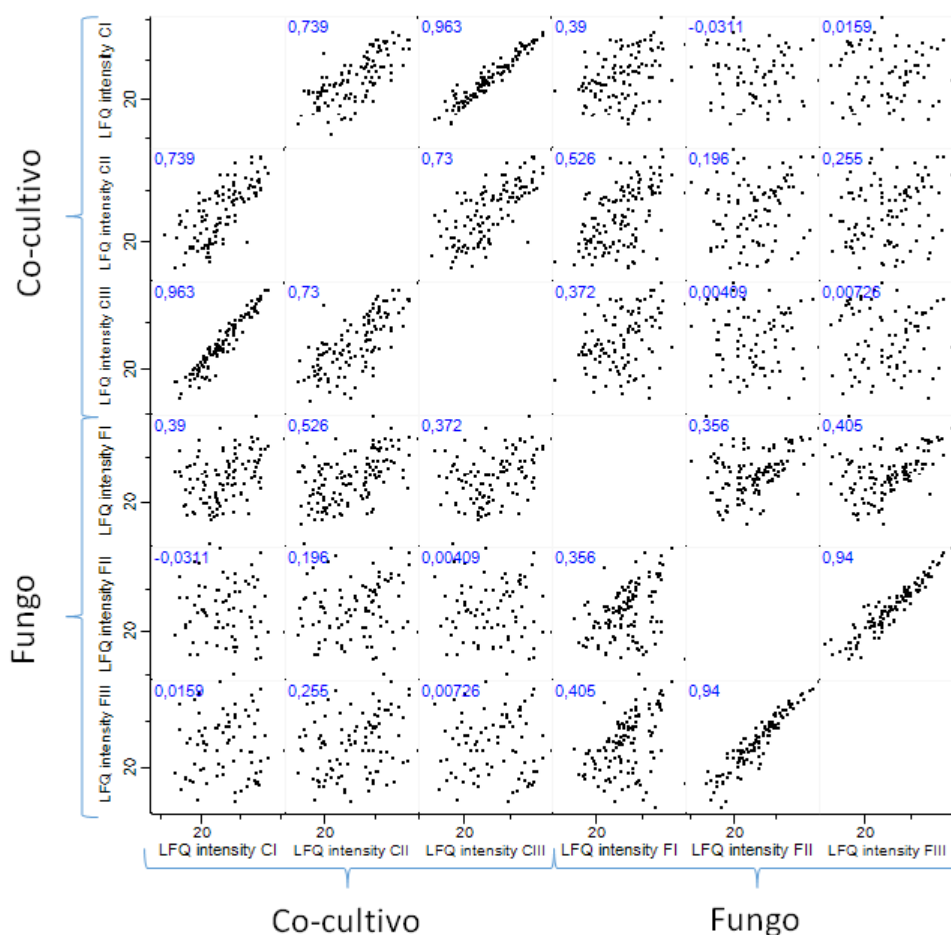


Figura 14: Análise de correlação de Pearson (r) entre as condições Co-cultivo e fungo. Todos os dados foram normalizados em \log_2 .

A comparação entre os peptídeos das condições Co-cultivo e Fungo 303/02 pela metodologia *Label Free quantification* e seu pareamento contra o banco de dados do

fungo *T. harzianum* levou à identificação de 8 proteínas exclusivas da condição co-cultivo sendo elas uma GH da família 28 que compreende polygalacturonases e o clan-D: formado pelas famílias 27, 31 e 36, compreendendo enzimas como as α -galactosidase, α -1,3-glicosidase e α -xylosidase.

Para a condição Fungo foram encontradas 22 proteínas exclusivas, sendo a maioria classificadas como Glicosil-hidrolases das famílias 3 (β -glucosidase, β -1,4-xilosidase, β -1,4-glicosidase, β -1,3-glicosidase, enzimas que agem em diferentes substratos.), 5 (compreende muitas enzimas hidrolíticas como chitomanase; β -manosidase; endo- β -1,4-glicanase / celulase; glicana β -1,3-glicosidase) 7 (endo- β -1,3 e 1,4-glicanase; chitomanase) 18 (chitinase tipo II) e uma das sequências corresponde a proteínas do clan-D. Além destas foram encontradas as proteínas cupina, alginato liase e peptidase A1 como exclusivas desta condição.

Conforme pode ser visto na tabela 6, através da abordagem *Label Free*, foi possível também identificar 15 proteínas secretadas diminuídas para a condição de Fungo e, conseqüentemente, aumentadas para a condição co-cultivo, algumas glicosil hidrolases e proteases, enquanto que 09 proteínas apareceram aumentadas para a condição de Fungo quando comparadas ao banco do Fungo.

Tabela 6. Comparação entre os peptídeos das condições Co-cultivo e Fungo 303/02 pela metodologia *Label Free quantification* . utilizando o Banco de *Trichoderma harzianum*. Utilizou-se teste T-student com significância de $p \leq 0,05$.

Accession number	Name protein (NCBI) or Domain	PEP	Matched peptides	Unique peptide	Sequence coverage (%)	Mol. weight [kDa]	Max Fold Change	t-test p-value	Parameters of expression
508689	Glycoside hydrolase, family 6	4,15E-211	11;1	11;1	37,6	41,76	3,52	0,01	↑ F
81392	Glycosil hydrolase, family 15	0	14	14	35,8	67,29	2,87	0,00	↑ F
505895	Glycoside hydrolase, family 18	7,98E-106	7	7	44,7	36,12	3,08	0,00	↑ F
101028	Glycoside hydrolase, family 18	1,56E-263	17;1	17;1	69,5	46,35	6,92	0,03	↑ F
120660	Glycoside hydrolase, family 71	0	19	19	57,4	51,86	6,60	0,00	↑ F
511032	Peptidase S8 and S53, subtilisin, sedolisin	0	14	14	56,6	39,03	6,89	0,03	↑ F
494007	Peptidase M14, carboxypeptidase A	7,62E-212	13	13	50,5	46,52	5,54	0,05	↑ F
482068	Proteinase inhibitor I7, squash	1,33E-45	2	2	3,1	164,75	4,96	0,04	↑ F
294827	Pectin lyase fold/virulence factor	0	18	18	37,1	83,26	5,73	0,00	↑ F
17170	FAD linked oxidase, N-terminal	2,03E-107	10	10	20,1	61,57	1,02	0,02	↑ F
526112	FAD linked oxidase, N-terminal	3,14E-228	5	5	13,4	52,35	1,79	0,01	↑ F
84143	Alpha-1,2-mannosidase, putative	9,33E-128	16	16	24,7	89,62	2,62	0,01	↑ F
477855	Carbohydrate-binding WSC	4,07E-126	11	11	13,8	117,59	2,99	0,04	↑ F
273717	Invasin/intimin cell-adhesion	2,23E-90	11	11	19,8	84,90	2,96	0,00	↑ F
507042	No annotation	1,56E-235	12	12	64,1	30,78	6,99	0,02	↑ F
71613	Glycoside hydrolase, family 3, N-terminal	2,88E-122	13	13	25,1	78,24	-2,75	0,00	↓ F
150678	Glycoside hydrolase, family 16	7,79E-70	6	6	25,7	31,51	-7,50	0,02	↓ F
487999	Glycoside hydrolase, family 47	0	20	20	56,9	55,65	-6,09	0,02	↓ F
525334	Glycoside hydrolase, family 71	1,33E-66	10	10	29,3	67,46	-3,91	0,01	↓ F
153694	Ribonuclease T2	9,32E-78	7	7	40,9	42,47	-2,17	0,04	↓ F
523201	Pectin lyase fold/virulence factor	0	32	31	64,2	79,41	-7,12	0,01	↓ F
503028	Putative isomerase YbhE	1,03E-88	8	8	33,8	31,47	-2,93	0,04	↓ F
1760	EC86 protein	1,99E-21	7	7	58	13,17	-4,47	0,05	↓ F
510457	No annotation	0	10	10	48,3	46,56	-5,38	0,02	↓ F

71962	Glycoside hydrolase, clan GH-D	1,99E-11	4	4	11,3	67,48	C
88799	Glycoside hydrolase, family 28	3,42E-09	3	3	7,2	47,98	C
507934	Metal-dependent hydrolase, composite	4,19E-23	2	2	5,8	60,67	C
506924	Peptidase S51, dipeptidase E	9,42E-14	3	3	11,9	30,35	C
104414	Ribonuclease T2	5,55E-16	4	4	19,3	35,57	C
95636	FAD linked oxidase, N-terminal	5,82E-13	4	4	7,9	56,44	C
511404	Extracellular membrane protein	6,00E-15	4	4	26,4	18,79	C
94444	Glycoside hydrolase, clan GH-D	3,97E-134	8	8	26,9	52,80	F
99043	Glycoside hydrolase, catalytic core	1,30E-30	4	4	11,9	50,52	F
127782	Glycoside hydrolase, family 3, N-terminal	1,47E-62	7;1	7;1	11,9	92,76	F
14278	Glycoside hydrolase, family 5	8,05E-07	2	2	8,2	45,01	F
7497	Glycoside hydrolase, family 7	2,91E-116	11	11	23,4	53,16	F
148225	Glycoside hydrolase, family 18	7,14E-39	3	3	11	41,61	F
500888	Glycoside hydrolase, family 18	1,03E-33	4	4	16,6	41,80	F
152795	Glycoside hydrolase, family 71	2,87E-87	7	7	23,7	65,01	F
493562	Peptidase A1	4,68E-260	10	10	41,6	42,33	F
210061	Peptidase A1	8,53E-45	3	3	11,8	40,40	F
619	polysaccharide lyase family 7 **	2,29E-42	3	3	21,5	25,63	F
551452	Alginate lyase 2	1,59E-24	4	4	29	25,74	F
41132	Guanine-specific ribonuclease N1 and T1	4,30E-12	2	2	47,6	11,23	F
84435	Barwin-related endoglucanase	2,79E-34	5	5	46,8	11,25	F
497285	Phosphoesterase	1,83E-28	3	3	6,4	68,98	F
487539	Cupin 1	8,73E-38	6	6	21,4	52,85	F
129594	Carbohydrate-binding WSC	5,79E-93	12	12	19,5	107,29	F
150179	Glycolipid anchored surface protein GAS1	6,18E-130	10	10	27,2	57,16	F
86322	Lysozyme-like	5,01E-112	6	6	39,3	29,82	F
127315	PROKAR_LIPOPTEIN	1,72E-57	5	5	25,4	41,82	F
36398	GPI anchored**	2,54E-34	3	3	30,7	19,96	F
270898	Hypothetical protein CCM_03743**	1,22E-46	8	8	32,2	40,34	F

Nos parâmetros de expressão \uparrow F significa presença aumentada no secretoma da condição de Fungo e \downarrow C diminuída presença da proteína no secretoma da condição de Fungo; F proteínas exclusivas de fungo e C e exclusiva do co-cultivo.

PEP-Posterior Error Probability ≤ 1 .

4.5.3. Função molecular das proteínas identificadas

As proteínas identificadas em cada condição foram agrupadas de acordo com a função molecular e o processo biológico, encontradas a partir do GO (*Gene Ontology*) do banco de dados de *T. harzianum*. As proteínas identificadas no secretoma da condição Fungo apresentavam foram agrupadas em 11 subgrupos de acordo com suas funções moleculares (Figura 15), sendo que o maior grupo foi composto por proteínas com atividade hidrolítica, 30,17 %, seguido de proteínas com atividade oxidoreductora com 9,48 % e catalítica com 8,62 %. Também poder ser observado atividades de serina e aspartato-proteases que aparecem em grande quantidade com 5,17 % e 7,75 % respectivamente. O subgrupo Outros (22,41 %) reúne todas as proteínas que foram identificadas apenas uma vez, como as proteínas com atividade de monoxigenase, manosidase, entre outras. A lista completa encontra-se em anexo.

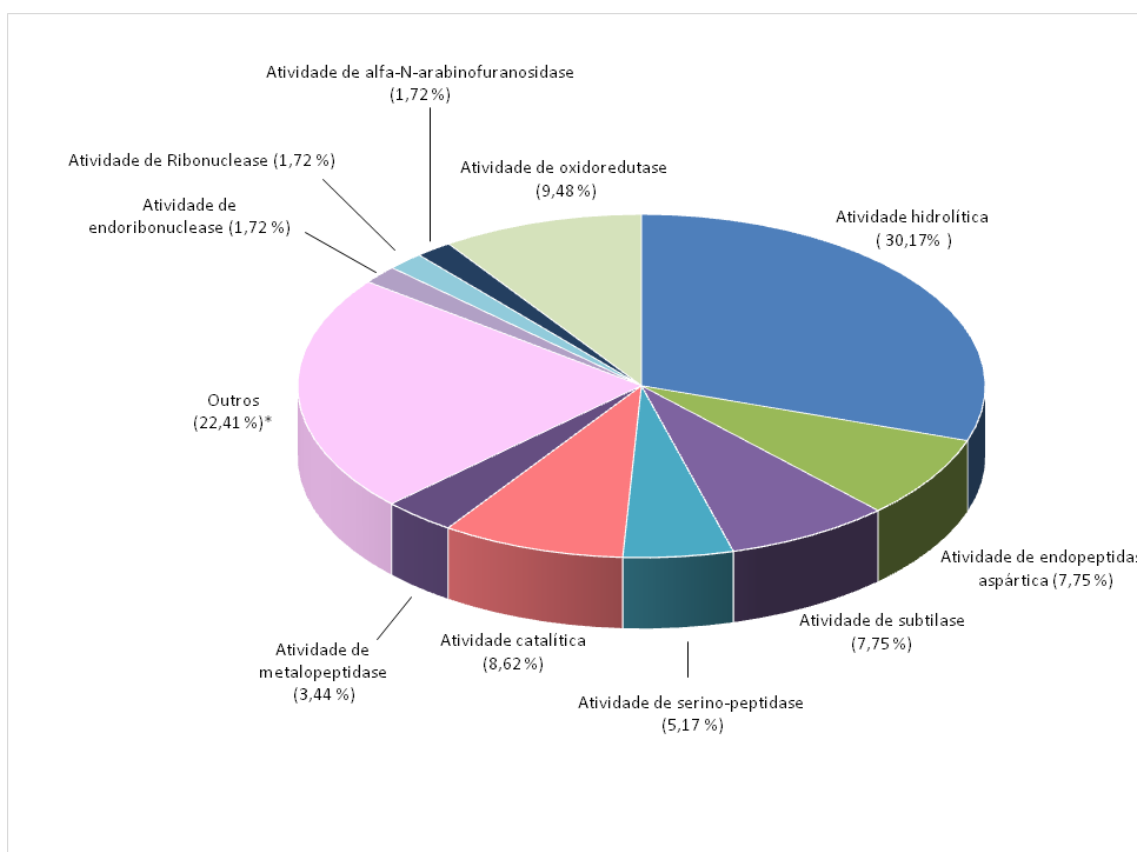


Figura 15. Função molecular das proteínas identificadas no secretoma do isolado 303/02 de *T. harzianum*, com 48h de crescimento (Condição Fungo). * A lista completa com as proteínas incluídas neste grupo Outros encontra-se disponível nos anexos.

As proteínas do secretoma da interação isolado 303/02 de *T. harzianum*/ feijoeiro comum também, foram categorizadas de acordo com a função molecular pelo GO, em 13 subgrupos, como pode ser observado na figura 16. Assim como observado no secretoma do fungo sozinho o maior subgrupo foi de proteínas com atividade hidrolítica com 32,29 %, seguido das proteínas com atividade de oxidoreductase e catalíticas, ambas com 11,45 %. As proteínas com atividade de serina-peptidase também foram representativas, 5,20 % e novamente as proteínas que foram identificadas apenas 1 vez foram agrupadas no subgrupo Outros, como proteínas com atividade de carboxipeptidase A, metaloendopeptidase, β -galactosidase, entre outras.

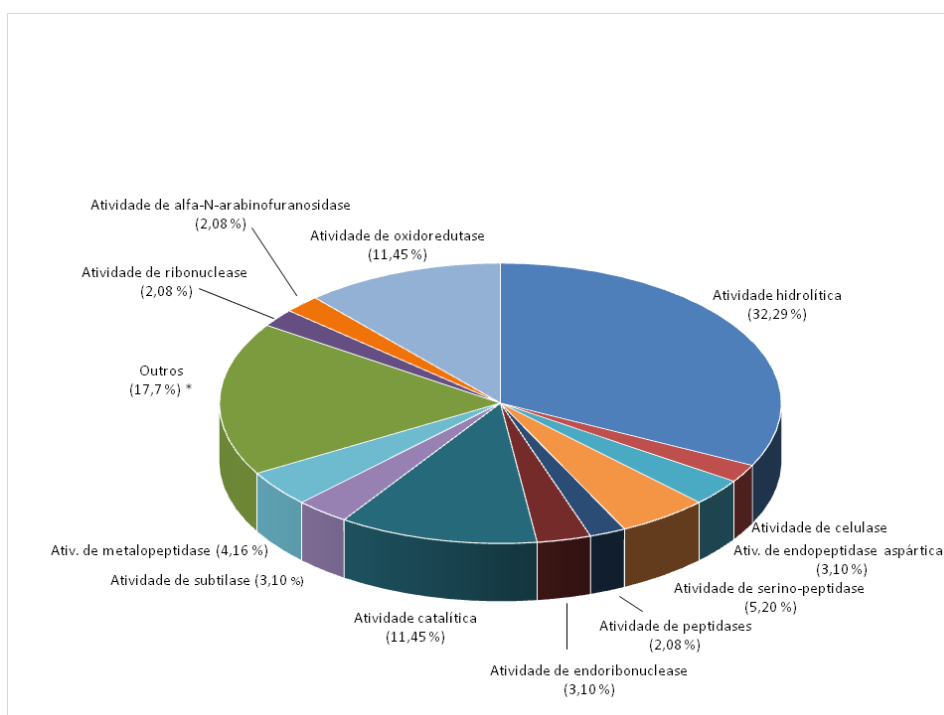


Figura 16. Função molecular das proteínas identificadas após 48 h no secretoma da interação isolado 303/02 de *T. harzianum* e feijoeiro comum (Condição Co-cultivo). * A lista completa com as proteínas incluídas neste grupo Outros encontra-se disponível nos anexos.

5. DISCUSSÃO

Microrganismos simbiotes colonizam a superfície das raízes das plantas hospedeiras, se enrolam sobre os pêlos radiculares e penetram a epiderme e o cortex causando uma infecção assintomática e em alguns casos podem promover o seu crescimento e/ou desencadear sua resposta de defesa quando infectado por um fitopatógeno (Harman, 2006). Os isolados modelos do presente trabalho apesar de colonizarem as raízes de feijoeiro não promovem crescimento da planta hospedeira nas primeiras 72 horas de interação em um sistema de hidroponia. Já foi descrito que a promoção de crescimento de plantas pela associação com *T. harzianum*, T-22, está na habilidade desses fungos de solubilizar muitos nutrientes importantes para a planta que está disponível no solo, facilitando assim a absorção dos nutrientes pela planta (Altomare *et al.*, 1999).

A expressão dos genes de defesa Chit, GLU e PAL foi aumentada em feijoeiro cultivado na presença dos isolados 468/02, *T. asperellum*, e 457/02, *T. harzianum* nas primeiras 24 de interação, embora estes isolados sejam de espécies diferentes, eles se mostraram parecidos na forma de induzir resposta de defesa mais precoce. Por outro lado o isolado 303/02 de *T. harzianum* relevou um perfil de expressão diferente, mostrando ser um indutor mais tardio de resposta de defesa, o aumento na expressão desses mesmos genes de defesa começou mais baixo e teve um maior aumento na expressão gênica com 72 horas de interação, ou seja, em um momento posterior quando comparado ao aumento das expressões desses mesmos genes em feijoeiro pelos outros dois isolados.

Já foi descrito na literatura que algumas espécies de *Trichoderma*, como *T. asperellum* e *T. harzianum*, quando em íntima associação com plantas hospedeiras (pepineiro, algodoeiro, tomateiro) podem desencadear a resposta de defesa e, desta forma, induzir resistência na planta hospedeira a subseqüentes infecções fúngicas pela ação de hidrolases produzidas por estes. (Djonovic *et al.*, 2007, Harman *et al.*, 2004, Shores, 2010 e Woo *et al.* 2006), o que corrobora os nossos resultados.

Para os três isolados foi observado um maior aumento na expressão do gene PER com 48 h de interação, não há uma explicação plausível do motivo desse aumento com

apenas 48 h. O isolado 468/02 é o melhor indutor da expressão de peroxidase uma vez que a expressão desse gene foi aumentada quase 50 vezes no feijoeiro quando na presença desse isolado (figura 10). Observou-se ainda, para os mesmos isolados, um aumento mais tardio na expressão do gene LOX, sua expressão foi aumentada com 72 h de interação entre os isolados de *Trichoderma* e o feijoeiro, resultados semelhantes foram encontrados por Contrelas-Cortejo *et al.* (2011) e Salas-Marina *et al.* (2011), cujos trabalhos mostraram que a aplicação de alguns espécies de *T. virens* e *T. atroviride* leva à expressão de genes como a LOX-1 lipoxigenase-1 e peroxidase, característica da resistência ISR. Yedidia e colaboradores (1999), também demonstraram anteriormente que fungos do gênero *Trichoderma* aumentam a expressão de outras proteínas e compostos de defesa em plantas hospedeiras, como as peroxidases, compostos fenólicos e substâncias que aumentam a resistência mecânica da célula hospedeira. Desta forma, podem inibir ou restringir a invasão de tecidos vegetais pelo patógeno.

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que os isolados 468/02, 475/2 e 303/02 modulam a expressão dos genes de defesa de planta, Chit, GLU, e PAL e, portanto podem induzem resistência em feijoeiro, sendo que o aumento da expressão observado foi maior do que o encontrado na literatura. Estes isolados não são eficientes para aumentar a expressão dos genes LOX, PER. A expressão desses genes de defesa sugere ainda que os isolados fúngicos são capazes de induzir a SAR uma vez que o acúmulo de quitinases, glicanases e compostos antimicrobianos como a PAL no local de infecção estão geralmente associado à obtenção de SAR contra uma gama de patógenos (Durrant & Dong, 2004).

Existe uma comunicação cruzada entre a planta e o fungo envolvendo elicitores liberados por *Trichoderma* após a colonização que são reconhecidos pela planta e estimula resposta de defesa (Woo *et al.*, 2006), esses elicitores sensibilizam os tecidos que passa a expressar resposta de defesa basal rápida e/ou mais forte contra um subsequente ataque de patógeno, fenômeno conhecido como priming (Conrath *et al.*, 2011).

Pesquisas com o objetivo de analisar o proteoma de espécies de *Trichoderma*, sobretudo *T. harzianum* e *T. atroviride*, que são usados como agente de biocontrole permitiu a identificação de muitas proteínas chaves envolvida na interação

Trichoderma-fitopatogeno ou *Trichoderma*-planta. Porém pouco se tem estudado das proteínas que são secretadas pelo fungo durante a interação com uma planta hospedeira e que possam estar envolvidas na indução da resposta de defesa e sua resistência a subseqüentes infecções.

Este trabalho tem como um dos principais objetivos contribuir para a identificação de proteínas secretadas durante a interação entre *T. harzianum*- Feijoeiro-comum. A técnica LC-MS/MS da Proteômica possibilitou a identificação de um número maior de proteínas quando comparado à trabalhos anteriores utilizando Eletroforese bidimensional e em seguida a Espectrometria de Massa. A maior quantidade de proteínas secretadas foi encontrada na condição Fungo quando as sequências foram alinhadas no bando de dados de *T. harzianum* (<http://genome.jgi.doe.gov/>). Não foram identificadas proteínas na condição Planta, mas foram encontradas 07 proteínas secretadas no co-cultivo, utilizando o banco de dados de *P. vulgaris*, ou seja, 7 proteínas de plantas. Infere-se que sozinha a planta não secreta proteínas detectáveis por esta abordagem e, que o fungo levou a planta a secretar, embora em baixa quantidade, algumas proteínas.

As Glicosil hidrolases representam 27% do total das proteínas identificadas no secretoma do isolado 303/02 de *T. harzianum*, condição fungo, este resultado corrobora os dados de Druzhnina *et. al.* (2004) que analisaram a composição e propriedades do secretoma predito para as espécies *T. reesei*, *T. virens* e *T. atroviride* nos quais as glicosil hidrolases representavam mais de 12% do total de proteínas secretadas. Dentre as GHs encontradas, destacam se as da família 5, na qual estão classificadas as quitosanases, endo- β -1,3-glicanases, β -1,3-glicanases; a família 17 (β -glicosidases), as famílias 18 e 19 com quitinases e a família 71 com uma α -1,3-glicanases.

Já foi demonstrado que β -1,3-glicanases e quitinases, assim como outras glicosil hidrolases e proteases são sintetizadas por espécies de *Trichoderma* em condições que simulam o micoparasitismo e sob estresse nutricional estas estariam envolvidas nas respostas deste fungo durante o processo de antagonismo e saprofitismo (Kubicek *et al.*, 2001). O comportamento saprófita de *Trichoderma spp.* é evidenciado pela grande conjunto de enzimas carboidrato-ativas (Kubicek *et. al.*, 2011).

Ainda com relação ao secretoma da condição Fungo, outro grupo predominante de enzimas identificadas foram as proteases que representaram 16,5 % das proteínas

identificadas, a maioria classificada como aspartato peptidases, serine peptidases ou subtilisinas. Destas, 2 peptidases A1, com atividade de aspartato peptidase, foram encontradas como exclusivas desta condição. Viterbo *et al.*, (2004) encontraram uma aspartato protease em *T. harzianum* e *T. asperellum* envolvida tanto no micoparasitismo como na simbiose *Trichoderma* – planta, melhorando sua capacidade de resistência. Posteriormente, mostrou-se que estas enzimas estão envolvidas também com a colonização das plantas hospedeiras por *Trichoderma* e na indução de metabólitos secundários antipatogênicos com a síntese de Proteínas-PR e fitoalexinas (Djonović *et al.*, 2006).

Dentre as proteínas identificadas tanto no secretoma do Fungo quanto no secretoma da interação Fungo/feijoeiro que merecem destaque citam-se uma serina-protease e uma aspartato-protease, pois ambas já foram identificadas em *T. harzianum* e *T. asperellum* e estão envolvidas no micoparasitismo e simbiose *Trichoderma*-planta, como indutoras da capacidade de defesa (Viterbo *et al.*, 2004), outros trabalhos mostraram que estas enzimas estão envolvidas, dentre outros, na colonização das plantas por *Trichoderma* e na indução de compostos metabólicos anti-patogênicos como a síntese de proteínas-PR e de fitoalexinas.

Na condição Fungo foi encontrada uma Citocromo P450, com atividade de monoxigenase, esta enzima também foi encontrada por Druzhinina *et al.* (2012) no secretoma *in silico* de *Trichoderma spp.* O citocromo P450, é uma super família de mono-oxigenases contendo heme, essas proteínas são encontradas em muitos organismos e desempenham um papel importante na inativação de materiais perigosos (Roelofs *et al.*, 2012). Druzhinina *et al.*, (2012) sugere que a detecção de monoxigenases do citocromo P450 no secretoma de *Trichoderma spp.* pode explicar a capacidade de algumas espécies desse gênero de crescer em habitats altamente contaminados, como por exemplo com resíduos de petróleo.

Foram encontradas ainda uma Alginato liase e uma Cupina com 25,7 kDa e 52,8 kDa respectivamente, sendo exclusivas da condição Fungo, estas enzimas já foram encontradas em trabalhos anteriores (Steindorff *et al.*, 2012). A alginato liase é produzida por diversos fungos, ela age despolimerizando o aparato molecular do alginato, um polissacarídeo presente na parede celular de uma grande variedade de organismos, como algas e fungos (Gupta *et al.*, 2011), foi encontrada ainda uma

proteína relacionada a defesa, a ‘*Barwin-related endoglucanase*’ entre outras sem anotação.

Como o isolado 303/02 de *T. harzianum* secretou um número maior de proteínas na ausência da planta hospedeira e não quando na sua presença propõe-se que a presença do feijoeiro pode alterar o seu padrão de produção de proteínas levando ao aumento da secreção de proteínas envolvidas na colonização da planta hospedeira e/ou indução de sua resposta de defesa.

A análise do secretoma da interação do isolado 303/02/ feijoeiro comum sugere que não há muita diferença entre as proteínas que são secretadas pelo fungo quando crescido na presença de uma planta hospedeira com as proteínas encontradas no transcrito de *T. harzianum* crescido na presença de parede celular do fungo fitopatogênico *Fusarium solani* (Steindorff *et al.*, 2012) ou ainda nas proteínas preditas encontradas a partir do genoma *in silico* (Druzhinina *et al.*, 2012). Poucas foram as proteínas de fungo exclusivas na condição co-cultivo, ou seja, que só foram produzidas pelo fungo devido a presença de uma planta hospedeira, sendo que a maioria são hidrolases ou proteases que podem estar envolvidas tanto no micoparasitismo como na indução de defesa.

Acredita-se que as proteínas hidrolíticas e as proteases envolvidas no micoparasitismo e na modulação da resposta de defesa são diferentes porque suas sequências são diferentes, isso pode ser justificadas pela falta de detalhes nas anotações do Banco de dados que é novo, várias sequências estão anotadas como glicosil hidrolase de alguma família, mas não especificam qual é a proteína específica daquela família. Por exemplo, uma GH da família 71 foi identificada como exclusiva de fungo e aumentada para esta condição com o número de acesso diferente e, ainda, uma GH da família 71 foi encontrada como estando diminuída na condição fungo e, conseqüentemente aumentada para co-cultivo, porém o número de acesso no banco de dados é diferente e a família GH 71 compreende uma α -1,3-glicanase, tem famílias que compreende mais de 5 enzimas diferentes, por exemplo a GH 5 (quitosanase, β -manosidase, endo- β -1,4-glicanase / celulase, β -1,3-glicosidase, endo- β -1,4-xilanase, entre outras), se o banco dá uma indicação mais geral, apenas GH família 5 assim fica difícil saber qual a enzima certa.

Das 135 proteínas que são comuns às condições Co-cultivo e Fungo, 28 % são glicosil hidrolases e mais de 13 % eram proteases com as atividades variando desde aspartato e serina protease até atividade de subtilisina, foram encontradas ainda algumas oxidoredutases, dentre outras proteínas sem anotações.

Comum as duas condições foi identificada uma Cerato-platanina, com 14,36 kDa, sabe-se que esta família de proteínas induz a expressão de fitoalexinas e / ou morte da célula vegetal em plantas hospedeiras. Seidl *et al.* (2006), identificou uma proteína da família Epl1, no secretoma de *T. atroviridis*, envolvido na indução de resposta de defesa, relatando que o transcrito de Epl1 pode ser detectado sob estresse osmótico e meio com deficiência de carbono e nitrogênio. Outros estudos mostraram esta proteína são importantes no micoparasitismo e indução de resistência.

O método de hidroponia é, portanto, eficiente para analisar e identificar proteínas secretadas, mas não é suficiente para mostrar as proteínas envolvidas na modulação de resposta de defesa, talvez fosse necessário analisar o proteoma da interação para entender melhor este mecanismo, quais as proteínas que estão envolvidas na interação *Trichoderma*/planta hospedeira envolvidas na resposta de defesa da planta.

O arsenal de proteínas secretadas pelo isolado 303/02 parece estar envolvido com as funções de biocontrole desse agente tanto voltado para a indução de resistência como no processo de micoparasitismo e colonização da raiz do hospedeiro. Djonóvic *et al.*, (2006) mostra que elicitores envolvidos na indução de resistência em plantas incluem metabolitos secundários percebidos pelas hifas de *Trichoderma*, proteínas com atividade enzimática bem como componentes da parede celular da planta e do *Trichoderma*.

A maioria das proteínas secretadas foram glicosil hidrolase de várias famílias e várias classes de proteases, o que sugerem que uma das maneiras que este isolado está induzindo resposta de defesa e resistência em planta seja pela ação de hidrolases produzidas pelo fungo quando na presença da planta, corroborando assim com Djonovic *et al.*, (2006), Shores (2010) e Salas-Marina *et al.*, (2011).

6. CONCLUSÃO

- O sistema de hidroponia mostrou-se adequado para a análise da interação entre *Trichoderma spp* e feijoeiro comum, comprovado por microscopia eletrônica de varredura.
- Os isolados 468/02 de *Trichoderma asperellum*, 457/02 e 303/02 de *Trichoderma harzianum* aumentaram a expressão de genes de defesa em feijoeiro e, portanto, são potenciais moduladores de resposta de defesa da planta hospedeira;
- Dos isolados utilizados como modelo no presente trabalho, o *T. harzianum* 303/02 levou ao maior incremento na taxa de expressão dos genes Chit1, GLU e PAL, sendo, portanto escolhido para análise do secretoma.
- Houve diferença no secretado do isolado 303/02 de *T. harzianum* quando crescido na preseça do feijoeiro, com identificação utilizando banco de dados atuais com anotações ainda pouco descritas, permitindo apenas a descrição das famílias envolvidas nessa interação.
- A maioria das proteínas identificadas no secretoma do fungo (Condição co-cultivo) faz parte de alguma família de glicosil hidrolases ou proteases. Essas proteínas podem atuar degradando componentes da parede celular de um patógeno, micoparasitismo, e/ou agindo como efetoras de defesa e resistência do feijoeiro.
- O isolado 303/02 mostrou-se um promissor modulador da resposta de defesa da planta hospedeira uma vez que a maioria das proteínas identificadas tanto no secretoma do fungo quanto no secretoma da interação estão envolvidas na indução de defesa.

7. PERSPECTIVAS

- Análise detalhada das proteínas secretadas com abundância diferencial em banco de dados mais anotados.
- Validação por um método ortogonal das proteínas encontradas no secretoma do fungo que apresentaram abundância diferencial
- Análise do proteoma da interação de feijoeiro comum com isolados de *Trichoderma* na presença e ausência de um fungo fitopatogênico para identificação das proteínas envolvidas no mecanismo de defesa do feijoeiro comum.
- Escolha da espécie de *Trichoderma* isolado de solo do Cerrado com melhor capacidade de modular a resposta de defesa do feijoeiro comum para aplicação agrícola.
- Detecção e isolamento de proteínas do *Trichoderma spp.* potencialmente indutoras de defesa e resistência em feijoeiro comum, com aplicação biotecnológica.

8. ANEXO

8.2. Tabelas complementares

Tabela 7. Função Molecular e processo biológico das proteínas identificadas no secretoma do isolado 303/ 02 de *Trichoderma harzianum* na presença e ausência de feijoeiro comum

Accession number	Name protein (NCBI) or Domain	Molecular Function	Biological Process	Parameters of expression
71962	Glycosyl hydrolase, clan GH-D	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	C
362876	Glycoside hydrolase, family 2	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	C
112585	Glycoside hydrolase, family 12	cellulase activity	polysaccharide catabolic process	C
88799	Glycoside hydrolase, family 28	polygalacturonase activity	carbohydrate metabolic process	C
222278	Glycoside hydrolase, family 35	beta-galactosidase activity	carbohydrate metabolic process	C
508873	Glycosyl hydrolase 92	No annotation	No annotation	C
507934	Amidohydrolase 3	hydrolase activity	No annotation	C
145824	Peptidase A1	aspartic-type endopeptidase activity	No annotation	C
506924	Peptidase S51	serine-type peptidase activity	No annotation	C
1889	Protease-associated PA	peptidase activity	proteolysis	C
104414	Ribonuclease T2	endoribonuclease activity	No annotation	C
92277	bZIP transcription factor, b ZIP-1	No annotation	No annotation	C
383927	K Homology, type 1	RNA binding	No annotation	C
496346	FMN-dependent alpha-hydroxy acid dehydrogenase	FMN binding	electron transport	C
88968	Cellulose-binding region, fungal	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	C
491972	Beta-Ig-H3/fasciclin	No annotation	No annotation	C
511404	Extracellular membrane protein, 8-cysteine region	No annotation	No annotation	C
95636	FAD linked oxidase	catalytic activity	oxidoreductase activity	C
74943	Predicted protein	No annotation	No annotation	C
9834	Uncharacterised conserved protein UCP028846	catalytic activity	No annotation	C

3216	No annotation	No annotation	No annotation	C
499734	No annotation	No annotation	No annotation	C
513561	No annotation	No annotation	No annotation	C
86322	Glycoside Hydrolase	No annotation	No annotation	F
99043	Glycoside hydrolase, superfamily	No annotation	No annotation	F
94444	Glycoside hydrolase, clan GH-D	hidrolase activity	carbohydrate metabolic process	F
499264	Glycoside hydrolase, catalytic core	No annotation	No annotation	F
148225	Glycoside hydrolase, Chitinase active site	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	F
127782	Glycoside Hydrolase Family 3 protein	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	F
14278	Glycoside Hydrolase Family 5 protein	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	F
441083	Glycoside Hydrolase Family 5 protein	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	F
524327	Glycoside hydrolase, family 25	lysozyme activity	peptidoglycan catabolic process	F
129594	Glycoside Hydrolase Family 55 protein	No annotation	No annotation	F
152795	Glycoside hidrolase family 71 protein	No annotation	No annotation	F
96795	Glycosil hydrolase family 93 protein	No annotation	No annotation	F
103277	Peptidase A1	aspartic-type endopeptidase activity	proteolysis	F
86893	Peptidase A1	aspartic-type endopeptidase activity	No annotation	F
210061	Peptidase A1	aspartic-type endopeptidase activity	No annotation	F
485406	Peptidase A1	aspartic-type endopeptidase activity	No annotation	F
493562	Peptidase A1	aspartic-type endopeptidase activity	proteolysis	F
91534	Peptidase G1	aspartic-type endopeptidase activity	proteolysis	F
98848	Peptidase G1	aspartic-type endopeptidase activity	proteolysis	F
479338	Peptidase S8 and S53	subtilase activity	proteolysis	F
99104	Protease S8 tripeptidyl peptidase	subtilase activity	proteolysis	F
133093	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin	serine-type endopeptidase activity	proteolysis	F
154554	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin	subtilase activity	No annotation	F
510269	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin	erine-type peptidase activity	proteolysis	F
514427	Peptidase S60	ferric iron binding	iron ion transport	F
98670	Tripeptidyl peptidase a	serine-type endopeptidase activity	proteolysis	F
41132	Guanine-specific ribonuclease N1 and T1	RNA binding	No annotation	F

619	polysaccharide lyase family 7 protein	No annotation	No annotation	F
551452	Alginate Lyase 2	No annotation	No annotation	F
81377	Cutinase	catalytic activity	metabolic process	F
98691	Fungal chitosanase	No annotation	No annotation	F
497285	Phosphoesterase	hidrolase activity	No annotation	F
7497	Cellulose-binding region, fungal	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	F
500888	Cellulose-binding region, fungal	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	F
511848	Cytochrome P450	monooxygenase activity	electron transport	F
507747	Cytochrome b5	transition metal ion binding	No annotation	F
509274	ATPase, F1/V1/A1 complex	hydrogen ion transmembrane transporter activity	No annotation	F
510668	ATPase, F1/V1/A1 complex	nucleotide binding/hydrogen-exporting ATPase activity	ATP biosynthetic process	F
503899	Mitochondrial carrier protein	transporter activity	transport	F
143083	PROKAR-LIPOPOTEIN	No annotation	No annotation	F
127315	PROKAR-LIPOPOTEIN	No annotation	No annotation	F
553057, 494360 and 59504	Ubiquitin	structural constituent of ribosome	protein modification process/translation	F
487539	Cupin 1	nutrient reservoir activity	No annotation	F
150179	Glycolipid anchored surface protein GAS1	No annotation	No annotation	F
84435	Barwin-related endoglucanase	No annotation	No annotation	F
270898	Hypothetical protein CCM_03743	No annotation	No annotation	F
36398	No annotation	No annotation	No annotation	F
485526	No annotation	No annotation	No annotation	F
493163	No annotation	No annotation	No annotation	F
493539	No annotation	No annotation	No annotation	F
494876	No annotation	No annotation	No annotation	F
514178	No annotation	No annotation	No annotation	F
15655	Glycoside hydrolase	No annotation	No annotation	F and C
21292	Glycoside hydrolase, catalytic core	No annotation	No annotation	F and C
72349	Glycoside hydrolase, catalytic core	No annotation	No annotation	F and C
498572	Glycoside hydrolase, catalytic core	No annotation	No annotation	F and C
509593	Glycoside hydrolase, catalytic core	No annotation	No annotation	F and C

93168	Glycoside hydrolase, clan GH-D	hidrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
509041	Glycoside hydrolase, clan GH-D	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
16405	Glycoside Hydrolase, Family 2	hidrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
502570	Glycoside hydrolase, family 2	hidrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
99736	Glycoside hydrolase, family 3	hidrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
502198	Glycoside hydrolase, family 3, N-terminal	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
504610	Glycoside hydrolase, family 3, N-terminal	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
71613	Glycoside hydrolase - family 3, N-terminal	hidrolase activity	proteolysis	F and C
119344	Glycoside hydrolase, family 5	hidrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
93404	Glycoside hydrolase, family 5	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
99972	Glycoside hydrolase, family 5	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
508689	Glycosil hydrolase, family 6	hidrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
91773	Glycoside hydrolase family 10	hidrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
115099	Glycoside hydrolase, family 11	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
91916	Glycoside hydrolase family 12	cellulase activity	polysaccharide catabolic process	F and C
81392	Glycosil hydrolase family 15	catalytic activity	polysaccharide catabolic process	F and C
150678	Glycoside hydrolase, family 16	hidrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
49445	Glycoside hydrolase, family 17	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
9664	Glycoside hydrolase, family 18	hidrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
101028	Glycoside hydrolase, family 18	hidrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
487349	Glycoside hydrolase, family 18	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
505895	Glycoside hydrolase, family 18	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
484147	Glycoside hydrolase, family 20	beta-N-acetylhexosaminidase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
513145	Glycoside hydrolase, family 30	glucosylceramidase activity	sphingolipid metabolic process	F and C
96491	Glycoside Hydrolase - family 31	hidrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
494994	Glycoside hydrolase, family 43	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
487999	Glycoside hydrolase, family 47	mannosidase activity	No annotation	F and C
513600	Glycoside hydrolase, family 62	No annotation	No annotation	F and C
120660	Glicoside hydrolase, family 71	hidrolase activity	No annotation	F and C
525334	Glicoside hydrolase, family 71	No annotation	No annotation	F and C

155668	Glycoside hydrolase, family 71	No annotation	No annotation	F and C
497624	Glycoside hydrolase, family 71	No annotation	No annotation	F and C
479664	Glycoside hydrolase, family 81	No annotation	No annotation	F and C
506888	Glycosyl hydrolase 92	No annotation	No annotation	F and C
84143	Glycosyl hydrolase 92	No annotation	No annotation	F and C
496107	Alpha/beta hydrolase fold-1	hydrolase activity	No annotation	F and C
155725	Peptidase A1	aspartic-type endopeptidase activity	proteolysis	F and C
74616	Peptidase A1	aspartic-type endopeptidase activity	proteolysis	F and C
526221	Peptidase S1 and S6	catalytic activity	proteolysis	F and C
506423	Peptidase S1 and S6, chymotrypsin/Hap	serine-type endopeptidase activity	proteolysis	F and C
97128	Peptidase S28	serine-type peptidase activity	proteolysis	F and C
149523	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin	serine-type endopeptidase activity	proteolysis	F and C
477752	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin	serine-type endopeptidase activity	proteolysis	F and C
110777	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin	subtilase activity	proteolysis	F and C
487795	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin	subtilase activity	proteolysis	F and C
511032	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin	subtilase activity	proteolysis	F and C
92805	Peptidase M, neutral zinc metallopeptidases	metallopeptidase activity	proteolysis	F and C
502174	Peptidase M, neutral zinc metallopeptidases	metallopeptidase activity	proteolysis	F and C
514267	Peptidase M14, carboxypeptidase A	carboxypeptidase A activity	proteolysis	F and C
494007	Peptidase M14, carboxypeptidase A	carboxypeptidase activity	proteolysis	F and C
500705	Peptidase M20	metallopeptidase activity	proteolysis	F and C
501003	Peptidase M28	peptidase activity	proteolysis	F and C
507454	Peptidase M35, deuterolysin	metalloendopeptidase activity	proteolysis	F and C
511763	Peptidase M36, fungalysin	metallopeptidase activity	proteolysis	F and C
523270	Gamma-glutamyltranspeptidase	gamma-glutamyltransferase activity	No annotation	F and C
153694	Ribonuclease T2	endoribonuclease activity	No annotation	F and C
520729	Ribonuclease/ribotoxin	endoribonuclease activity	No annotation	F and C
81381	Ribonuclease t1	ribonuclease activity	No annotation	F and C
556268	Guanine-specific ribonuclease N1 and T1	ribonuclease activity	No annotation	F and C
366985	Serine proteinase **	No annotation	No annotation	F and C

482068	Proteinase inhibitor I7, squash	endopeptidase inhibitor activity	cell redox homeostasis	F and C
112874	Pectin lyase fold/virulence factor	No annotation	No annotation	F and C
294827	Pectin lyase fold/virulence factor	No annotation	No annotation	F and C
523201	Pectin lyase fold/virulence factor	No annotation	No annotation	F and C
99422	Ferrulic acid esterase **	No annotation	No annotation	F and C
133058	Phosphoesterase	catalytic activity	metabolic process	F and C
506417	Carboxylesterase, type B	No annotation	No annotation	F and C
513492	Alpha-L-arabinofuranosidase B	alpha-N-arabinofuranosidase activity	L-arabinose metabolic process	F and C
503269	Alpha-L-arabinofuranosidase B	alpha-N-arabinofuranosidase activity	L-arabinose metabolic process	F and C
98222	Glucose-methanol-choline oxidoreductase, N-terminal	oxidoreductase activity	alcohol metabolic process	F and C
508260	Acetohydroxy acid isomeroreductase C-terminal	ketol-acid reductoisomerase activity	metabolic process	F and C
510302	FAD dependent oxidoreductase	oxidoreductase activity	proteolysis	F and C
501007	Catalase-peroxidase 2 **	catalase activity	response to oxidative stress	F and C
523580	Catalase-peroxidase	No annotation	No annotation	F and C
510303	Amine oxidase	oxidoreductase activity	proteolysis	F and C
145790	FAD linked oxidase, N-terminal	oxidoreductase activity	No annotation	F and C
526009	FAD linked oxidase, N-terminal	oxidoreductase activity	No annotation	F and C
17170	FAD linked oxidase, N-terminal	oxidoreductase activity	No annotation	F and C
17842	FAD linked oxidase, N-terminal	oxidoreductase activity	No annotation	F and C
526112	FAD linked oxidase, N-terminal	oxidoreductase activity	No annotation	F and C
496217	FAD linked oxidase, N-terminal	oxidoreductase activity	No annotation	F and C
507229	FAD linked oxidase, N-terminal	oxidoreductase activity	proteolysis	F and C
507873	FAD/NAD(P)-binding domain	No annotation	No annotation	F and C
92302	Superoxide dismutase, copper/zinc binding	metal ion binding	superoxide metabolic process	F and C
2738	beta--endoglucanase **	No annotation	No annotation	F and C
506446	Carbohydrate-binding WSC	No annotation	No annotation	F and C
477855	Carbohydrate-binding WSC	No annotation	No annotation	F and C
142270	Beta-lactamase	Beta -lactamase activity	beta-lactam antibiotic catabolic process	F and C
4655	Lipase, active site	catalytic activity	No annotation	F and C
526309	secretory lipase	No annotation	No annotation	F and C

84515	Six-hairpin glycosidase-like	catalytic activity	No annotation	F and C
118590	Six-hairpin glycosidase-like	catalytic activity	No annotation	F and C
939	Lytic transglycosylase-like	catalytic activity	carbohydrate metabolic process	F and C
489901	Alpha-1,2-mannosidase, putative	No annotation	No annotation	F and C
492278	ATPase, F0 complex, subunit A	hydrolase activity	No annotation	F and C
481512	Neutral/alkaline nonlysosomal ceramidase	No annotation	No annotation	F and C
503028	Putative isomerase YbhE	No annotation	No annotation	F and C
123184	Glycolipid anchored surface protein GAS1	No annotation	No annotation	F and C
510362	Peptidoglycan-binding LysM	No annotation	cell wall macromolecule catabolic process	F and C
511791	Amidase signature enzyme	No annotation	No annotation	F and C
93015	Cellulose-binding region, fungal	hidrolase activity	carbohydrate metabolic process	F and C
73177	Aminoacyl-tRNA synthetase, class I	aminoacyl-tRNA ligase activity	No annotation	F and C
86843	Tyrosinase	oxidoreductase activity	metabolic process	F and C
82004	Soluble quinoprotein glucose dehydrogenase	catalytic activity	No annotation	F and C
87202	Rare lipoprotein A	No annotation	No annotation	F and C
100314	Fasciclin domain	No annotation	No annotation	F and C
132526	MD-2-Related lipid-recognition	No annotation	No annotation	F and C
97878	Actin-binding FH2	No annotation	No annotation	F and C
273717	Invasin/intimin cell-adhesion	No annotation	No annotation	F and C
96469	Small secreted protein	No annotation	No annotation	F and C
78961	Cupredoxin	No annotation	No annotation	F and C
81319	Conidiospore surface protein	No annotation	No annotation	F and C
1760	EC86 protein	No annotation	No annotation	F and C
530250	Blue (type 1) copper domain	copper ion biding	No annotation	F and C
497470	Periplasmic binding protein-like II	No annotation	No annotation	F and C
508110	Cerato-platanin	No annotation	No annotation	F and C
486629	N/apple PAN	No annotation	No annotation	F and C
513288	NHL repeat	No annotation	No annotation	F and C
239112	Protein of unknown function DUF 1486	No annotation	No annotation	F and C
118476	Hypothetical protein GLRG_10823	No annotation	No annotation	F and C

518220	Hypothetical protein TRIVIDRAFT_30	No annotation	No annotation	F and C
90982	Hypothetical protein TRIVIDRAFT_15	No annotation	No annotation	F and C
78103	Hypothetical protein TRIVIDRAFT_63	No annotation	No annotation	F and C
480133	No annotation	No annotation	No annotation	F and C
506734	No annotation	No annotation	No annotation	F and C
506744	No annotation	No annotation	No annotation	F and C
507042	No annotation	No annotation	No annotation	F and C
510457	No annotation	No annotation	No annotation	F and C
511312	No annotation	No annotation	No annotation	F and C
514104	No annotation	No annotation	No annotation	F and C

Nos parâmetros de expressão C significa co-cultivo e F fungo, representando as condições de cultivo das quais foram identificadas as proteínas.

Tabela 8. Função molecular e processo biológico das proteínas analisadas pelo método Label free.

Accession number	protein domain	Molecular Function	Biological Process	Max Fold Change	t-test p-value	Parameters of expression
508689	Glycoside hydrolase, family 6	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	3,52	0,01	↑ F
81392	Glycosil hydrolase, family 15	catalytic activity	polysaccharide catabolic process	2,87	0,00	↑ F
505895	Glycoside hydrolase, family 18	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	3,08	0,00	↑ F
101028	Glycoside hydrolase, family 18	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	6,92	0,03	↑ F
120660	Glycoside hydrolase, family 71	hydrolase activity	no annotation	6,60	0,00	↑ F
511032	Peptidase S8 and S53, subtilisin	subtilase activity	proteolysis	6,89	0,03	↑ F
494007	Peptidase M14, carboxypeptidase A	carboxypeptidase activity	proteolysis	5,54	0,05	↑ F
482068	Proteinase inhibitor I7, squash	serine-type endopeptidase inhibitor activity	cell redox homeostasis	4,96	0,04	↑ F
294827	Pectin lyase fold/virulence factor	no annotation	no annotation	5,73	0,00	↑ F
17170	FAD linked oxidase, N-terminal	oxidoreductase activity	no annotation	1,02	0,02	↑ F
526112	FAD linked oxidase, N-terminal	oxidoreductase activity	no annotation	1,79	0,01	↑ F
84143	Alpha-1,2-mannosidase, putative	no annotation	no annotation	2,62	0,01	↑ F

477855	Carbohydrate-binding WSC	no annotation	no annotation	2,99	0,04	↑ F
273717	Invasin/intimin cell-adhesion	no annotation	no annotation	2,96	0,00	↑ F
507042	No annotation	no annotation	no annotation	6,99	0,02	↑ F
71613	Glycoside hydrolase, family 3, N-terminal	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	-2,75	0,00	↓ F
150678	Glycoside hydrolase, family 16	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	-7,50	0,02	↓ F
487999	Glycoside hydrolase, family 47	1,2-alpha-mannosidase activity	no annotation	-6,09	0,02	↓ F
525334	Glycoside hydrolase, family 71	no annotation	no annotation	-3,91	0,01	↓ F
153694	Ribonuclease T2	endoribonuclease activity	no annotation	-2,17	0,04	↓ F
523201	Pectin lyase fold/virulence factor	no annotation	no annotation	-7,12	0,01	↓ F
503028	Putative isomerase YbhE	no annotation	no annotation	-2,93	0,04	↓ F
1760	EC86 protein	no annotation	no annotation	-4,47	0,05	↓ F
510457	No annotation	no annotation	no annotation	-5,38	0,02	↓ F
71962	Glycoside hydrolase, clan GH-D	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process			C
88799	Glycoside hydrolase, family 28	polygalacturonase activity	carbohydrate metabolic process			C
507934	Metal-dependent hydrolase, composite	hydrolase activity	no annotation			C
506924	Peptidase S51, dipeptidase E	serine-type peptidase activity	proteolysis			C
104414	Ribonuclease T2	endoribonuclease activity	no annotation			C
95636	FAD linked oxidase, N-terminal	oxidoreductase activity	no annotation			C
511404	Extracellular membrane protein, 8-cysteine region	no annotation	no annotation			C
94444	Glycoside hydrolase, clan GH-D	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process			F
99043	Glycoside hydrolase, catalytic core	no annotation	no annotation			F
127782	Glycoside hydrolase, family 3, N-terminal	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process			F
14278	Glycoside hydrolase, family 5	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process			F
7497	Glycoside hydrolase, family 7	no annotation	no annotation			F
148225	Glycoside hydrolase, family 18	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process			F
500888	Glycoside hydrolase, family 18	hydrolase activity	carbohydrate metabolic process			F
152795	Glycoside hydrolase, family 71	no annotation	no annotation			F
493562	Peptidase A1	aspartic-type endopeptidase activity	proteolysis			F

210061	Peptidase A1	aspartic-type endopeptidase activity	proteolysis	F
619	polysaccharide lyase family 7 **	no annotation	no annotation	F
551452	Alginate lyase 2	no annotation	no annotation	F
41132	Guanine-specific ribonuclease N1 and T1	endoribonuclease activity	no annotation	F
84435	Barwin-related endoglucanase	no annotation	no annotation	F
497285	Phosphoesterase	hydrolase activity, acting on ester bonds	no annotation	F
487539	Cupin 1	nutrient reservoir activity	no annotation	F
129594	Carbohydrate-binding WSC	no annotation	no annotation	F
150179	Glycolipid anchored surface protein GAS1	no annotation	no annotation	F
86322	Lysozyme-like	no annotation	no annotation	F
127315	PROKAR_LIPOPROTEIN	no annotation	no annotation	F
36398	GPI anchored**	no annotation	no annotation	F
270898	Hypothetical protein CCM_03743**	no annotation	no annotation	F

Nos parâmetros de expressão ↑F significa presença aumentada no secretoma da condição de Fungo e ↓C diminuição da presença da proteína no secretoma da condição de Fungo; F proteínas exclusivas de fungo e C e exclusiva do co-cultivo.

8.2. Participação em Eventos Científicos



5th
BrMASS
Conference
Brazilian Society for
Mass Spectrometry
2013



Certificado

5º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas - BrMASS
07 a 11 de Dezembro de 2013 - Campinas SP - Brasil

Certificamos que **Francilene Lopes da Silva** participou do 5º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas, realizado em Campinas, de 07 a 11 de Dezembro de 2013, na categoria de Congressista.


Prof. Dr. José Manuel Riveros
Presidente BrMass


Prof. Dr. Marcos N. Eberlin
Vice-presidente BrMass


Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa
Diretor Educacional

SIMB 2013

II International
Symposium on
Microbiology and
Biotechnology

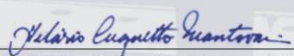
CERTIFICATE

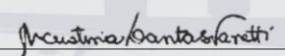
This is to certify that the abstract entitled
**Secretome Analysis Of The Interaction Between Phaseolus Vulgaris And
Trichoderma Spp. From Brazilian Cerrado Soil**

authored by:

**SILVA , F. L. , SANTOS,T. B. M. , AQUINO , E. N. , CUNHA
D. C.,STEINDORFF , A. S. , JUNQUEIRA , M. , DOMONT , G. B.,ULHOA
C. J. , NORONHA , E. F.**

has been presented as poster during the II International Symposium
on Microbiology and Biotechnology, which was held frm 4-7 December
2013, in Viçosa, Minas Gerais, Brazil.


Hilário Cuquetto Mantonavi
SIMB2013 President


Maria Cristina Dantas Vanetti
SIMB2013 Vice President

Organizers

Pós-Graduação • UFV
MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA



Support



Sponsors



SIMB 2013

II International
Symposium on
Microbiology and
Biotechnology

CERTIFICATE

This is to certify that

Francilene Lopes da Silva

participated in the II International Symposium on Microbiology and
Biotechnology, which was held from 4 - 7 December 2013, in Viçosa, Minas
Gerais, Brazil.

Hilário Cuquetto Mantonavi
Hilário Cuquetto Mantonavi
SIMB2013 President

Maria Cristina Dantas Vanetti
Maria Cristina Dantas Vanetti
SIMB2013 Vice President

Organizers

Pós-Graduação • UFV
MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA



Support



Sponsors



9. REFÊRENCIAS

- ADAMS, P. B. & AYERS, W. A. (1979) Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 896–899.
- AGRIOS, G.N. (2005) *Plant pathology*. 5. Ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 922p.
- AGROFIT (2010). *Agrofit: Sistema de agrotóxicos fitossanitários*.
- ALFANO, G.; LEWIS IVEY, M.; CAKIR, C.; BOS, J.; MILLER, S.; MADDEN, L.; KAMOUN, S.; & HOITINK, H. (2007). Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathology*, Vol. 97, No. 4, (November 2006), pp. 429–437.
- ALTOMARE, C. (1999) Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n.7, p.2926-2933.
- BAILEY, J. A. (1974) The relationship between symptom expression and phytoalexin concentration in hypocotyls of *Phaseolus vulgaris* infected with *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v.4, p. 477-488.
- BENÍTEZ, T.; RINCON, A. M.; LIMON, M. C.; CODON, A. C. (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol* 7:249-260.
- BOLWELL, G. P. (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. *Current Opinion in Plant Biology*, Danvers, v. 2, p. 287-294.
- BOLWELL, G. P.; BINDSCEDLER, L. V.; BLEE, K. A.; BUT, V. S.; DAVIES, D. R.; GARDNER, S. L.; GERRISH, C.; MINIBAYEVA, F. (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 53, p. 1367-1376.

BROUGHTON, W. J.; HERNANDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. (2003) Beans (*Phaseolus spp.*): model food legumes. *Plant soil* 252: 55-128.

CARDADOR-MARTÍNEZ A.; LOARCA-PIÑANG.; OOMAHNB. D. (2002a) Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus Vulgaris* L.). *J.Agric. Food Chem.*, 50:6975-6980.

CARDADOR-MARTÍNEZ A.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; LOARCA-PIÑA, G. (2002b) Antimutagenic activity of natural phenolic compounds in the common bean (*Phaseolus Vulgaris*) against aflatoxin B1. *Food Addit. Contam.*, 9: 62-69. *Food biotechnology*.

CHRISTENSEN, A. B.; CHO, B. H.; NAESBY, M.; GREGERSEN, P. L.; BRANDT, J.; MADRIZ-ORDEÑA, K.; COLLINGE, D. B.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. (2002) The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology*, London, v. 3, n. 3, p. 135-144.

CLUZET, S.; TORREGROSA, C.; JACQUET, C.; LAFITTE, C.; FOURNIER, J.; MERCIER, L.; SALAMAGNE, S.; BRIAND, X.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T.; DUMAS, B. (2004) Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. *Plant, Cell and Environment*, v. 27, n. 7, p. 917–928.

COLL, N. S.; EPPLE, P.; DANGL, J. L. (2011) Programmed cell death in plant immune system. *Cell Death differentiation*, p. 1-10.

CONRATH, U. (2011) Molecular aspects of defence priming. *Trends Plant Sci.* 16, 524–531

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2012). Acompanhamento de safra brasileira: grãos, oitavo levantamento, maio 2012. Brasília.

CONTRERAS-CORNEJO, H.A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; BELTRÁN-PEÑA, E.; HERRERA-ESTRELLA, A.; LÓPEZ-BUCIO, J. (2011) Trichoderma-induced plant immunity likely involves both hormonal- and camalexin-independent mechanisms in

Arabidopsis thaliana and confers resistance against necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Signal. Behav.* 6, 1554–1563.

DE WIT, P. J. G. (2007) How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.64, p.2726-2732.

DJONOVIC, S.; VITONNE, G.; HERRERA, A. M.; KENERLEY, C. M. (2007) Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma virens* transformants constitutively coexpressing β -1,3-glucanase and β -1,6-glucanase genes. *Molecular Plant Pathology*. V. 8, p. 468-480.

DJONOVIC, S.; POZO, M. J.; HOWELL, C. R.; KENERLEY, C. M. (2006a) Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 19, 838–853.

DOODS, P. N. & RATHJEN, J. P. (2010) Plant Immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, v. 11, p. 539-548.

DURRANT, W. E. & DONG, X. (2004) Systemic acquired resistance. *Ann. Rev. Phytopathology*. 42: 185-209.

DRUZHININA, I. & KUBICEK, C. P. (2005) Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *Journal of Zhejiang University Science* v. 6 (2), p. 100-112.

DRUZHININA, I.; SHELEST, E.; KUBICEK, C. P. (2012) Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. *FEMS, Microbiology Letters*, 337: 1-9.

EILEMBERG, J. (2006) Concepts and visions of biological control En: EILEMBERG, J., HMT. *An Ecological and Societal Approach to Biological Control*. Springer.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA (2010). *Doenças do feijoeiro*. Brasília, DF.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA *Arroz e Feijão* (2005). *Sistemas de produção – Cultivo do feijoeiro comum*. Brasília, DF

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO (2012) FAO in action: Towards the eradication of hunger.

FARMER, E. E. & RYAN, C. A. (1990) Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 7713-7716.

FERRARI, S.; VAIRO, D.; AUSUBEL, F. M.; CERVONE, F.; DE LORENZO, G. (2003) Tandemly duplicated arabidopsis genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. *The Plant Cell*, 15: 93-106.

FERNANDES, C. F.; MORAES, V. C. P.; VASCONCELOS, I. M.; SILVEIRA, J. A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. (2006) Induction of an anionic peroxidase in cowpea leaves by exogenous salicylic acid. *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, v. 163, p. 1040-1048.

FEUSSNER, I. E & WASTERNAK, C. (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biology*, 53, 275-295.

FINKEL, T. (2000) Redox-dependent signal transduction. *FEBS Letters*, v. 476, p. 52-54.

FOSTER, R. (1950) Inativação do vírus do mosaico comum do fumo pelo filtrado de culturas de *Trichoderma sp.* Vol. 10, p. 138-148.

FREITAS, R. S.; STEINDORFF, A. S.; RAMADA, M. H. S.; SIQUEIRA, S. J. L.; NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. (2013) Cloning and characterization of a protein elicitor Sm1 from *Trichoderma harzianum*. Springer.

FLORS, V.; TON, J.; JAKAB, G.; MAUCH-MANI, B. (2005) Abscisic acid and callose: team players in defense against pathogens? *Journal of Phytopathology*, Berlin, v. 155, p. 377-383.

GONZÁLEZ DE MEJÍA E.; CASTAÑO-TOSTADO E.; LOARCA-PIÑA, G. (1999) Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Mutat. Res. Genetic Toxicol. Environ. Mut.*, 44: 1-9.

GUO, X.; CASTILLO-RAMIREZ, S.; GONZALEZ, P. B.; FERNANDEZ-VAQUEZ, J. L.; SANTAMARIA, J. A.; CEVALLOS, M. A.; DAVILA, G. (2007) Rapid

evolutionary change of common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) plastome, and the genomic diversification of legume chloroplasts. BMC, 8: 228.

GUPTA, V.; JHA, B.; KUMARI, P.; KUMAR, M.; REDDY, C. R. K.; PRASAD, K.; SINGH, R. P. (2011) Purification and partial characterization of an extracellular alginate lyase from *Aspergillus oryzae* isolated from brown seaweed. J. Appl Phycol. v. 23. p.755-762.

GUZMÁN-MALDONADO, S. H.; PAREDE-LÓPEZ, O. (1998) Functional products of plants indigenous to Latin America: amaranth, quinoa, common beans and botanicals. In: MAZZA, G. (Ed.). Functional foods: biochemical and processing aspects. New York: Chapman and Hall, p. 293-328.

HALL, R.; NASSER, L. C. B. (1996) Practice and precept in cultural management of bean diseases. Canadian Journal of Plant Pathology, 18:176-185.

HAMMERSCHMIDT, R. & KUC, J. (1982) Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. Physiological Plant Pathology, v. 20, p. 73-82.

HAMMERSCHMIDT, R. (2007) Definitions and Some History, in: Induced Resistance for Plant Defence: a Sustainable Approach to Crop Protection. D. Walters, A. Newton, and Gary Lyon (eds). Blackwell Publishers.

HAMMOND-KOSACK, K. E. & JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W., JONES, R. (Ed.) (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Rockville, Maryland, American Society of Plant Physiologists. Cap. 21, p. 1102-1157.

HARMAN, G. E. (2000) Myths and dogmas of biocontrol – changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease, v. 84, p. 377-392.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. (2004) *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat. Rev. Microbiol. 2: 43-56.

HARMAN, G. E. (2006) Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. phytopathology. 190-194.

- HEIMLER D.; VIGNOLINI, P.; DINI, M. G.; ROMANI, A. (2005) Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. J. Agric. Food Chem., 53:3053-3056.
- HEITEFUSS, R. (2001) Defense reactions of plants to fungal pathogens: principles and perspectives, using powdery mildew on cereals as an example. Naturwissenschaften. V. 88. p. 273-283.
- HOAGLAND, R. E. (1990) Biochemical responses of plants to pathogens In: HOAGLAND, R. E. (Ed.) Microbes and microbial products as herbicides. Washington, American Chemical Society, p.87-113.
- HOGENHOUT, S. A.; VAN DER HOORN, K. A.; TERAUCHI, R.; KAMOUN, S. (2009) Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. Molecular Plant Microbe Interaction, v.22, p. 115-122.
- HUANG, H. C. & KOKKO, E. G. (1992) Pod rot of dry peas due to infection by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disease 76 597-600.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE (2008). Produção agrícola municipal: Cereais, leguminosas e oleaginosas.
- JONES, J. D. & DANGL, J. L. (2006) The plant immune system. Nature, v.444, p. 323-329.
- KIM, Y.; NANDAKUMAR, M. P.; MARTEN, M. R. (2007) Proteomics of Filamentous Fungi. Trends in Biotechnology, 25 (9): 395-400.
- KAMOUN, S. (2009) The secretome of plant-associated fungi oomycetes. In: DEISING, H. & ESSEY, K. The Mycota, p. 173-180.
- KUBICEK, C. P.; MACHR. L.; PETERBAUER, C. K.; LORITO, M. (2001) *Trichoderma*: From genes to biocontrol. J. Plant Pathol. 83: 11-23.
- KUBICEK, C. P.; HERRERA-ESTRELLA, A.; SEIDL-SEIBOTH, V. ET AL. (2011) Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. Genome Biol 12: R40.

LAKSHMAN, D. K.; NATARAJAN, S. S.; LAKSHMAN, S.; GARRETT, W. M.; DHAR, A. K. (2008) Optimized protein extraction methods for proteomic analysis of *Rhizoctonia solani*. *Mycologia* 100: 867-875.

LATUNDE-DADA, O. & LUCAS, J. A. (2001) The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*V. unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.58, p.199-208.

LEITE, R. M. V. B. C. (2005) Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. Londrina: Embrapa Soja, 2005, 3p. (Comunicado Técnico 76).

LO, L. C.; WEIERGANG, I.; BOHHAM, C.; HIPSKIND, J.; WOOD, K.; NICHOLSON, R. L. (1996) Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 9, p.21-31.

LOBO JR., M. (2002) Alien Plant Pathogens in Brazil. In: PIMENTEL, D. *Biological Invasions: Economic and Environmental Costs of Alien Plant, Animal, and Microbe Species*. Chemical Rubber Company Press, 69-88.

LORITO, M.; WOO S. L.; HARMAN, G. E.; MONTE, E. (2010) Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annu Rev Phytopathol* 48, 395–417

MARRA, R.; AMBROSINO, P.; CARBONE, V.; VINALE, F.; WOO, S. L.; RUOCCO, M.; CILIENTO, R.; LANZUISE, S.; FERRAIOLI, S.; SORIENTE, I.; GIGENTE, S.; TURRA, D.; FOGLIANO, V.; SCALA, F.; LORITO, M. (1999) Study of three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. *Appl. Environ. Microb.* 65(3): 1061-70.

MARTINS-MIRANDA, A. S. (2002) Atividade de enzimas relacionadas com estresses bióticos e abióticos em plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] expostas à salinidade e deficiência hídrica. 85 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MATHYS, J.; DE CREMER, K.; TIMMERMANS, P.; VAN KERCKHOVE, S.; LIEVENS, B.; VANHAECKE, M.; CAMMUE, B. P. A.; DE CONINCK, B. (2012)

Genome-wide characterization of ISR induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma hamatum* T382 against *Botrytis cinerea* infection. *Front. Plant Sci.* 3, 1–25.

MAUCH, F.; STAEHELIN, L. A. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. *Plant Cell*, Baltimore, v. 1, p. 447-457, 1989.

MORÁN-DIEZ, E.; HERMOSA, R.; AMBROSINO, P.; CARDOZA, R. E.; GUTIÉRREZ, S.; LORITO, M.; MONTE, E. (2009) The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum* – plant beneficial interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22, 1021–1031.

MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M. (2012) Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective. *Microbiology* 158, 35–45.

MELO, I. S. (1998) Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S., AZEVEDO, J. L., Controle biológico. Jaguariúna: EMBRAPA.

MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. (2000) Controle biológico. Jaguariúna: EMBRAPA, Meio Ambiente. p. 388.

NEIL, S. J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R. D.; HANCOCK, J. (2002a) Hydrogen Peroxide and nitric oxide as signal molecules in Planting. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 53, p. 1237-1247.

NEIL, S.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. (2002b) Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, Danvers, v. 5, p. 388-395.

OKUSHIMA, Y.; KOIZUMI, N.; KUSANO, T.; SANO, H. (2000) Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 42, p. 479-488.

OLIVA, R.; WIN, J.; RAFFAELE, S.; BOUTEMY, L.; BOZKURT, T. O.; CHAPARRO-GARCIA, A.; SEGRETIN, M. E.; STAM, R.; SCHORNACK, S.; CANO, L. M.; VAN DAMME, M.; HUITEMA, E.; THINES, M.; BANFIELD, M. J.;

- KAMOUN, S. (2010) Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cellular Microbiology*, v. 12, n. 6, p. 705-715.
- PAPAVIZAS, G. C. (1985) *Trichoderma* and gliocadium: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phitophatology* 23: 23-54.
- PIETERSE, C. M. J.; VAN PELT, J. A.; VA WEES, S. C. M.; TOM, J.; VERHAGEN, B. W. M.; LEON-KLOOSTERZIEL, K. M.; HASE, S.; KOORNNEEF, A.; CHALFUN-JUNIOR, A.; RESENDE, M. L. V.; VAN LOO, L. C. (2005) Indução de resistência por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. *Revisão anual e Patologia de Plantas*, v. 13.
- PIRES, C. S. S.; FONTES, E. M. G; SUJII, E. R. (2003). Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas: O algodão como estudo de caso. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.
- RAHMAN, M. & PUNJA, Z. K. (2005) Biochemistry of ginseng root tissues affected by rusty root symptoms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 1102-1114.
- RIBEIRO, N. D.; LONDERO, P. M. G.; CARNEGNELUTTI FILHO, A.; JOST, E.; POERSCH, N. L.; MALLMAN, C. A. (2007). Composição de aminoácidos de cultivares de feijão e aplicações para o melhoramento genético. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, n. 10, p. 1393-1399.
- ROELOFS, D.; DE BOER, M.; AGAMENNONE, V.; BOUCHIER, P.; LEGLER, J; VAN STRAALLEN, N. (2012) Functional environmental genomics of a municipal landfill soil. *Front Genet*3: 85.
- SALAS-MARINA, M. A.; SILVA-FLORES, M. A.; URESTI-RIVERA, E. E.; 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.
- SAMUELS, G. J. (2006) *Trichoderma*: Systematics, the Sexual State and Ecology. *Phytopathology* 96(2): 195-206.

- SEGARA, G.; CASANOVA, E.; BELLIDO, D.; ODENA, M. A.; OLIVEIRA, E.; TRILLAS, I. (2007) Proteome, salicylic acid and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34, *Proteomics*, (21): 3943-52.
- SEIDL, V.; MARCHETTI, M.; SCHANDL, R.; ALLMAIER, G.; KUBICEK, C. P. (2006) Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. *FEBS J* 273: 4346–4359.
- SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURI, F. (2010) Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathology*.
- STADNIK, M. J. & MARASCHIN, M. (2004) Indução de resistência de plantas a fitopatógenos. In: STADNIK, M. J., TALAMINI, V. (Eds.). *Manejo ecológico de doenças de plantas*. Florianópolis: CCA/UFSC, p. 221-244.
- STANGARLIN, J. R. KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. (2008) Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v.16, p.265-304.
- STERGIOPOULOS, I. & DE WIT, P. J. G. M. (2009) Fungal Effector Proteins. *Annual Review of Phytopathology*, v.47, p.233-63.
- STEINDORFF, A. S.; SILVA, R. N.; COELHO, A. S. G.; NAGATA, T.; NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. (2012) *Trichoderma harzianum* expresses sequence tags for identification of genes with putative roles in mycoparasitism against *Fusarium solani*. *Biological Control*, v. 61, p. 1-10.
- THATCHER, L. F.; ANDERSON, J. P.; SINGH, K. B. (2005) Plant defense responses: What have we learnt from *Arabidopsis*? *Funct Plant Biol* 31: 1–19.
- TJALSMA, H., BOLHUIS, JONGBLOED, J. D. H., BRON, S., VAN DIJL, J. (2000) Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiology and Molecular biology Reviewa*. 64 (3): 515-147.
- TRILLAS, M. I.; CASANOVA, E.; COTXARRERA, L.; ORDOVAS, J.; BORRERO, C.; AVILES, M., (2006) Composts from agricultural waste and the *Trichoderma*

asperellum strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. Biological Control 39: 32-38.

TON, J.; VAN PELT, J. A.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. (2002) Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylenedependent induced resistance in *Arabidopsis*. Mol. Plant-Microbe Interact, v. 15, p. 27-34.

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, 341–354.

ULHOA, C. J. & PEBERDY, J. F. (1993) Effect of carbon sources on chitobiose production by *Trichoderma harzianum*. Mycol Research. 97: 45-48.

VAN DEN BULCKE, M.; BAUW, G.; CASTRESANA, C.; VAN MONTAGU, M.;VANDEKERCKHOVE, J. (1989) Characterization of vacuolar and extracellular β -1,3-glucanases of tabaco: evidence for a strictly compartmentalized plant defense system. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 86, p. 2673-2677.

VAN LOON, L. C. & VAN KAMMEN, A. (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var ‘Samsun’ and ‘Samsun NN’. Changes in protein constitution after infection with TMV. Virology. New York, v. 40, p. 199-211.

VAN LOON L.C. & VAN STRIEN E.A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology, 55: 85–97.

VAN LOON, LC; REP, M.; PIETERSE, C. M. J (2006b) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology 44:135-162.

VERBENE, M. C.; VERPOORTE, R.; BOL, J. F.; MERCADO-BLANCO, J.; LINTHORST, H. J. M. (2000) Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. Nature Biotechnology, New York, v. 18, p. 779-783.

- VIEIRA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, M. A. P.; CARNEIRO, J. E. S. (2005) Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 301-391.
- VITERBO, A.; HAREL, M.; CHET, I. (2004) Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots. Federation of European Microbiological Societies. Microbiol Letters 238:151–158
- XUE, L.; CHAREST, P. M.; JABAJI-HAE, S. H. (1998) Systemic induction of peroxidases, b-1,3-glucanase, chitinase and resistance in bean plants by binucleate Rhizoctonia species. Biological control, v. 88, p. 359-363.
- WALTERS, D. & HEIL, M. (2007) Costs and trade-offs associated with induced resistance. Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 71, p. 3-17.
- WATANABE, N.; AKIBA, T.; KANAI, R.; HARATA, K. (2006) Structure of an orthorhombic form of xylanase II from *Trichoderma reesei* and analysis of thermal displacement. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. Vol. 62, No.7, p. 784–792, ISSN 1600-5724.
- WEINDLING, R. (1932) *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology, 22:837-845.
- WOO, S. L., SCALA, F., RUOCCO, M., LORITO, M. (2006) The molecular biology of the interactions between *Trichoderma spp.*, phytopathogenic fungi, and plants. Phytopathology, 96(2): 181-185.
- YANG, T. & POOVAIAH, B. W. (2002) Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, Washington, v. 99, n. 6, p. 4097-4102.
- YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; CHET, I. (1999) Induction of defence responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied Environmental Microbiology 65, 1061–1070.
- ZAREIE, R.; MELANSON, D. L.; MURPHY, P. J. (2002) Isolation of fungal cell wall degrading proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves infected with

Rhynchosporium secalis. Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul, v. 15, n. 10, p. 1031-1039.

ZHANG, J. & ZHOU, J-M. Plant Immunity Triggered by Microbial Molecular Signatures. Mol Plant, v.3, n.5, p.783-793, 2010.

ZIPFEL, C.; ROBATZEK, S.; NAVARRO, L.; OAKELEY, E. J.; JONES, J. D. (2004) Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. Nature, v. 428, p. 764-767.