



Universidade de Brasília

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana

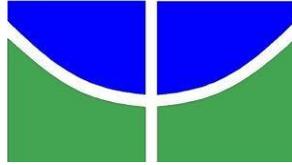
**Análise proteômica da interação *Trichoderma asperellum*,  
*Phaseolus vulgaris* e *Sclerotinia sclerotiorum***

**Francilene Lopes da Silva**

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

**Brasília, DF**

**Março de 2018**



**Análise proteômica da interação *Trichoderma asperellum*, *Phaseolus vulgaris* e *Sclerotinia sclerotiorum***

**Francilene Lopes da Silva**

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

**Brasília, DF**

**Março de 2018**

O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.

**Isaac Newton**

Aos meus pais Francisco de Assis da Silva e Noeme Lopes da Silva, que na simplicidade e no amor investiram todas as suas forças para o bem maior de seus filhos.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

O término de mais uma caminhada, mais uma conquista, mais um sonho realizado, não teria sido possível se não fosse a imensa ajuda e apoio que recebi ao longo desses quatro anos. O que me resta então é agradecer a tudo e a todos que através de palavras, gestos e atitudes fizeram deste um sonho possível.

A tarefa de agradecer não é fácil pois podemos cometer o erro de não ser gratos o suficiente através de palavras. Devo agradecer a muitas pessoas, cada uma cumprindo um papel importante nesta trajetória.

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, Maria e cunhada Camila Pimenta, 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. A pequena Zoé, minha sobrinha linda, que veio ao mundo para nos alegrar e tornar nosso mundo melhor. Eu os amo muito!

Ao meu querido e sempre amado Weliton P. dos Santos, pela presença, por nossos sonhos, pelo carinho e apoio nos estudos, por tornar minha vida mais leve e mais bonita, por alegrar meus dias e sempre encontrar uma maneira de me fazer sorrir. Amo-te!

A minha orientadora, Eliane F. Noronha, por acreditar em mim e me mostrar o caminho da ciência! Pelo apoio e ensinamentos ao longo de todos esses anos de convivência, pelo suporte e orientação segura e firme que permitiram a concretização deste projeto. A senhora sempre terá o meu respeito e admiração! `` Se cheguei até aqui foi porque me apoiei nos ombros de gigantes``

A companheira de bancada e amiga Débora Cunha, minha estagiária eficiente, pela paciência e pela dedicação no auxílio do desenvolvimento desse trabalho. Por alegre nossos momentos de bancada com músicas e boas risadas. Seu jeito deixa tudo mais alegre!!!

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

Ao amigo Helder Andrey R. Gomes, pela amizade verdadeira. Por chorar comigo quando os experimentos não davam certo e por se alegrar quando davam, por saber o que dizer na hora certa, por sair para comer besteiras quando não havia mais a ser dito! Por me ajudar na correção da tese! Você foi fundamental nessa etapa!

Ao Doutor André Melro Murad, por todo apoio na execução dos experimentos proteômicos, na análise e organização dos dados que foram fundamentais para a conclusão desse trabalho.

Ao Doutor Murillo Lobo Junior, por tomar frente dos cultivos de feijoeiro na casa de vegetação da EMBRAPA Arroz e Feijão, GO. Sua ajuda foi fundamental!

Ao Professor Doutor Cirano José Ulhoa pelo apoio nos cultivos e coletas das plantas. Meu muito obrigada!

A amiga Brenda, por toda ajuda na banca desde o início, pela ajuda na análise dos dados e na reta final, pelos conselhos e discussões construtivas. Por estar presente para o que der e vier!

Aos amigos Pedro, Alonso e Jovane, pelo apoio, ajuda na montagem dos gráficos e discussões pertinentes. Meu muito obrigada!

Ao técnico e amigo Jaques, pelo apoio e discussões pertinentes sobre a metodologia desse trabalho.

Aos amigos Anna Sofya Vanessa, Andrei, Andreza, Antonielle, Babi, Caio, Carla, Carol, Diandra, Fabiano, Gabi, Hamile, Jéssica, Joana, Joyce, Leonora, Letícia, Mário, Matheus, Micaela, Raissa, Raul, Renata, Sadia, Samuel, Thiago, 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 no Laboratório de Enzimologia.

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

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

A EMBRAPA pelo suporte técnico para a realização desse trabalho.

A Capes pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte dessa conquista e realização pessoal, meus sinceros agradecimentos.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE TABELAS .....	12
LISTA DE ABREVIACOES .....	13
RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	16
1. INTRODUÇAO.....	17
1.1. FEIJOEIRO-COMUM.....	17
1.1.1. O feijão e sua importância.....	17
1.1.2. Doença de Feijoeiro - MOFO BRANCO .....	20
1.2. SISTEMA IMUNE DE PLANTAS .....	23
1.2.1. Induo de resistência em plantas .....	28
1.2.2. Proteínas relacionada  patogênese ou R-PROTEÍNAS .....	30
1.2.3. Sinalizao por MAPK kinases.....	32
1.2.4. Efetores - a Suscetibilidade Desencadeada por Efetores (ETS).....	34
1.3. INDUO DE DEFESA E RESISTÊNCIA EM PLANTA HOSPEDEIRA POR TRICHODERMA SPP. ....	36
1.4. O USO DA PROTEÔMICA NO ESTUDO DA INTERAO PLANTA-TRICHODERMA-PATÓGENO .....	39
2. OBJETIVOS .....	43
2.1. Objetivo geral .....	43
2.2. Objetivos específicos .....	43
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1. Análise do secretoma da interao T. asperellum TR 356 e Phaseolus vulgaris .	44
3.1.1. Microrganismo utilizado .....	44
3.1.2. Crescimento do fungo e obteno dos esporos .....	45
3.1.3. Bioensaio de interao Trichoderma/feijoeiro comum em um sistema adaptado de hidroponia .....	45
3.1.4. Preparo da amostra para análise em NanoUPLC-MS <sup>E</sup> .....	46

3.1.5. Análise por nanoLC-MS <sup>E</sup> .....	47
3.1.6. Análise dos dados da análise LC-MS/MS e a identificação das proteínas....	49
3.2. Análise do proteoma de folhas de feijoeiro comum em interação com <i>T. asperellum</i> TR356 e <i>S. sclerotiorum</i> .....	51
3.2.1. Microrganismos.....	51
3.2.2. Produção das plantas em casa de vegetação e infecção com o patógeno.....	51
3.2.3. Extração de proteínas totais de folhas de feijoeiro.....	52
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	54
4.1. Análise do Secretoma de <i>T. asperellum</i> TR 356 quando cultivado na ausência ou presença de <i>P. vulgaris</i> .....	54
4.2. Análise do proteoma de folhas de <i>Phaseolus vulgaris</i> em interação com <i>T. asperellum</i> TR 356 e <i>S. sclerotiorum</i> .....	60
4.2.1. Proteínas com abundância diferencial em folhas de feijoeiro cultivados na presença do patógeno <i>S. sclerotiorum</i> .....	60
4.2.2. Proteínas com abundância diferencial em folhas de feijoeiro cultivados na presença de <i>T. asperellum</i> TR 356.....	68
4.2.3. Proteínas com abundância diferencial em folhas de feijoeiro cultivados na presença de <i>T. asperellum</i> TR 356 e do patógeno <i>S. sclerotiorum</i> .....	74
4.2.4. Análise em cluster das proteínas diferencial expressas em feijoeiro na presença dos fungos <i>T. asperellum</i> TR356 e <i>S. sclerotiorum</i> .....	81
5. CONCLUSÃO.....	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	87
8. ANEXO .....	102

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Variedade de grãos de feijão. Fonte site Healthy families 2018 .....Pag 16
- Figura 2. Produção mundial de feijão nos países de maior produção para os anos de 2010 a 2014.....Pag 17
- Figura 3: Fungo *Sclerotinia sclerotiorum* isolado em placa apresentando as estruturas de resistência, escleródios, pontos pretos na placa (esquerda) e o mofo branco causado pelo mesmo em vagem de feijoeiro (direita). Foto: Débora Cunha e Murillo Lobo Junior.....Pag 21
- Figura 4. Modelo ilustrativo do sistema imune da planta: Inicialmente as plantas detectam, através dos PRRs, os PAMPs ou MAMPs (losangos em vermelho) para desencadear a imunidade desencadeada por PAMP (PTI). Em seguida, alguns patógenos conseguem suprimir a PTI, seja por implantação de efetores na planta ou de outra forma a permitir a nutrição e dispersão do patógeno, resultando em susceptibilidade desencadeada por efetor (ETS). Na segunda fase um efetor (indicado por círculos em rosa) é reconhecido por uma proteína específica, ativando a imunidade desencadeada por efetores (ETI). Na fase final, alguns patógenos ganham novos efetores (em azul) que permitem ao patógeno suprimir a ETI (Jones & Dangl, 2006). .....Pag 24
- Figura 5. Principais classes de genes (R) de resistência baseado nos arranjos dos domínios funcionais.....Pag 26
- Figura 6. Rotas da resistência sistêmica adquirida (SAR) e induzida (ISR) ativadas por microrganismos patogênicos e não-patogênicos em plantas através das moléculas sinalizadoras ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET). Modificado de Pieterse et al., 1998..... Pag 28
- Figura 7. Mudanças na amplitude da defesa vegetal contra patógenos causados por espécies de *Trichoderma* como indicado pelo modelo criado por Jones and Dangl (setas azuis). 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, mantendo a resposta da planta em um nível acima ou apenas abaixo do limiar eficaz (ETS). *Trichoderma* spp. também aumentam a ETI levando a 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.....Pag 36

Figura 08. Categorização funcional das proteínas identificadas com maior (A) e menor (B) abundância em folhas de feijoeiro comum crescido na presença do patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.....Pag 62

Figura 09. Categorização funcional das proteínas identificadas com maior (A) e menor (B) abundância em folhas de feijoeiro comum crescido na presença do isolado *Trichoderma asperellum* TR 356..... Pag 66

Figura 10. Categorização funcional das proteínas identificadas com maior (A) e menor (B) abundância em folhas de feijoeiro comum crescido na presença do isolado *Trichoderma asperellum* TR 356 e do patógeno, *Sclerotinia sclerotiorum*..... Pag 68

Figura 11. Proteínas identificadas com maior (Verde) e menor (laranja) abundância em folhas de feijoeiro comum na presença do patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.....Pag 72

Figura 12. Proteínas identificadas com maior (Verde) e menor (laranja) abundância em folhas de feijoeiro comum quando crescido com *Trichoderma asperellum* TR 356..... Pag 74

Figura 13. Proteínas identificadas com maior (Verde) e menor (laranja) abundância em folhas de feijoeiro comum quando crescido com *Trichoderma asperellum* TR 356 e *S. sclerotiorum*..... Pag 79

Figura 14. Análise em cluster das proteínas diferencial expressas em folhas feijoeiro na presença de *Trichoderma asperellum* TR 274 e *Sclerotinia sclerotiorum* separadas em 5 cluster representados pelas cores a direita da figura A. Para melhor entendimento da figura ela foi desmembrada em B, C e D.....Pag 84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Famílias de proteínas relacionadas à patogênese.....	Pag 30
Tabela 2. Proteínas identificadas no secretoma de <i>Trichoderma asperellum</i> TR 356.....	Pag 54
Tabela 3. Proteínas identificadas no secretoma de <i>Trichoderma asperellum</i> TR 356 na presença de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	Pag 55
Tabela 1 suplementar. Proteínas únicas identificadas em feijoeiro crescido na presença de <i>Trichoderma</i> (PT) ou <i>S. sclerotiorum</i> (PSS) e com os dois juntos (PTS).....	Pag 101
Tabela 2 suplementar. Nomes das proteínas correspondentes aos números de acesso SAMPs e suas cores de acordo com a análise de cluster.....	Pag 106
Tabela 3 suplementar. Proteínas com abundância diferencial identificadas em feijoeiro crescido na presença de <i>Trichoderma</i> (PT) ou <i>S. sclerotiorum</i> (PSS) e com os dois juntos (PTS).....	Pag 109

## LISTA DE ABREVIÇÕES

**ABA:** Ácido abscísico

**AS:** Ácido Salicílico

**BDA:** Batata-Dextrose-Ágar, meio de cultura

**CC:** Condição cocultivo

**CP:** Condição planta

**CF:** Condição fungo

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

**ET:** Etileno

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

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

**GLU:**  $\beta$ -1,3-glucanases

**GH:** Glicosil hidrolase

**GO:** *Gene Ontology*

**GST:** glutathione S transferase

**h:** hora

**HSP:** *Heat Shock Protein*

**ISR:** Resistência Sistêmica Induzida

**JA:** ácido jasmônico

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

**LOX:** lipoxigenases

**M:** molar

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

**mg:** miligrama

**mM:** milimolar

**MS:** Murashige & Skoog, meio de cultura

**MTI:** Imunidade desencadeada por MAMPs

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

**nL:** nanôlitro

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

**PEP:** *Posterior Error Probability*

**PLGS:** *ProteinLynx Global Server*

**PR-proteínas:** Proteínas relacionadas a patogênese

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

**PTI:** Imunidade desencadeada por PAMPs

**PSS:** Planta cultivada com *Sclerotinia sclerotiorum*

**PT:** planta cultivada com *Trichoderma asperellum* TR 356

**PTS:** Planta cultivada com *Trichoderma asperellum* TR 356 e *Sclerotinia sclerotiorum*

**RH:** Reação de Hipersensibilidade

**ROX:** espécies reativas de oxigênio

**SAR:** Resistência Sistêmica Adquirida

**SCC:** secretoma da condição cocultivo

**SCF:** secretoma da condição fungo

**SCP:** secretoma da condição planta

**SM1:** *Small protein 1*

**SSCP:** small secreted cysteine proteins

**TCA:** ácido tricloroacético

**µg:** micrograma

**µL:** microlitro

## RESUMO

*Phaseolus vulgaris* é uma das leguminosas de maior importância sócio-econômica para o Brasil, porém essa cultura é susceptível ao ataque de muitos fungos fitopatogênicos, destacando-se a doença do mofo-branco, causada pelo patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. *Trichoderma* spp. vêm sendo estudadas em interação com planta hospedeira e são capazes de induzir sua resposta de defesa e resistência contra patógenos. No presente trabalho a espécie *Trichoderma asperellum* TR 356 quando cultivado na presença de feijoeiro comum secretou proteínas hidrofobinas, ceratoplatanina e peptidase, já descritas como envolvidas na colonização e indução de resposta de defesa de outras espécies de *Trichoderma* em associação com plantas hospedeiras. Além disso, foram detectadas e identificadas proteínas candidatas a efetores, uma ribonuclease N1 e T1 e três proteínas hipotéticas que ainda não foram caracterizadas funcionalmente. Utilizando NanoUPLC-MS<sup>E</sup> também foi possível observar alterações na abundância de proteínas em folhas de feijoeiro cultivado na presença de *T. asperellum* TR 356 e *S. sclerotiorum*. O total de 97, 67 e 75 proteínas com abundância diferencial foram identificadas em folhas de feijoeiro cultivado na presença dos dois fungos (PTS), do *T. asperellum* Tr 356 (PT) e do patógeno (PSS) respectivamente. A maior parte das proteínas com maior abundância em PTS são proteínas relacionadas à resposta de defesa, 47 %, destacando-se proteínas relacionadas à resposta a estresse salino, oxidativo, a microrganismos patogênicos e proteínas envolvidas na cascata de MAPKs. A presença do patógeno *S. sclerotiorum* ativa vias clássicas de defesa como a SAR e vias sinalizadas pelo hormônio ABA. O patógeno também aumentou a abundância das PR-proteínas quitinases, osmotina 34 e inibidor de proteases nas folhas de feijoeiro, sua presença também diminuiu a abundância de outras proteínas relacionadas a defesa, 40 %, metabolismo e fotossíntese, 9 % cada grupo, além de proteínas com atividade oxidoreductora, 21 %. A presença do isolado de *Trichoderma* TR 356 levou a uma maior abundância de proteínas relacionadas a resposta de defesa, 49 %, metabolismo, atividade oxidorreductora, 13 % e proteínas relacionadas fotossíntese 6 %. Estes resultados sugerem que o isolado TR 356 é capaz de induzir respostas sistêmicas em folhas de feijoeiro, como defesa e mudanças na taxa metabólica e fotossintética.

## ABSTRACT

*Phaseolus vulgaris* one of the most socio-economic relevant legumes in Brazil. However, this culture is susceptible to attack by many phytopathogenic fungi, especially the white mold disease, caused by the pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Trichoderma* spp. has been analyzed in interaction with the host plant and is capable of inducing their defense response and resistance against pathogens. In this work, *Trichoderma asperellum* TR 356 strain was cultivated together with the common bean plant, secreting proteins such as hydrophobin 2, cerato-platanin and peptidase, already described as involved in colonization and defense response induction from other *Trichoderma* species associated with host plants. Additionally, proteins candidate effector were detected and identified, one ribonuclease N1 and T1 and three hypothetical proteins which were not functionally characterized. By means of NanoUPLC-MS<sup>E</sup> it was possible to observe changes in the abundance of proteins in common bean cultivated in the presence of *T. asperellum* TR 356 and *S. sclerotiorum*. A total of 75, 67 and 97 proteins were found with significant differential abundance in leaves of common bean cultivated with the pathogen (PSS), *T. asperellum* TR 356 (PT) and together with both fungi (PTS), respectively. Most of the proteins abundant in PTS were proteins related to the defense response, 47%, especially proteins related to response to salt and oxidative stress, pathogen microorganisms and proteins involved in MAPK cascade. The presence of *S. sclerotiorum* pathogen activates classic defense pathways such as SAR and the pathways signaled by ABA hormone. The pathogen improved the abundance of PR-proteins, chitinase, osmotin 34 and protease inhibitor in leaves of common bean, as well as reduces the abundance of defense related proteins, 40%, metabolism and photosynthesis, 9% each group, as well as oxidoreductase activity-related proteins, 21%. The presence of *Trichoderma* TR 356 resulted in a greater abundance of defense response related proteins, 49%, metabolism, oxidoreductase activity, 13% each one and proteins related to photosynthesis, 6%. Such results suggest that the isolate TR 356 is able to inducing systemic responses in leaves of common bean, such defense and changes in metabolic and photosynthetic rates.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. FEIJOEIRO-COMUM

### 1.1.1. O feijão e sua importância

O crescimento populacional ao longo dos tempos teve como consequência o aumento da demanda por alimentos. Esta demanda estimulou os agricultores a produzirem alimentos em grande quantidade, intensificando a monocultura em todo o mundo. Segundo dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* - FAO para atender a demanda dos 9 milhões de habitantes do planeta em 2050, se o ritmo de consumo da população continuar o mesmo, o mundo precisará de 60 % mais alimentos (FAO, 2016).

Dentre as monoculturas de maior importância socioeconômica destaca-se o feijão, sendo este dividido em dois grupos: Grupo I – Feijão comum, *Phaseolus vulgaris* L, subdividido em feijão branco, preto e cores, originário das Américas e o Grupo II – Feijão Caupi, *Vigna unguinalata* (L) Walp originário da África, subdividido, também, em feijão branco, preto e cores. Ambos os grupos pertencem à família Fabacea, são espécies diplóide  $2n=22$ . Atualmente já tiveram seu genoma sequenciado e anotado em banco de dados (EMBRAPA, 2011; EMBRAPA, 2016).

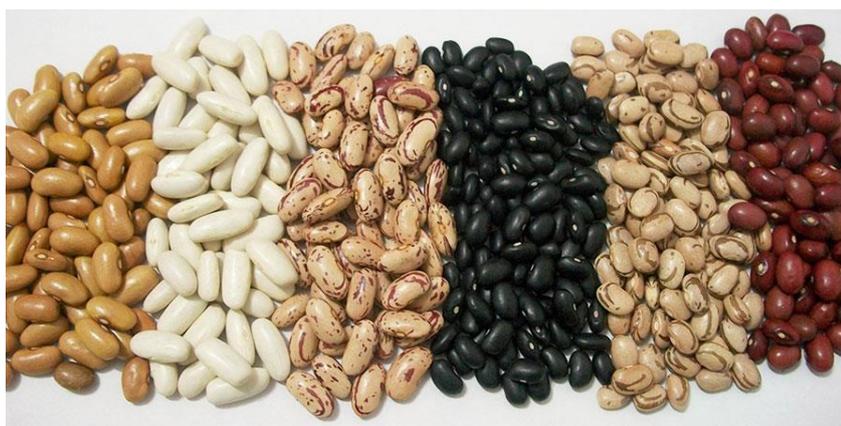


Figura 1. Variedade de grãos de feijão. Fonte site Healthy families 2018

Mundialmente, os vários tipos de feijão (Figura 1) representam mais de 50% do consumo de grãos na alimentação humana e, devido às suas características nutricionais, é responsável por até 36% da ingestão diária de proteínas, bem como o fornecimento de

carboidrato (15% de calorias), fibras, vitaminas como A1, complexo B, C e E, além de minerais como ferro, zinco, cobre e fósforo (Schmutz *et al.* 2014; Shailendar Kumar *et al.* 2015).

O feijão possui ainda compostos químicos com ação antioxidante como flavonoides, isoflavonas e antocianinas (presente no grão preto) que tem se mostrado um excelente aliado na prevenção de doenças como câncer, diabetes, obesidade, além de problemas cardíacos. Devido a este conjunto de nutrientes, a 8ª edição do Dietary Guidelines for Americans recomendou o consumo de pelo menos 1 xícara e 1/2 de feijão por semana. Devido às suas propriedades nutricionais o feijão pertence ao grupo de leguminosas empregadas pelo programa de combate a fome da ONU. O feijão não só contribui para uma alimentação saudável, mas sua produção é, também, uma fonte de renda para os agricultores familiares, já que a agricultura familiar ainda é empregada na produção (FAO, 2017).

Conforme os dados registrados pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) em 2017/2018, a produção mundial de feijão seco situou-se em torno de 23,1 milhões de toneladas. Os maiores produtores mundiais desse grão são China, Brasil, Estados Unidos, Índia, Myanmar, e México, juntos eles concentram cerca de 61 % da produção mundial (Figura 2).

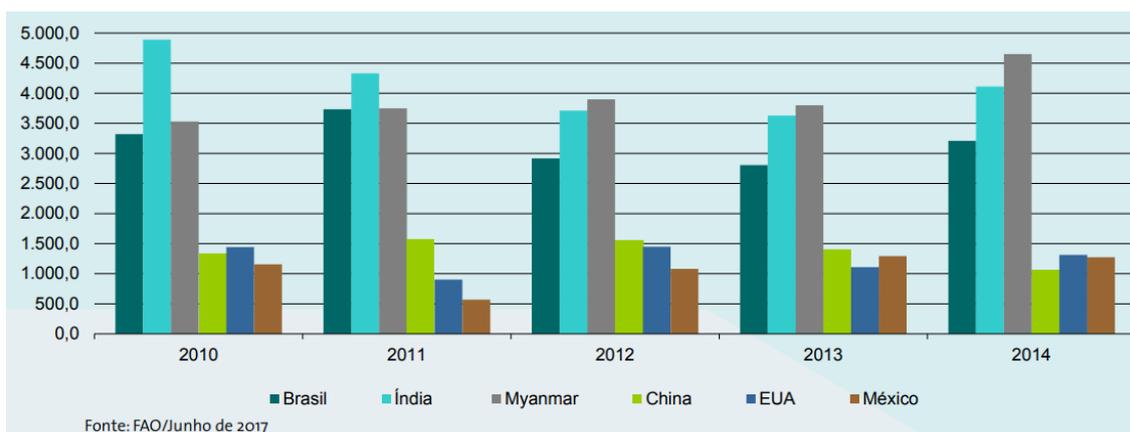


Figura 2. Produção mundial de feijão nos países de maior produção para os anos de 2010 a 2014.

Nos últimos quatro anos, a produção média de feijão em países que compõem o Mercosul, ficou em 3,06 milhões de toneladas, sendo que o Brasil se destaca como o

principal produtor e consumidor, com uma produção de aproximadamente 3,364 milhões de toneladas no último ano (CONAB 2017, 2018).

No Brasil, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a cada dez brasileiros, sete consomem feijão diariamente, totalizando 19 kg por pessoa ao ano. O tipo cores carioca é o preferido nacionalmente, representando mais de 50% da área cultivada com feijoeiro comum, seguido do grão preto que é produzido em 21% da área cultivada e consumido principalmente nos Estados da região sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo. Já o feijão-caupi tem sua produção e principal sítio consumidor concentrados nos Estados das regiões Norte e Nordeste, com uma representatividade de menos de 10% na área cultivada com feijoeiros em todo o país (MAPA, 2015).

O Feijão é cultivado em todo o território nacional sendo que os estados do Paraná, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso se destacam como os maiores produtores. O cultivo dessa leguminosa é dividido em 3 períodos ou safras ao longo do ano:

- A 1ª safra, de acordo com o calendário, o plantio da Região Sul e Sudeste vai de agosto a dezembro e a colheita nos meses de novembro a abril. Já na Região Centro-Oeste, Nordeste e Norte, o plantio é outubro a fevereiro e a colheita em janeiro a maio.

- O plantio da 2ª safra, abrange todos os Estados brasileiros e de acordo com o calendário, o plantio da Região Sul e Sudeste vai de janeiro a abril, e a colheita nos meses de março a agosto. Já na Região Centro-Oeste, Norte e Nordeste, o plantio fica entre os meses janeiro a junho e a colheita de março a setembro.

- O plantio da Região Sul e Sudeste na 3ª safra vai de março a junho e a colheita nos meses de junho a outubro. Já na Região Centro-Oeste, Norte e Nordeste, o plantio é realizado nos meses de abril a junho e a colheita de junho a outubro.

Considerando as três safras de 2016/2017 a área plantada foi de 3,0 mil hectares, a produtividade média foi estimada em 1.076 kg/ha e a produção ficou estabelecida em 3,3 mil toneladas (CONAB 2017), variando pouco em relação aos anos anteriores.

Por ser cultivado durante todo o ano, em uma grande diversidade de ecossistemas, inúmeros fatores podem interferir na produção do feijoeiro. Entre estes fatores estão às doenças, as quais constituem uma das principais causas de sua baixa

produtividade, além de depreciarem a qualidade do produto ou mesmo inviabilizarem determinadas áreas para o cultivo (Lobo Jr, 2002; MAPA, 2015)

### **1.1.2. Doença de Feijoeiro - Mofo branco**

As doenças de planta surgem devido às alterações bioquímica, fisiológica, citológica, histológica ou morfológica na planta, de modo que a ocorrência de uma doença é função da interação de três fatores básicos: hospedeiro suscetível, patógeno virulento e ambiente favorável (Rezende *et al.*, 2011).

As doenças que ocorrem na cultura do feijoeiro constituem uma das principais causas de sua baixa produtividade no Brasil. Muitas delas podem causar redução significativa da produtividade ou mesmo inviabilizar determinadas áreas para o cultivo (Vieira *et al.*, 2007; Café Filho e Lobo Jnr, 2000).

A cultura do feijoeiro é suscetível a inúmeras espécies de patógenos, incluindo vírus, bactérias, fungos e nematoides. Citam-se mais de 45 enfermidades que ocorrem durante seu ciclo, causando acentuadas perdas na produção (Wendland *et al.*, 2014). Tais patógenos causam doenças que limitam a produção de feijão e reduzem a qualidade fisiológica, sanitária, nutricional e comercial do produto (Boersma *et al.* 2015). Uma das principais doenças que ocorrem no feijoeiro é o mofo branco, incitada pelo fungo fitopatogênico de solo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lobo Jr, 2002; Wendland *et al.*, 2014).

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary pertence ao filo dos Ascomycetes, classe Leotiomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae. Este fungo habitante de solo é considerado um patógeno de importância em nível mundial por ocorrer em diferentes regiões geográficas tanto em regiões de clima temperado e tropical, como também em regiões secas e úmidas (Cassetari Neto, Machado e Silva, 2010).

Este fitopatógeno acomete mais de 400 espécies de plantas suscetíveis, pertencentes a 278 gêneros e 75 famílias, dentre elas várias de importância econômica. No Brasil, este fungo foi descrito pela primeira vez, em 1920, na cultura de batata, no estado de São Paulo, atualmente sua ocorrência é relatada principalmente nos estados do

Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo e no Distrito Federal causando doenças em diversas culturas como a de feijão, soja, algodão, alcachofra, a alface, o amendoim, a batata, a berinjela, a chicória, a cenoura, a ervilha e diversas espécies de flores (Carvalho *et al.* 2015).

Este fungo é considerado necrotrófico. Ele sobrevive principalmente na forma de escleródios, que são estruturas de resistência compactas e melanizadas, podendo sobreviver por longos períodos de tempo sob condições adversas. Essas propriedades são essenciais para a sobrevivência, propagação e difusão do fungo, já que encontrando condições favoráveis como alta umidade e temperatura baixa os escleródios poderão dar início à germinação. O enorme potencial reprodutivo, juntamente com a capacidade de sobrevivência por longo prazo faz dos escleródios componentes centrais na epidemiologia de *S. sclerotiorum*. Os escleródios podem germinar carpogenicamente ou miceliogenicamente, dependendo das condições ambientais, resultando em duas distintas categorias de doenças. A forma miceliogênica produz hifas que podem atacar diretamente os tecidos das plantas e, a forma carpogênica que produz apotécios e, posteriormente, ascósporos aéreos que infectam partes de plantas hospedeiras (Leite, 2005; Oliveira, 2005; Oliveira *et al.*, 2011).

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é o agente etiológico da doença conhecida como mofo branco, podridão branca da haste, podridão branca de esclerotínia, uma das doenças mais importantes na cultura de feijão (Lobo Jr., 2002). Em condições favoráveis e na presença de um hospedeiro suscetível, o escleródio germina e pode produzir micélio, que penetra diretamente nos tecidos da base da planta, ou forma apotécios, que emergem na superfície do solo e liberam os ascósporos. Em condições de alta umidade relativa, acima de 70%, e temperatura ao redor de 20°C, os apotécios liberam ascósporos durante várias semanas, que são responsáveis pela infecção da parte aérea das plantas. O fungo invade os tecidos e provoca o seu apodrecimento. O micélio desenvolve-se sobre um substrato formado por tecidos mortos ou senescentes. A temperatura ótima para o desenvolvimento do micélio situa-se entre 18°C e 25°C (Leite 2005; Lobo Jr *et al.* 2009).

Os sintomas e sinais externos, mais visíveis na planta, são a presença de lesões encharcadas nos órgãos afetados, de coloração parda e consistência mole, com micélio

branco, de aspecto cotonoso, cobrindo porções dos tecidos como pode ser visto na figura 3 (Leite 2005).



Figura 3: Fungo *Sclerotinia sclerotiorum* isolado em placa apresentando as estruturas de resistência, escleródios, pontos pretos na placa (esquerda) e o mofo branco causado pelo mesmo em vagem de feijoeiro (direita). Foto: Débora Cunha e Murillo Lobo Junior.

O mofo-branco é tão importante que, em 2015, foi incluída pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento como uma das oito pragas de maior risco fitossanitário para o Brasil e para as quais deve ser priorizado o desenvolvimento e o registro de tecnologias para controle (MAPA, 2015).

A principal forma de controle de fungos fitopatogênicos, mundialmente utilizada, ainda é o uso de fungicidas químicos. Esse processo além de ocasionar o surgimento de patógenos resistentes e pragas secundárias (Pires et al, 2003; Carvalho et al., 2011) pode prejudicar à saúde dos produtores agrícolas e consumidores causando impactos ao meio ambiente (Punja and Utkhede, 2003). Outra desvantagem no uso de fungicidas químicos está relacionada à sua inespecificidade, podendo eliminar microrganismos já estabelecidos no solo que são benéficos às plantas aumentando assim, sua suscetibilidade aos patógenos de solo (Pires et al, 2003). Nos últimos anos, devido à pressão imposta pelas leis de impacto ambiental, a crescente preocupação da população com o meio ambiente e saúde, bem como pela necessidade de desenvolvimento de métodos de controle mais eficientes, surgiu a demanda por novas estratégias neste controle (Carvalho et al., 2015).

Uma alternativa ao uso de fungicidas é o uso de microrganismos benéficos junto a planta que induzam resposta de defesa e resistência na planta hospedeira ou inibam o crescimento de fungos fitopatogênicos presentes no ambiente. Estudos recentes têm mostrados que alguns fungos do gênero *Trichoderma* podem ser usados para controlar o crescimento de fungos fitopatogênicos (Vinale *et al.* 2008; Shoresh *et al.* 2010) e podem melhorar a resposta de defesa quando em interação com a planta hospedeira (Pereira *et al.* 2014a). No entanto, para que o uso desses agentes ocorra é necessário um melhor entendimento do mecanismo de defesa da planta hospedeira, assim como da identificação de genes ou proteínas associadas à defesa e resistência ao ataque de patógenos (Pereira *et al.* 2014a; Lamdan *et al.* 2015; Guzmán-Guzmán *et al.* 2017).

## 1.2.SISTEMA IMUNE DE PLANTAS

Em seu ambiente natural, as plantas interagem intimamente com patógenos e herbívoros dos mais variados tipos. Para se proteger contra esses agressores em potencial, as plantas apresentam barreiras de defesa pré-formadas como as ceras, tricomas e a própria parede celular, as quais previnem ou atenuam a invasão por patógenos ou ataques dos herbívoros (Stergiopoulos and de Wit 2009).

Muitos desses agressores, porém, conseguem ultrapassar a defesa pré-formada. Para evitar o ataque dos mesmos, as plantas apresentam mecanismos de defesa pós-invasão, correspondendo a respostas ativas desencadeadas a partir do reconhecimento do patógeno ou herbívoro. As respostas de defesa desencadeadas após a invasão do tecido vegetal pelo patógeno são representadas pelo modelo “zig-zag” (Jones and Dangl 2006) que propõe a existência de duas linhas de defesa, os quais são definidos principalmente, de acordo com as moléculas liberadas pelo patógeno reconhecidas pela planta hospedeira (Figura 4).

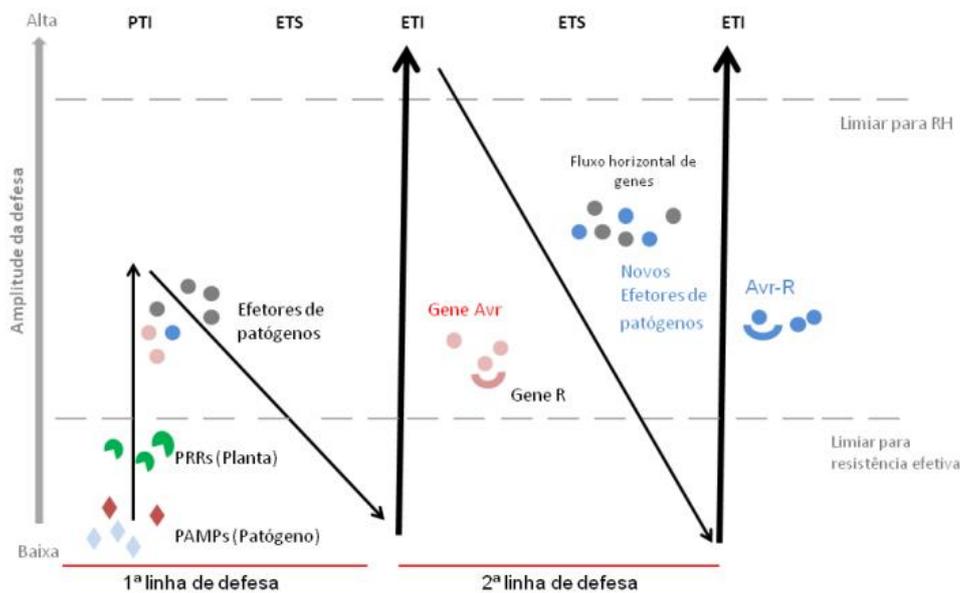
A primeira linha confere defesa basal contra todos os patógenos ou a maioria deles, ocorrendo tipicamente nas membranas celulares e envolve a capacidade das plantas hospedeiras de reconhecer uma grande variedade de estruturas microbianas conservadas, os Padrões Moleculares associados à Patógenos - PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) ou Padrões Moleculares associados à micróbios –

MAMPs (*Microbes Associated Molecular Patterns*), como a flagelina, quitina, glicoproteínas, lipopolissacarídeos, por estruturas denominadas de receptores de reconhecimento padrão – PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) presentes em suas superfícies celulares (Pieterse *et al.* 2014).

Este reconhecimento inicia a imunidade de defesa desencadeada por MAMPs - MTI (*MAMPs triggered immunity*) ou PAMPs – PTI (*PAMPs triggered immunity*) ou defesa basal não específica, a qual envolve uma cascata de sinalização mediada por proteínas MAPKinases e culmina em uma reprogramação transcricional para a expressão de genes de defesa. Além das MAMPs e PAMPs, os PRRs também reconhecem moléculas endógenas liberadas pela planta no momento da invasão do patógeno, como oligômeros de parede celular ou fragmentos cuticulares, chamados de padrões moleculares associados a danos - DAMPS (*Damage Associated Molecular Patterns*), que também levam a uma resposta imune, a imunidade desencadeada por DAMPs - DTI (*DAMPstriggeredimmunity*) (Pieterse *et al.* 2014; Miller *et al.* 2017)

Patógenos e herbívoros adaptados adquiriram durante a co-evolução com suas plantas hospedeiras fatores de virulência, denominados efetores, os quais são proteínas de virulência liberadas nas células hospedeiras pelos patógenos para suprimir suas respostas de defesa levando à doença (Fu and Dong 2013), ou seja, suprimindo a PTI/MTI/DTI. Como resultado da ação dos efetores a planta passa a ser suscetível, o que caracteriza uma Suscetibilidade Desencadeada por Efetores – ETS (*Effector-Triggerred Susceptibility*) (Jones and Dangl 2006; Miller *et al.* 2017).

Em contrapartida, as plantas podem apresentar genes R especializados para detectar a presença de efetores, ativando uma resposta imune secundária, acelerada e amplificada da PTI resultando em resistência à doença. Esta é a segunda linha de defesa chamada de Imunidade desencadeada por efetores – ETI (*EffectortriggeredImmunity*) ou interação gene-a-gene, como foi descrita inicialmente por Flor (Flor 1971) que visa impedir o crescimento de patógenos no início da infecção (Miller *et al.* 2017) .



**Figura 4. Modelo ilustrativo do sistema imune da planta:** Inicialmente as plantas detectam, através dos PRRs, os PAMPs ou MAMPs (losangos em vermelho) para desencadear a imunidade desencadeada por PAMP (PTI). Em seguida, alguns patógenos conseguem suprimir a PTI, seja por implantação de efetores na planta ou de outra forma a permitir a nutrição e dispersão do patógeno, resultando em susceptibilidade desencadeada por efector (ETS). Na segunda fase um efector (indicado por círculos em rosa) é reconhecido por uma proteína específica, ativando a imunidade desencadeada por efetores (ETI). Na fase final, alguns patógenos ganham novos efetores (em azul) que permitem ao patógeno suprimir a ETI (Jones & Dangl, 2006).

A resposta de imunidade do tipo PTI ocorre pela ligação entre o domínio extracelular do receptor (PRR) com o epítipo do ligante (PAMP/MAMP) resultando em mudanças na estrutura do receptor e seguida da ativação imediata da cascata de sinalização citoplasmática pelo domínio intracelular do receptor. A medida que a planta percebe o patógeno, o influxo de íons de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) é ativado rapidamente para o interior das células, o que modifica o pH local e regula a sinalização inicial de eventos que ocorrem de segundos a minutos, como o efluxo de ânions, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a expressão de genes envolvidos com a biossíntese de peptídeos e compostos antimicrobianos (Monaghan and Zipfel 2012; Dalio *et al.* 2017).

Estas respostas são principalmente mediadas por proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs) que são co-reguladas pela cascata de sinalização por proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Os fatores de transcrição da

família WRKY também agem na regulação da ativação de genes. Respostas de defesas tardias que ocorrem horas ou dias após o contato com o patógeno, o que inclui a produção de ácido salicílico (SA), fitoalexinas e outros compostos de defesa são reguladas pelo aumento intracelular de Ca<sup>2+</sup> (Monaghan and Zipfel 2012; Dalio *et al.* 2017).

Outras respostas também podem ser observadas como o fechamento de estômatos ou a deposição de calose ou aumento de lignina na parede celular, a modulação da transcrição de genes relacionados a defesa bem como o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese – proteínas PR – como as glicanases e quitinases relacionadas com a degradação da parede celular e principalmente pela explosão oxidativa, que é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) caracterizando o processo conhecido como Resposta de Hipersensibilidade (RH - *Hypersensitive Response*) (Camejo *et al.* 2016). A RH é um processo que culmina em morte celular rápida e localizada no sítio de infecção, ativada pela planta com o intuito de conter o avanço do patógeno e impedir que ele a colonize, sendo efetiva contra patógenos biotróficos ou hemibiotróficos, capazes de crescer apenas em tecido hospedeiro vivo, mas não contra necrotróficos, os quais matam o tecido hospedeiro durante a colonização (Zurbriggen *et al.* 2010). Além disso, em vários desses processos há a formação de moléculas que potencialmente podem atuar como mensageiros secundários (SA, ROS, etileno, cálcio, etc.) em outras vias metabólicas, o que torna a resposta ainda mais complexa (Zipfel and Robatzek 2010; Monaghan and Zipfel 2012).

Pela co-evolução com seus hospedeiros, patógenos e herbívoros bem adaptados podem suprimir a ETI através de mutações em genes que codificam efetores, fazendo com que as plantas não mais os reconheça. Esse reconhecimento pode ser através da interação direta e altamente específica, entre as proteínas hospedeiro/patógeno de acordo com a teoria gene a gene (Flor 1971; Boller and Felix 2009) ou indireta, conhecida como teoria guarda (Flor 1971; Jones and Dangl 2006) no qual as proteínas R reconhecem efetores ligados a proteínas da planta. A maior evidência da teoria guarda foi encontrada no sistema R/Avr entre *Arabidopsis thaliana* e *Pseudomonas syringae* pv. tomato, onde RIN4 é modificada pela Avr da bactéria e essa modificação ativa a proteína R (RPM1) resultando na resistência da planta (Mackey *et al.* 2002).

Os patógenos apresentam uma gama de efetores diversos em sequência e função molecular. Já as proteínas R das plantas são estruturalmente conservadas e a maioria delas contém sítios de ligação a nucleotídeos (NBS – *Nucleotide Binding Site*), C-terminais formados por repetições ricas em leucina (LRR- *Leucin Rich Repeats*) e N-terminais variáveis, sendo comuns os tipos *coiled-coil* (CC) e *toll and human interleukin receptor* (TIR) ((Elmore *et al.* 2012; Gururani *et al.* 2012)

Além das classes TIR e CC existem mais seis, são elas: a eLRR que possui um domínio LRR extracelular ligado a um domínio transmembrana (TrD) (Gururani *et al.* 2012) a LRR quinase, a qual apresenta um domínio intracelular de quinases serina/treonina citoplasmáticos, um domínio extracelular LRR e um domínio transmembrana (TrD) (Afzal *et al.* 2008; Gururani *et al.* 2012). As proteínas R que possuem um domínio TrD, o qual está ligado a um domínio CC (Win *et al.* 2012) . Genes R contendo os domínios LRR, seguido pelo domínio TrD ligado ao domínio PEST 16 (prolina-glicina-serina-treonina) para degradação proteica, além de pequenos motivos de ECS (domínio de sinalização celular de endocitose)(Gururani *et al.* 2012); As proteínas R que contém os domínios TIR NBS-LRR, além de ter na extensão C-terminal um domínio putativo de sinal de localização nuclear (NLS) e um domínio WRKY, o qual possui uma região de 60 aminoácidos que é definida pela sequência conservada WRKYGQK na região N-terminal, associada a um motivo zinc-finger (Thomma *et al.* 2011)e os R enzimáticos, os quais não possuem nenhum dos domínios LRR e NBS conforme pode ser visto na figura 5.

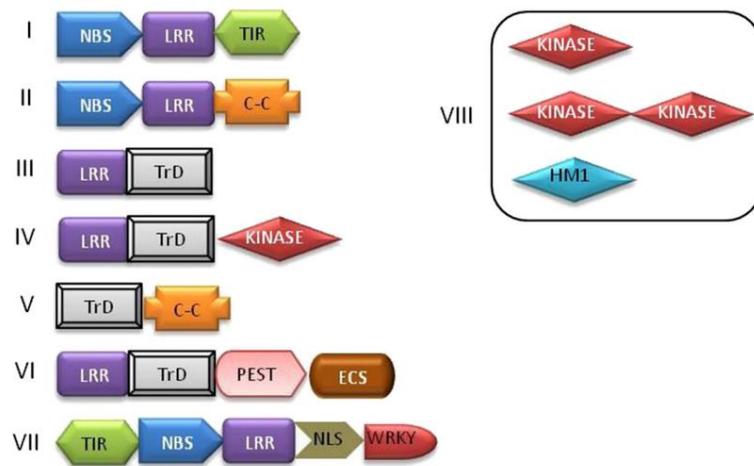


Figura 5. Principais classes de genes (R) de resistência baseado nos arranjos dos domínios funcionais. Adaptado de Win *et al.*, 2012.

Diferentes patógenos, como bactérias, fungos, oomicetos e vírus, produzem efetores para atacar diferentes plantas, que por sua vez, usam seus genes de resistência para evitar o desenvolvimento da doença. Todo o processo de reconhecimento do patógeno pelas plantas é regulado por vias de sinalização mediadas pela ação de fitohormônios, dentre eles os mais comuns são as vias do ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e Etileno (ET), esses hormônios se acumulam em resposta à infecção por patógeno resultando na ativação de genes de defesa. Outros hormônios vegetais como o ácido abscísico (ABA) e citocininas também atuam na defesa da planta e podem, ainda que parcialmente, alterar a sinalização por AS, JA ou ET. Os agentes que não causam danos expressivos à planta, como por exemplo os patógenos biotróficos, estimulam a via do SA, por outro lado aqueles que causam danos mais sérios, como os necrotróficos, estimulam as vias JA e ET, essas três vias estão interconectadas. Este *crosstalk* entre as vias ocorre como uma estratégia da planta para direcionar sua resposta contra o agressor (Pieterse *et al.* 2009, 2014).

### **1.2.1. Indução de resistência em plantas**

Quando atacadas, as plantas são capazes de aumentar sua resistência e essa condição é referida como resistência adquirida ou induzida (Pieterse *et al.* 1998, 2009). A indução de resistência em plantas pode ser separada em dois tipos: Resistência Sistêmica Adquirida do inglês *Systemic Acquired Resistance* - SAR e Resistência Sistêmica Induzida, *Induced Systemic Resistance* - ISR (Figura 6).

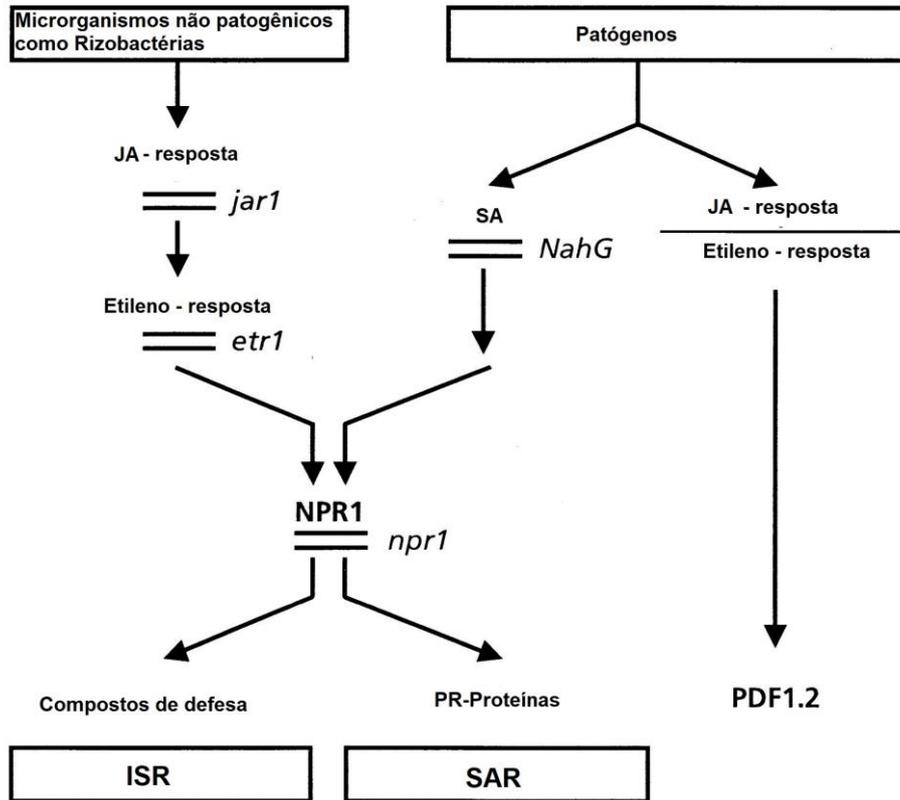


Figura 6. Rotas da resistência sistêmica adquirida (SAR) e induzida (ISR) ativadas por microrganismos patogênicos e não-patogênicos em plantas através das moléculas sinalizadoras ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET). Modificado de Pieterse et al., 1998.

SAR pode ser desencadeada após uma infecção local ou em diferentes pontos, estendendo-se para partes da planta distante do local de infecção, podendo ser induzida por patógenos e por outras moléculas químicas (Pieterse *et al.* 2009; Walters *et al.* 2013). A indução da SAR é acompanhada pela produção e acúmulo local e/ou sistêmico do ácido salicílico (SA) e que ativam genes relacionados à patogênese (PR-genes) que por sua vez, se expressam através da síntese de proteínas relacionadas à patogênese ou PR-proteínas (Van Loon and Van Strien 1999; Vlot *et al.* 2009).

Ao contrário da SAR, a resistência sistêmica induzida (ISR) é ativada por microrganismos não-fitopatogênicos como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) (Pieterse *et al.* 2005) e fungos benéficos à planta (Lamdan *et al.* 2015). Nesta indução não há a produção de proteínas relacionadas a patogênese, nem fitoalexinas, sendo sinalizada pelos ácidos jasmônicos e etileno (Harman *et al.* 2004; Pieterse *et al.* 2014).

Os fungos simbiotes do gênero *Trichoderma*, indutores de resposta de defesa em plantas hospedeiras, quando interage com a planta hospedeira leva a resistência sistêmica induzida por *Trichoderma do inglês Trichoderma-induced systemic resistance* (TISR). Estudos de expressão com genes marcadores ligados as principais vias de defesa TISR envolve a ativação direta das vias SA e JA, simultaneamente (Salas-Marina *et al.* 2011; Mathys *et al.* 2012; Morán-Diez *et al.* 2012). Um estudo posterior demonstrou que *T. harzianum* induz proteção contra a infecção provocada por *B. cinerea* em tomateiro e que a TISR induzida nesta interação é dependente dos fitohormônios JA, SA e ABA. E que o priming induzido por *Trichoderma* na planta é baseado na explosão de respostas dependente de JA (Martínez-Medina *et al.* 2013).

A manutenção das atividades imunes constitutivas seria prejudicial ao hospedeiro (Heidel *et al.* 2004), pois essa manutenção provoca a alocação de recursos para a defesa em detrimento aos demais processos biológicos da planta. Para resolver isso, as plantas mantêm uma ``memória imunológica`` através de um processo chamado *priming*, no qual a planta, basicamente, fica em um estado de alerta. A resistência sistêmica induzida envolve o processo de *priming* resultando em um estado sensibilizado que permite que as células respondam rápido e com maior amplitude a ataques de patógenos (Fu and Dong 2013). Estudos recentes mostraram que uma vez induzido a memória imunológica desencadeada pela SAR pode durar não apenas semanas ou meses, mas pode ser transmitida às gerações subsequentes e que tanto o contato com microrganismos benéficos, simbiotes, como o tratamento de plantas com vários compostos naturais e sintéticos podem ativá-lo (Beckers and Conrath 2007).

### **1.2.2. Proteínas relacionada à patogênese ou PR-proteínas**

As proteínas de defesa de plantas que são induzidas após infecções por agentes patogênicos e/ou estresse abiótico são conhecidas como proteínas relacionadas à patogênese ou proteínas PRs. Elas conferem resistência tanto local quanto sistêmica em respostas a patógenos, após o reconhecimento dos elicitores por receptores de planta (van Loon and Loon 1997; Van Loon and Van Strien 1999).

Entre essas proteínas podemos citar algumas hidrolases, inibidores de protease, proteínas de reserva como a osmotina em tabaco, dentre outras como pode ser visto na tabela 1. Até recentemente as proteínas eram classificadas em 17 famílias, variando de PR-1 até PR-17 de acordo com as características de cada proteína, conforme descrita por Christensen et al. (2002), recentemente foram identificadas mais duas famílias PR-18, é uma carboidrato oxidase induzida por fungo ou AS purificada de girassol, ela melhora a resistência de plantas transgênicas de tabaco contra a infecção causada por bactéria (Custers et al., 2004), e a PR-19 identificada em *Pinus sylvestris* L. (Sooriyaarachchi et al., 2011) com atividade antimicrobiana, a proteína se liga as glucanas da parede celular fúngica, alterando-a, prejudicando assim o crescimento da hifas. As PR proteínas e suas propriedades estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Famílias de proteínas relacionadas à patogênese e suas propriedades

Famílias	Membro Padrão	Propriedades
PR-1	Tabaco PR-1 <sup>a</sup>	Antifúngica
PR-2	Tabaco PR-2	$\beta$ -1,3-glucanase
PR-3	Tabaco P, Q	Quitinase I, II, IV -VII
PR-4	Tabaco `R`	Quitinase I e II
PR-5	Tabaco S	Osmotina
PR-6	Tomate inibidor I	Inibidores de protease
PR-7	Tomate P <sub>69</sub>	Endoproteinases
PR-8	Pepino quitinase	Quitinase III
PR-9	Tabaco ``lignin-forming peroxidase``	Peroxidases
PR-10	Salsa PR-1	Proteínas semelhantes a ribonuclease
PR-11	Tabaco ``classe V`` quitinase	Quitinase V
PR-12	Rabanete Rs-AFP3	Defensinas
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Tioninas
PR-14	Cevada LTP4	Proteína de transferência de lipídeo
PR-15	Cevada OxOa (Germin)	Oxalato oxidase
PR-16	Cevada OxOLP	Proteínas semelhantes a oxalato oxidase
PR-17	Tabaco PRp27	Desconhecida
PR-18	Girassol	antibacteriana
PR-19	Pinheiro silvestre	antimicrobiana

As PR-proteínas agem direta e indiretamente na resistência de plantas contra microrganismos patogênicos. Como forma direta podemos citar a inibição do crescimento do patógeno ou da germinação de esporos (PR-1). Isoformas básicas de PRPs normalmente exercem maior atividade antifúngica, apresentando ação reduzida contra bactérias, insetos, nematóides ou vírus. Em sua maioria, PRPs possuem uma maior importância na ação indireta, ou seja, no processo de indução de resistência, como por exemplo, na ação preventiva contra penetração de patógenos, por ação

oxidativa de componentes da parede celular vegetal por meio de peroxidases (PR-9), ou envolvimento na transdução de sinais durante a interação patógeno-hospedeiro, como na ação de oxalato oxidases (PR-15) e de proteínas não específicas relacionadas com o transporte de lipídios (PR-14).

Um número pequeno de famílias das PRPs possui atividade enzimática como é o observado para glucanases (PR-2), quitinases (PR-3, PR-8, PR-11), peroxidases (PR-9), ribonucleases (PR-10) e (PR-4), ou ação inibitória pela atividade de inibidores enzimáticos (PR-6). A atividade inibitória de proteases e  $\alpha$ -amilases é atribuída às famílias PR-5, PR-12 e PR-14. Muitas das funções dessas proteínas ainda são discutidas como a multifuncionalidade dos inibidores de protease de plantas (Stangarlin *et al.* 2010).

O aumento na expressão dos genes que codificam essas proteínas já foi observado por vários autores em estudos de patossistemas mostrando que elas estão relacionadas com a indução de defesa e aumento da resistência. Espécies de fungo do gênero *Trichoderma* são capazes de induzir a síntese dessas proteínas. *T. atroviride* ativa a resistência sistêmica e a expressão local de genes relacionados a defesa sinalizada pelos hormônios AS e JA/ET, dentre elas as PR-1 e PR-2, em *Arabidopsis* contra *P. syringae* pv *tomato* (Salas-Marina *et al.* 2011). *T. harzianum* induz uma maior expressão dos genes  $\beta$ -1,3-glucanase, quitinase e peroxidase em raízes de feijoeiro confrontado com o patógeno *R. solani*, evidenciando o papel delas na indução da resposta de defesa contra *R. solani* (Pereira *et al.* 2014).

### **1.2.3.Sinalização por MAPK kinases**

A interação planta-patógeno inicia uma resposta de defesa e gera sinais que são traduzidos em respostas celulares através de muitas rotas interligadas, sendo a cascata de MAPKs (*mitogen-activated protein Kinases*) uma delas (Zhang and Klessig 2001; Meng and Zhang 2013).

A ativação da cascata MAPK é um dos eventos de sinalização mais precoce após a percepção do patógeno pela planta. De uma forma geral, cada cascata consiste de pelo menos três proteínas quinases, que intermedeiam reações sequenciais de fosforilação, a

MAPK é ativada por fosforilação nos resíduos de treonina e tirosina pela quinase anterior MAPK Kinase (MAPKK), que por sua vez, é ativada pela quinase anterior MAPKK Kinase (MAPKKK), sendo então ativada por uma proteína G, mas em alguns casos pode ocorrer por uma MAPKKK kinase (MAPKKKK), por outro lado todas essas proteínas quinases são inativadas por fosfatases (Meng and Zhang 2013).

Existem múltiplos membros de cada um desses 3 tipos de MAPK quinases na célula, que contribuem para uma via de sinalização específica. Considerando o genoma de *Arabidopsis* existem 29 MAPKs, 10 MAPKKs e aproximadamente 60 diferentes MAPKKKs já identificadas e especula-se que esse número seja aproximadamente o mesmo para outras espécies de plantas, uma vez que um repertório similar foi encontrado em arroz e *populus* (Hamel *et. al.* 2006).

Algumas MAPKs são conhecidas como a SIPK (salicylic acid induced protein kinase), WIPK (wounding-induced protein kinase), SIMK (salt stress-induced MAP kinase) e SAMK (stress-activated MAP kinase). WIPK é ativado em resposta a proteína bacteriana AVR<sub>PtoB</sub> durante a infecção por *Pseudomonas syringae*, e que WIPK é uma das MAPK chave na regulação da resistência a doença (Ekengren *et al.* 2003).

A ativação das MAPKs ocorre após o reconhecimento de algumas PRRs pelos PAMPs como as PRRs Flg22 e elf18 que podem desencadear uma ativação forte, embora transitória, de MAPKs em *Arabidopsis*, incluindo as MPK3, MPK6, MPK4 e MPK11. Além disso a ativação ocorre também por efetores, como o Avr9 de fungo que ativa SIPK e WIPK em células de tabaco transgênico que expressa o gene de resistência Cf-9 (Roux *et al.* 2011).

Um dos principais alvos dos efetores de patógenos é a cascata MAPK de plantas, provavelmente porque eles tem um papel central na imunidade de plantas. Os efetores de patógenos podem suprimir a sinalização MAPK inativando componentes *upstream* da sinalização. Os efetores de *P. Syringae* Avr<sub>Pto</sub> e Avr<sub>PtoB</sub> agem diretamente nos receptores FLS2, EFR e CEERK1 (PAMPs ) bloqueando a PTI (Xiang *et al.* 2008; Gimenez-Ibanez *et al.* 2009)

A identificação de MAPkinases, dos seus diferentes substratos e reguladores negativos e todos os componentes desta cascata ajudará a compreender a complexa via de MAPkinase nas plantas e, uma vez que, os componentes da cascata de MAPkinases

estão relacionados na percepção de diferentes patógenos e na consequente ativação de mecanismos de defesa a identificação desses componentes poderá contribuir para a obtenção de plantas geneticamente modificadas expressando estes genes constitutivamente, gerando plantas mais resistentes à doenças.

#### **1.2.4. Efeitores - a Suscetibilidade Desencadeada por Efeitores (ETS)**

Até recentemente, muito pouco se sabia sobre a biologia dos efetores e principalmente sobre as bases moleculares da interação planta-patógeno. As informações geradas com o avanço de técnicas moleculares e sequenciamento têm contribuído para o entendimento das estratégias de infecção dos patógenos e mecanismos de defesa das plantas. Inicialmente, foram elucidadas as funções bioquímicas de algumas moléculas efetoras de bactérias. Posteriormente, o conceito de efetores foi extrapolado de bactérias patogênicas para fungos, oomicetos e nematoides, que também tiveram a função bioquímica de alguns de seus efetores elucidada e finalmente, com métodos computacionais e bioinformática baseados em sequenciamento de genomas, tem sido possível prever candidatos a efetores em uma imensa gama de microrganismos (Guzmán-Guzmán *et al.* 2017) Estas informações em conjunto levaram a comunidade científica a aceitar os efetores como fatores essenciais para a compreensão dos processos em qualquer interação planta-patógeno.

Os efetores são classificados como moléculas que suprimem a defesa das plantas (Kamoun 2006), mas essa definição não é correta porque, segundo estudos mais recentes, alguns efetores apresentam dualidade em sua função dependendo do hospedeiro, ou seja, podem ser relacionados tanto com a patogenicidade quanto com a ativação de resistência. Por isso, de um modo geral, efetores podem ser definidos como moléculas liberadas ou associadas a um organismo capazes de modificar a estrutura celular e/ou função do outro organismo (Plett *et al.* 2011, 2014; Plett and Martin 2012).

Os efetores são divididos em apoplásticos e citoplasmáticos em função do local de atuação. Os efetores secretados pelos patógenos durante a infecção podem se acumular na superfície exposta da célula ou nos espaços intercelulares, sendo classificados como efetores apoplásticos. Por sua vez, os efetores intracelulares ou

citoplasmáticos são os que podem se translocar através da membrana celular e ter contato direto com compartimentos subcelulares ou organelas (Kamoun 2006; Block *et al.* 2010) (kamoun 2006; (Block *et al.* 2010).

Muitos dos efetores citoplasmáticos já descritos são caracterizados pela presença de um motivo de translocação específico o qual permite que eles possam entrar na célula, como os motivos RXLR (arginina, um aminoácido qualquer, leucina e arginina) ou um motivo do tipo RXLR - RXLX-like (Dou *et al.* 2008; Plett *et al.* 2011). Alguns trabalhos já demonstraram a efetividade desses motivos RXLR na translocação de proteínas (Dou *et al.* 2008; Plett *et al.* 2014; Guzmán-Guzmán *et al.* 2017).

O motivo de translocação RXLX da proteína pHRPII de *Plasmodium falciparum* é suficiente para translocar essas proteínas para o interior das células sanguíneas ou ainda o motivo RXLX da proteína Avr1B de *Phytophthora sojae* que permite a translocação de uma proteína fluorescente para o interior das células radiculares de soja. O AVR3a suprime a morte celular induzida pela elicítina INF-1, também secretada por *Phytophthora infestans*. Resumidamente, INF-1 teria características de um PAMP que induziria a morte celular. Entretanto, o AVR3a suprime a ação deste PAMP, contribuindo para a virulência do patógeno (Bos *et al.*, 2009). Uma lista mais completa de candidatos a efetores encontra-se no material suplementar de Guzman e colaboradores (Guzmán-Guzmán *et al.* 2017).

Anteriormente a essa lista de efetores, Göhre and Robatzek (2008) mostraram algumas atividades típicas dos efetores na inibição da defesa ou inibição do reconhecimento da infecção pela planta como a inibição de enzimas (hidrolases) no apoplasto, inibição de ativação de PRRs, inibição de cascatas de sinalização mediadas por MAP-quinases, modificação do transcriptoma relacionado a respostas de defesa, reprogramação transcricional, degradação de componentes/proteínas relacionadas à defesa e interferência na secreção de proteínas e tráfego vesicular.

Vários PAMPs/MAMPs estão comprovadamente envolvidos nas relações de reconhecimentos entre plantas e microrganismos (Newman *et al.* 2013). Por outro lado, há poucos estudos sobre proteínas efectoras. Recentemente Guzman *et al.* (Guzmán-Guzmán *et al.* 2017) apresentou uma lista de genes de prováveis efetores que possam ter algum papel na interação planta-fungo e mostrou que o efector putativo de *Trichoderma*, a proteína Hidrofobina 2 TVHYDII 1, atua na colonização das raízes da planta

hospedeira pelo fungo e participa da sua atividade antagonística contra *Rhizoctonia solani*.

O entendimento e a manipulação de componentes chave envolvidos em mecanismos de defesa das plantas, como PAMPs, PRRs, efetores e genes de resistência, podem levar ao desenvolvimento de novas estratégias para o controle de doenças de plantas (Raffaele and Kamoun, 2012).

### **1.3. INDUÇÃO DE DEFESA E RESISTÊNCIA EM PLANTA HOSPEDEIRA POR TRICHODERMA SPP.**

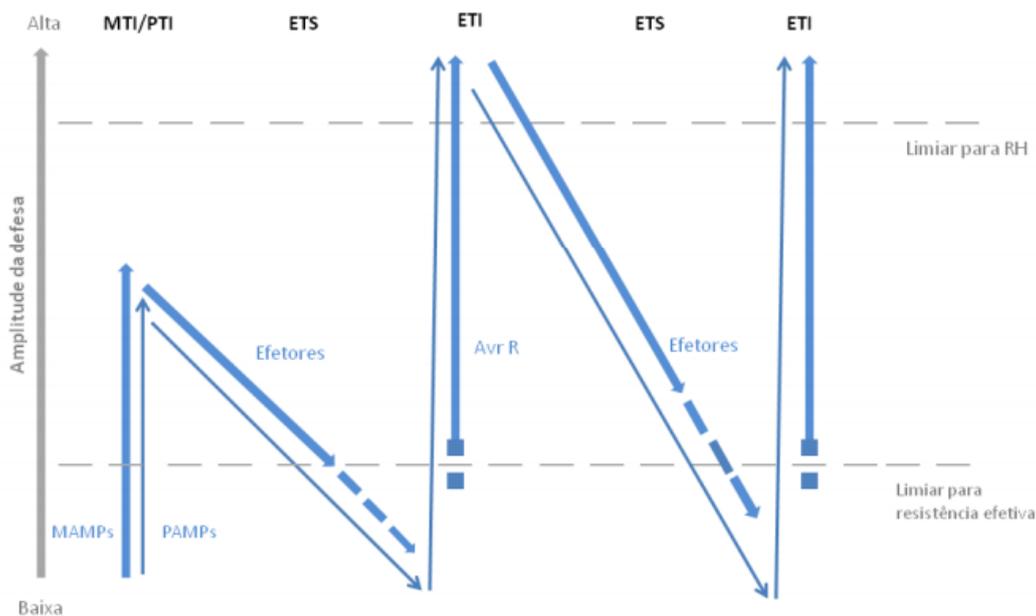
O gênero *Trichoderma* (teleomorfo: *Hypocrea*) é composto por fungos de vida livre, habitantes cosmopolitas de solo, mas que também podem colonizar rizosfera, superfície e interior de tecidos vegetais sem causar doenças, sendo por isso considerados simbiossiontes oportunistas avirulentos (Harman *et al.* 2004). Estes fungos têm como características morfológicas o micélio, inicialmente de coloração branca, com crescimento rápido e uniforme, que com o desenvolvimento formam um “ tapete ” que variam do amarelo até verde escuro dependendo da espécie (Melo, 1991).

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 (Djonovic *et al.* 2007; Pereira *et al.* 2014b; Lamdan *et al.* 2015).

Trabalhos mais recentes buscando o entendimento da interação *Trichoderma spp./planta hospedeira* têm demonstrado que algumas linhagens de *Trichoderma* quando em íntima associação com plantas hospedeiras são capazes de produzir e liberar compostos elicitores de defesa que podem desencadear sua resposta de defesa e, desta forma, induzir resistência local e sistêmica na planta contra subsequentes infecções fúngicas (Hermosa *et al.* 2012; Pereira *et al.* 2014b; Lamdan *et al.* 2015). Algumas espécies de *Trichoderma*, *T. asperellum*, *T. harzianum* e *T. virens* são rizocompetentes, podem manter relação simbiótica com plantas hospedeiras (Viterbo *et al.* 2004; Djonović *et al.* 2006; Pereira *et al.* 2014). Como consequência dessa relação, esses fungos 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 (Lorito *et al.* 2010; Nawrocka and Mallolepsza 2013).

Essas espécies de *Trichoderma* 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 7). Por fim, *Trichoderma* spp. podem também melhorar ETI causando uma rápida resposta (*priming*) ou ativá-la, 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 7.** Mudanças na amplitude da defesa vegetal contra patógenos causados por espécies de *Trichoderma* como indicado pelo modelo criado por Jones and Dangl (setas azuis). 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, mantendo a resposta da planta em um nível acima ou apenas abaixo do limiar eficaz (ETS). *Trichoderma* spp. também aumentam a ETI levando a 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.

A primeira demonstração clara de indução de resposta de defesa e resistência a doenças em plantas usando fungos do gênero *Trichoderma* foi publicada em 1997 por Bigirimana e colaboradores. Neste trabalho foi mostrado que uma linhagem de *T. harzianum* reduziu a incidência da doença causada pelo patógeno *Colletotrichum lindemuthianum* nas folhas de feijoeiro comum. De lá pra cá muitos trabalhos similares foram desenvolvidos utilizando diferentes espécies e linhagens de *Trichoderma* com plantas mono e dicotiledôneas no intuito de entender o mecanismo e as moléculas envolvidas nessa interação.

Recentemente, Pereira *et al.* (2014), mostrou que o isolado de *T. harzianum* ALL 42 foi capaz de promover crescimento e modular o metabolismo e a resposta de defesa de *P. vulgaris* na presença e ausência de dois fungos fitopatogênicos, *Rizoctonia solani* e *Fusarium solani*. Lamdant *et al.* (2015) mostrou que durante a interação com milho, *T. virens* foi capaz de induzir resposta sistêmica na planta hospedeira contra o patógeno *Colchliobolus heterostrophus*.

O mecanismo molecular e bioquímico que o *Trichoderma* usa para estabelecer as interações benéficas ainda não foi totalmente esclarecida. Entretanto, sabe-se que as proteínas secretadas no meio têm um papel central no diálogo molecular entre fungos e as plantas hospedeiras. O que mostra a importância de se identificar e conhecer a biologia dessas proteínas. Os estudos recentes têm focado na identificação dessas proteínas e em seu papel na interação *Trichoderma*/Planta hospedeira. A colonização da planta hospedeira por *Trichoderma* envolve a capacidade de reconhecer e se aderir as raízes, penetrar na planta, e metabólitos tóxicos produzidos pela planta em resposta a sua invasão.

Um grupo de proteínas secretadas que vem sendo estudado é a família Ceratoplataninas, pequenas proteínas extracelulares que apresentam resíduos conservados de cisteínas (Scala *et al.* 2004). Ainda em 2006 Djonovic e colaboradores (2006) identificaram, purificaram e caracterizaram uma pequena proteína elicitora de defesa secretada por *T. virens*. A análise da sequência de aminoácidos predita dessa proteína revelou que a esta apresenta grande similaridade com proteínas da família das ceratoplataninas. A presença de SM 1 aumentou a expressão dos genes da planta hospedeira quitinase, *hidroximetil glutaril CoA redutase*,  $\beta$ -1,3-glucanase, peroxidase, e lipoxigenase que codificam proteínas relacionadas com a defesa.

Um trabalho recente usando um isolado mutante de *T. harzianum*, deleção do gene Epl-1 que codifica um tipo de ceratoplatanina, mostraram que esta proteína está envolvida com micoparasitismo de *S. sclerotiorum*, modulação da expressão de genes de defesa de feijoeiro além do reconhecimento do fungo como simbiote pela planta (Gomes *et al.* 2015) Corroborando com este trabalho, Lamdan *et al.* (2015) mostraram que essas proteínas secretadas durante a interação de *T. virens* com raízes de milho e o patógeno *Cochliobolusheteostrophus* estão envolvidas com a indução de resistência sistêmica.

Neste grupo de pequenas proteínas secretadas de Trichoderma também se encontram as hidrofobinas responsáveis pela aderência do fungo à superfície radicular das plantas e uma proteína tipo expansina, que é capaz de modificar a arquitetura da parede da célula da planta, facilitando a colonização das raízes. Alguns autores mostraram que a Classe I de hidrofobinas produzida por *T. asperellum* descrita por estar relacionada com resposta de defesa e indução de resistência na planta (Viterbo and Chet 2006) assim como as *Swollenins*, uma proteína do tipo expansina com domínio ligante de celulose, são capazes de estimular resposta de defesa local em raízes e folhas de abóbora contra *Botrytis cinerea* e *Pseudomonas syringae* (Brotman *et al.* 2008).

#### **1.4. O USO DA PROTEÔMICA NO ESTUDO DA INTERAÇÃO PLANTA-TRICHODERMA-PATÓGENO**

Nos últimos anos, os códigos genéticos de diversos organismos têm sido sequenciados, representando um grande avanço na área da genômica. No contexto da ``omics``, têm-se dado grande ênfase para a genômica funcional, visando a identificação da sequência e função de genes e proteínas através do transcriptoma e proteoma dos organismos (Dias *et al.*, 2007).

O proteoma é definido como o conjunto de proteínas expressas por um genoma, célula ou tecido em uma condição específica (Wilkins, 1994). Através da proteômica é possível identificar e quantificar o número de proteínas que influenciam diretamente a bioquímica celular, e prover uma análise do estado celular, ou mudanças que ocorrem durante o crescimento, desenvolvimento ou resposta a fatores ambientais, tornando-se

assim uma tecnologia útil no estudo de sistemas biológicos altamente dinâmicos e complexos.

A análise do proteoma pode fornecer importantes informações para identificar, quantificar e estudar as modificações pós-traducionais das proteínas, como fosforilação, glicosilação, acetilação entre outras e permite, ainda, avaliar os níveis de inibição e investigar a síntese diferencial de proteínas quando submetidas a duas ou mais condições fisiológicas diferentes, e assim identificar proteínas envolvidas em vias de sinalização e de defesa de plantas contra vários tipos de estresses, contribuindo assim para o entendimento integrado do funcionamento celular (Park, 2004).

Com a disponibilidade de genoma de fungos filamentosos em banco de dados e o desenvolvimento de novas técnicas de extração e separação de proteínas, combinada com avanços na espectrometria de massas (MS), vem aumentando o conhecimento sobre a expressão diferencial de proteínas de fungos filamentosos com relevância biotecnológica, em relação às variáveis ambientais (Gómez-Mendoza *et al.* 2014) bem como o número de trabalhos que fazem uso da proteômica para estudar a interação entre *Trichoderma* spp., fungos fitopatogênicos e uma planta hospedeira visando identificar proteínas relacionadas ao estresse, micoparasitismo ou com indução de defesa e resistência na planta (Pereira *et al.* 2014b; Steindorff *et al.* 2014; Ramada *et al.* 2016).

Ainda em 2006, Marra e colaboradores (Marra *et al.* 2006) analisaram o proteoma da interação *T. atroviride*/*P. vulgaris*/*B. cinerea* e *R. solani* visando identificar proteínas relacionadas à patogênese ou possíveis genes de resistência expressos durante a interação através da técnica de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas.

Posteriormente Pereira *et al.* (2014), também, utilizando a técnica gel bidimensional associada a espectrometria de massas utilizando o analisador MALDI-TOF conseguiu mapear proteínas com a abundância diferencial envolvidas com indução de defesa mostrando que o isolado de *T. harzianum* ALL 42 foi capaz de modular a resposta de *P. vulgaris* quando na presença de dois fungos fitopatogênicos, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani*.

Até recentemente não havia trabalhos com as três vias de interação, *Trichoderma*/Planta/Patógeno utilizando técnicas proteômicas mais sensíveis como a LC-MS/MS para analisar as proteínas secretadas com papel na indução de defesa e resistência em planta hospedeira, porém em 2015, Lamdan *et al.* identificou um total de

66 proteínas fúngicas mostrando diferenças significativas na abundância nas condições de *T. virens* crescido na presença e na ausência de milho. E ainda foi possível analisar o papel de 4 proteínas do tipo SSCPs. Por nocaute, foi mostrado que essas SSCPs aparentemente agem como efetor negativo reduzindo os níveis de defesa em plantas e podem ter um papel importante na indução de resistência sistêmica de *Trichoderma*.

Alguns trabalhos têm focado na análise de uma fração do proteoma total do organismo, o sub-proteoma ou secretoma, foi definido como sendo 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 destas proteínas (Tjalsma *et al.*, 2000).

A análise do secretoma de *Trichoderma sp* e outros Ascomycetes tem sido abordada por diversos pesquisadores no mundo inteiro (Medina *et al.* 2004), analisando as proteínas secretadas diferencialmente expressas por *Aspergillus flavus*, quando crescido em diferentes fontes de carbono (glicose, batata dextrose e rutina) identificou proteínas comuns aos três meios, como proteases alcalinas,  $\beta$  1-3 endoglucanases, glucoamilase, aminopeptidase e  $\beta$ -glicosidases, entre outras. O secretoma de *T. harzianum* crescido na presença de parede celular de *Botrytis cinerea* foi analisado e evidenciou a secreção de algumas proteínas que degradam parede celular como quitinases,  $\beta$ -1,3(6)-glicanases, proteases (Yang *et al.* 2009).

A análise do secretoma do fungo *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivado em diferentes meios suplementados com parede celular de *Fusarium solani* permitiu a identificação de um total de 94 proteínas de 105 proteínas retirados de mapas 2-DE. A única proteína observada em todas as condições foi EPL1. Nos meios suplementados com parede celular de *F. solani*, foram identificadas diferentes hidrolases tais como quitinases,  $\beta$ -1,3-glicanases, glucoamilases,  $\alpha$ -1,3- glucanases e proteases, juntamente com outras proteínas com funções não conhecidas no micoparasitismo, como NPP1 e cys (Ramada *et al.* 2016)

Esses estudos pioneiros de interação *Trichoderma*/ planta hospedeira e/ou fungo fitopatogênico têm contribuído para um maior entendimento do mecanismo molecular e bioquímico envolvido nessa interação, porém, ainda faltam muitas informações como principais classes de proteínas e seus papéis na interação e a regulação das proteínas que são chaves de algumas vias de defesa, que ajudarão a elucidar o mecanismo de interação

*Trichoderma*/Planta/Patógeno como as principais classes de proteínas envolvidas, a regulação das proteínas que são chaves de algumas vias de defesa.

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi analisar por abordagem proteômica a interação entre o fungo *Trichoderma asperellum* TR 356 e feijoeiro comum, *Phaseolus vulgaris*, na ausência e presença do fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*.

### **2.2.Objetivos específicos**

- Mapear e identificar proteínas secretadas por *T. asperellum* TR 356 quando em associação com *P. vulgaris*;
- Observar a resposta de defesa de feijoeiro comum à presença do patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* e do antagonista *T. asperellum* 356;
- Identificar proteínas intracelulares relacionados a respostas de defesa em folhas de feijoeiro cultivado na presença de *Sclerotinia sclerotiorum* ou *T. asperellum* 356 ou ambos os fungos;
- Mapear e identificar proteínas intracelulares com abundância diferencial em folhas de feijoeiro quando crescido com *Sclerotinia sclerotiorum* ou *T. asperellum* 356 ou ambos os fungos;
- Identificar os principais grupos funcionais do total de proteínas identificadas em feijoeiro comum devido a presença dos fungos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Para cumprir os objetivos deste trabalho ele foi dividido em duas partes no qual a primeira foi a análise do secretoma da interação *T. asperellum* TR 356 e feijoeiro comum em sistema adaptado de hidroponia e a segunda análise do proteoma de folhas de feijoeiro comum em interação com *T. asperellum* TR 356 e *S. sclerotiorum* cultivados em solo.

#### **3.1. Análise do secretoma da interação *T. asperellum* TR 356 e *Phaseolus vulgaris***

##### **3.1.1. Microrganismo utilizado**

O fungo *T. asperellum* TR 356 utilizado como modelo neste trabalho foi isolado de amostras de solo Cerrado na região de Formosa, Góias, Brasil identificado por métodos morfométricos e moleculares, com base na sequência dos marcadores ITS1 e 2 e Tef1 (Lopes et al., 2012) e gentilmente cedido pela curadora Doutora Adriane Wendland da coleção de fungos e microrganismos funcionais da EMBRAPA arroz e feijão – GO. Os estoques são mantidos a -80 ° C em glicerol 20 % (v/v). Para uso estes são repicados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) 2 % e mantidos a 4°C.

Este isolado foi utilizado como modelo levando em consideração estudos prévios de confronto deste com fungos fitopatogênicos. Este isolado inibiu o crescimento do fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum*, e reduziu os sintomas de mofo branco em feijoeiro em testes de campo (Lobo Jr, 2002). Além disto, demonstramos que este isolado modula a expressão de genes de defesa de feijoeiro em estudos de interação, indicando seu potencial em alterar a resposta de defesa de planta hospedeira. O genoma de *T. asperellum* TR 356 já foi sequenciado, montado e está disponível no endereço: <http://genome.jgi.doe.gov/Triasp1/Triasp1.home.html>, Joint Genome Institute (JGI), Califórnia.

### **3.1.2. Crescimento do fungo e obtenção dos esporos**

Uma amostra do estoque de *T. asperellum* TR 356 foi inoculada em meio BDA que foi incubado à temperatura ambiente. Após sete dias de cultivo, cinco discos desta cultura foram coletados e inoculados em frascos de 250 mL autoclavados contendo 50 g de arroz parboilizado hidratado com 25 mL de água destilada. Os frascos inoculados foram incubados à 28° C. Após os 7 dias de incubação, o arroz foi lavado com 100 mL de água destilada autoclavada para a obtenção dos esporos, a suspensão de esporos obtida foi então utilizada nos experimentos de interação *Trichoderma*/feijoeiro comum.

### **3.1.3. Bioensaio de interação *Trichoderma*/feijoeiro comum em um sistema adaptado de hidroponia**

Sementes de feijoeiro comum, cultivar Perola, suscetível ao mofo-branco, foram cedidas pela CNPAF, EMBRAPA arroz e feijão – GO. Para a realização dos bioensaios, as sementes foram esterilizadas superficialmente conforme descrito por Pereira et al., (2014). Brevemente, as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 1 % de cloro ativo por sete minutos, seguida de três lavagens, de um minuto, com água autoclavada. Após a assepsia, as sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri de vidro contendo meio Ágar-glicose a 2 % (m/v). As sementes foram mantidas em câmara de germinação (modelo TECHNICAL 4013) a 28 °C com fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de escuro, durante três dias.

Após a germinação das sementes, estas foram transferidas para frascos de vidro de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultura Murashige and Skoog (MS) preparado conforme as instruções do fabricante. Ao todo foram utilizados 60 frascos contendo as plantas que foram organizados em 2 grupos de tratamentos diferentes, constituindo as 2 das 3 condições para posterior análise: Condição co-cultivo (CC) na qual a planta foi crescida na presença do fungo *T. asperellum* TR 356; condição planta (CP), planta foi crescida sozinha. Após três dias de crescimento, o meio MS líquido de todos os frascos foi trocado por meio MS fresco acrescido de 0,05 % de sacarose, para o tratamento CC ao meio foram inoculados esporos de *T. asperellum* (concentração final de 10<sup>7</sup>/mL). O mesmo procedimento foi seguido para CP, sem o passo da inoculação das plantas com

os esporos do fungo. Na terceira condição denominada CF, o fungo foi crescido na ausência de feijoeiro, 30 frascos contendo apenas 50 mL de meio MS fresco foram inoculados com os esporos de *T. asperellum* (concentração final de  $10^7$ /mL). Todos os frascos foram incubados a 28 °C com 16h de fotoperíodo.

Após 48 horas de crescimento o conteúdo de cada dez frascos foi coletado e reunido, desta forma, para cada tratamento foram obtidas três amostras compostas, correspondentes a 10 frascos de cultivo. As amostras compostas foram consideradas as réplicas biológicas de cada tratamento e utilizadas posteriormente na análise proteômica. Esse tempo de coleta foi determinado com base em análises anteriores do aumento na expressão de genes de defesa de feijoeiro quando na presença do isolado *T. asperellum* TR 356 e no secretoma da interação de feijoeiro com *T. harzianum* (Dados não publicados) e com base na literatura (Yang *et al.*, 2009; Coppola *et al.*, 2013).

#### **3.1.4. Preparo da amostra para análise em NanoUPLC-MS<sup>E</sup>**

As amostras compostas acima mencionadas foram filtradas em membrana de éster celulose 0.22 µM GS (Millipore) e os filtrados contendo o conjunto de proteínas secretadas foi nomeado de secretoma da condição cocultivo (SCC), secretoma da condição fungo (SCF) e secretoma da condição planta (SCP). Os secretomas foram precipitados com uma solução de ácido tricloroacético (TCA) /acetona, 10 % (v/v) contendo 2 mercaptoetanol 0.07% (v/v) como descrito por Lakshman *et al.* (Lakshman *et al.* 2008) e seco em speed vac por 30 minutos. Posteriormente, os secretomas foram ressuspensos com 1 mL de bicarbonato de amônio 100 mM pH 8.0, para otimizar a solubilização das proteínas na solução de bicarbonato, os secretomas foram sonicados até a amostra está completamente solubilizada.

A concentração de proteína nos secretomas foi determinada utilizando o reagente Quick Start Bradford TM (Biorad), conforme instruções do fabricante. Foram adicionados 10 µL de bicarbonato de amônio 50 mM para cada alíquota de 50 µL das amostras em concentração  $2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  e, em seguida, foram adicionados 25 µL de RapiGEST™ (0.2 % v/v). Os microtubos foram homogeneizados com auxílio de vortex e incubados em banho seco a 80°C por 15 minutos. Após uma centrifugação rápida

("short spin") para recolher o líquido evaporado, foram adicionados 2,5  $\mu\text{L}$  de DTT 100 mM a cada microtubo, sendo estes novamente homogeneizados em vortex e incubados a 60°C por 30 minutos. Após a incubação, as amostras foram mais uma vez centrifugadas rapidamente, recebendo dessa vez 2,5  $\mu\text{L}$  de iodoacetamida 300 mM, homogeneizadas e incubadas no escuro em temperatura ambiente por 30 minutos. Logo após, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de tripsina (previamente preparada pela adição de 400  $\mu\text{L}$  de bicarbonato de amônio 50 mM para cada vial contendo 20  $\mu\text{g}$  tripsina Promega, resultando numa concentração final 0,05  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), rapidamente homogeneizados em vortex e incubados em banho seco a 37°C *overnight* para digestão proteolítica das amostras. A fim de precipitar o surfactante, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de ácido trifluoroacético (TFA) 5%, seguindo homogeneização, incubação por 90 minutos a 37°C em banho seco e centrifugação a 10000 xg a 6°C por 30 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram recolhidos, congelados e liofilizados e posteriormente ressuspendido com 190 $\mu\text{L}$  de 20mM formato de amonio e transferidos para *vials* Waters Total Recovery (Waters, USA), onde foram acrescentados 10  $\mu\text{L}$  de Fosforilase B (Waters Massprep PHOSB standard - 1mL de acetonitrila 3% e ácido fórmico 0,1%),. A concentração de proteína final foi de 250  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  para um volume final de 200  $\mu\text{L}$ , enquanto a concentração de PHOSB correspondia a 50  $\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ .

### 3.1.5. Análise por nanoLC-MS<sup>E</sup>

Os peptídeos trípticos foram separados por cromatografia líquida em nanoescala através do nanoACQUITY™ (Waters Corp., USA). A primeira dimensão (1D) foi realizada em coluna *XBridge™* 300mm x 50mm *nanoEase™* contendo resina C18 BEH130 de partícula 5 $\mu\text{m}$ , sendo que a parte móvel A foi constituída pelo formato de amônio 20mM, e a fase móvel B à acetonitrila. Enquanto que a segunda dimensão (2D) foi realizada em pré-coluna *Symmetry C18* de partícula 5 $\mu\text{m}$ , 5mm x 300 $\mu\text{m}$  e coluna analítica de fase reversa *HSST3 C18* de partícula 1.8 $\mu\text{m}$ , 75 $\mu\text{m}$  x 150mm (Waters, USA), a fase móvel A correspondeu a ácido fórmico 0,1% em água e a fase B à ácido fórmico 0,1% em acetonitrila. Duas corridas foram realizadas: a primeira correspondeu a uma simulação 1D de 70 minutos para checar a digestão e quantificar a amostra; a segunda equivaleu a uma corrida 2D completa, utilizando 5 frações e 5 horas para ser

completada. Para a primeira corrida, 2  $\mu\text{L}$  das amostras foram inicialmente transferidas para a coluna 1D em 0,5 minuto numa taxa de fluxo de  $2\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  e 0,1% de B. Os peptídeos foram eluídos da 1D a  $2\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  e 65% da fase móvel B por 4 minutos e diluídos para a pré-coluna na 2D usando uma solução aquosa de ácido fórmico 0,1% com taxa de fluxo  $20\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  por 20,5 minutos. Os peptídeos foram separados usando um gradiente de 7-40% na fase B por 54 minutos com uma taxa de fluxo de  $500\text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$  seguido de lavagem com 85% da fase móvel B. A coluna foi então reequilibrada às condições iniciais por 10 minutos. Durante esse processo, a temperatura da coluna foi mantida a  $35^\circ\text{C}$ . O íon de referência (*lock mass*) peptídeo glu-fibrino humano (GFP) foi entregue a partir do sistema fluídico do SynaptG2 usando uma taxa de fluxo constante de  $500\text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$  a uma concentração de 320 fmol de GFP para o vaporizador de referência da fonte do *NanoLockSpray* do espectrômetro de massas.

Após a aquisição, as amostras foram quantificadas usando o método de identificação descrito abaixo e a segunda corrida utilizando 5 frações foi realizada ajustando-se a injeção do volume para uma concentração final de 500ng. As amostras foram inicialmente transferidas para a coluna 1D em 0,5 minuto a  $2\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  e 0,1% de B. Os peptídeos para a primeira fração foram eluídos da 1D a  $2\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  e 10,8% da fase móvel B por 2 minutos e diluída para a pré-coluna da 2D usando uma solução aquosa de 0,1% de ácido fórmico com uma taxa de fluxo de  $10\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  por 8,5 minutos. Os peptídeos foram separados usando um gradiente de 7-35% de fase móvel B por 37 minutos com uma taxa de fluxo  $500\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$  seguida por uma lavagem com 85% da fase móvel B por 5 minutos. A temperatura da coluna foi mantida a  $35^\circ\text{C}$ . Os peptídeos para a segunda, terceira, quarta e quinta frações foram eluídos utilizando-se 14, 16,7, 20,4 e 50% de fase móvel B, respectivamente. As condições para diluição, taxa de fluxo e análise 2D foram as mesmas utilizadas para a primeira fração. A entrega do íon de referência em todas as frações foi feita nas mesmas condições descritas anteriormente. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

Os peptídeos trípticos foram analisados em espectrômetro de massas *Synapt<sup>®</sup> G2 HDMS<sup>™</sup>* (Waters, GBR) com geometria quadrupolo híbrida/ mobilidade iônica/ aceleração ortogonal por tempo de voo (*oa-TOF*). Para todas as mensurações, o espectrômetro de massas foi operado em modo resolução com alcance típico de pelo menos 20000 FWHM (“metade do máximo da largura do total”, do inglês *full-width*

*half-maximum*). Todas as análises foram realizadas usando o modo íon-positivo do nanoelectrospray (*nanoESI+*) o analisador de tempo de voo do espectrômetro de massas foi externamente calibrado com íons GFP b+ e y+ com m/z 50 a 2000 com dados de pós-aquisição dos íons de referência corrigidos usando o íon precursor dupla-carga da GFP  $[M+ 2H]^{2+} = 785.8426$ . O vaporizador de referência foi ajustado para uma frequência de 30 segundos. Os dados de massa exata por tempo de retenção (Exact Mass Retention Time) do nanoLC-MS<sup>E</sup> (Geromanos *et al.* 2009) foram coletados em modos alternados de aquisição de baixa e alta energia. O tempo de aquisição do espectro contínuo, em cada modo, foi de 1,5 segundos com um atraso de 0,1 segundo por *interscan*. No modo MS de baixa energia, os dados foram coletados a uma energia de colisão constante de 3 eV; no modo de alta energia, a energia de colisão foi rampeada de 27 a 50 eV a cada intervalo de 1,5 segundos do espectro.

A radiofrequência aplicada ao analisador de massas do quadrupolo foi ajustada de tal maneira que os íons com m/z entre 200 e 2000 fossem eficientemente transmitidos, garantindo assim que quaisquer íons com m/z menores que 200 que fossem observados no LC-MS tivessem surgido apenas a partir de dissociações geradas na célula de colisão *TRAP T-wave* do equipamento. A mobilidade iônica foi conduzida sob controle de gás manual com taxa de fluxo do gás da armadilha de íons a 2 mL.min<sup>-1</sup>, taxa de fluxo do gás da fonte de ionização 1 mL.min<sup>-1</sup>, taxa de fluxo do gás de resfriamento 1 mL.min<sup>-1</sup>, taxa de fluxo da célula de hélio 170 mL.min<sup>-1</sup> e taxa de fluxo do gás do sistema de mobilidade iônica 80 mL.min<sup>-1</sup>.

### **3.1.6. Análise dos dados da análise LC-MS/MS e a identificação das proteínas**

Os dados de espectrometria de massa obtidos por LC-MS/MS foram processados e comparados a um banco de dados com auxílio do software ProteinLynx Global Server (PLGS) versão 2.5.2 (Waters, GBR). As identificações das proteínas foram obtidas com um algoritmo de “íon accounting” incorporado ao programa e comparado às sequências de soja com padrões de digestão Mass PREP (MPDS) UniProtKB/Swiss-Prot apenas ao banco de dados (Phosphorylase - P00489 - PHS2\_RABIT, Bovine Hemoglobin -

P02070 - HBB\_BOVIN, ADH - P00330 - ADH1\_YEAST, BSA - P02769 - ALBU\_BOVIN) e CTAG-1B (UniProtKB/Swiss-Prot – P78358 – Cancer\_testis\_1).

Identificação e pacote de dados quantitativos foram gerados com o uso de algoritmos alinhados contra uma base de dados espécie-específica. A detecção de íons, agrupamento e normalização paramétrica de escala log foram realizados em PLGS com uma licença *Expression*<sup>E</sup>. As medidas das intensidades são tipicamente ajustadas nesses componentes removendo os isótopos e reduzindo os estados de carga dos espectros que se replicam pelo experimento ao analisar os clusters de EMRT. Carboamidometilação da cisteína foi especificada como uma modificação fixa, enquanto acetilação do N-terminal, desaminação do N-terminal e da glutamina, e oxidação da metionina foram incluídas como modificações variáveis. Os componentes são agrupados com uma precisão de 10 ppm e tolerância de 0,25 minuto contra as massas dos peptídeos teóricos gerados pelo banco de dados com no mínimo 1 peptídeo. O alinhamento dos peptídeos precursores obtidos pelos dados de baixa e alta energia de colisão possui uma precisão de aproximadamente 0,05 min. Um erro de clivagem da tripsina é permitido. As tolerâncias entre os fragmentos e os precursores são determinadas automaticamente.

O critério de identificação de proteínas no banco segue a identificação de no mínimo um fragmento de íon por peptídeo, três fragmentos de íons por proteína, ao mínimo um peptídeo por proteína e a identificação permitida somente dentre 4% dos falsos positivos encontrados em uma réplica experimental.

Usando um filtro de identificação por réplicas, falsos positivos são minimizados uma vez que ruído possui natureza caótica e não tende a se replicar entre injeções. Para a quantificação e identificação das proteínas, as intensidades das massas medidas são normalizadas para a intensidade das massas identificadas dos peptídeos do padrão interno.

A identificação das proteínas foi obtida usando o algoritmo *Ion accounting* e as sequências foram comparadas contra o banco de dados das espécies *T. asperellum* TR 356 (<http://genome.jgi.doe.gov/Triasp1/Triasp1.home.html>) and *Phaseolus vulgaris* sequence database version 1.0 (<http://www.phytozome.org/commonbean.php>) para a identificação das proteínas e a plataforma LegumeIP versão 2.0 (<http://plantgrn.noble.org/LegumeIP/>). A proteína Enolase 1 de *S. cerevisiae* strain ATCC foi usada como controle positivo da técnica e identificação das proteínas

### **3.2. Análise do proteoma de folhas de feijoeiro comum em interação com *T. asperellum* TR356 e *S. sclerotiorum***

#### **3.2.1. Microrganismos**

Para a análise da interação de feijoeiro com os fungos *T. asperellum* e *S. sclerotiorum* estes foram crescidos conforme descritos no item 3.1.2. Brevemente, O isolado *T. asperellum* TR 273 com sete dias de crescimento em meio sólido BDA foi transferido para arroz parboilizado em Ellermeyers (250mL) umedecidos com água destilada e previamente autoclavados. Os frascos foram mantidos em câmara de germinação do tipo BOD a 25 °C durante sete dias. A suspensão de esporo, obtidas após a lavagem do arroz com água destilada, foram inoculadas nas sementes na concentração final de 10<sup>7</sup> esporos/mL.

O patógeno virulento *S. sclerotiorum*, também foi gentilmente cedido pela curadora Doutora Adriane Wendland da coleção de fungos e microrganismos funcionais da EMBRAPA arroz e feijão – GO. Os estoques iniciais do isolado foram mantidos a 80 ° C em glicerol 20 % (v/v) e repicado periodicamente para o meio de cultura batata-dextrose-agar (BDA) 2 % e estocados a 4 ° C no laboratório de Enzimologia, na Universidade de Brasília.

#### **3.2.2. Produção das plantas em casa de vegetação e infecção com o patógeno**

As plantas de feijão foram cultivadas em cilindros de PVC, três cilindros (25 cm de diâmetro X 60 cm de comprimento) formando uma torre (Figura 7), estas foram forradas com sacos plásticos perfurados no fundo para drenagem e preenchidas com latossolo vermelho distrófico com pH 5,5 adubado de acordo com as recomendações para a cultura. Os tratamentos foram dispostos da seguinte maneira: P - Planta (Grupo controle, no qual as plantas foram cultivadas na ausência do antagonista e do patógeno); PT - cultivada com *Trichoderma asperellum* TR 356; PSS - cultivada com *Sclerotinia sclerotiorum* e PTS - cultivada com *T. asperellum* TR 356 e *S.*

*sclerotiorum*. As sementes de feijoeiro foram desinfetadas conforme descrito anteriormente e uma parte das sementes foi embebida em uma solução  $2 \times 10^7$  esporos/mL de esporos de TR356 durante 3 minutos para formar as condições PT e PTS. Cada torre de PVC recebeu uma semente de feijoeiro embebido na solução de esporos ou não (Condição controle).

Após 35 dias de crescimento, durante o estágio fisiológico R6 (florescimento) da planta, elas foram infectadas com o patógeno. Para isso um disco de 3 mm de *S. sclerotiorum* crescida em meio de cultura BDA foi colocado sobre os folíolos de novas plantas em fase de florescimento de crescimento. Todas as plantas foram incubadas a 20°C com 12 horas de fotoperíodo em uma sala climatizada com câmara de nevoeiro, acionado por 3 segundos a cada 10 minutos, para gerar o molhamento foliar que o patógeno precisava para infectar as plantas. Após 72 horas da inoculação do patógeno as plantas foram coletadas, lavadas e estocadas à  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de proteínas totais e análises proteômicas.

### **3.2.3. Extração de proteínas totais de folhas de feijoeiro**

A extração de proteínas de cada condição (P, PSS, PT e PTS) foi realizada de acordo com Pereira et al. (2014). Utilizando cadinho e pistilo, três folhas de cada condição foram reunidas e maceradas com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó homogêneo. O material macerado foi ressuspensão em 25 mL de TCA a 10% (m/v) em acetona e contendo 0,007% (v/v) de  $\beta$ - mercaptoetanol e 1mM do inibidor de proteases PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*). As amostras foram incubadas a 4°C por 3 horas. Em seguida, foram centrifugadas a  $10.000 \times g$  por 20 minutos, e o sobrenadante descartado. Foram realizadas mais 2 a 3 lavagens com 25 mL de TCA 10% em acetona até que todo o pigmento fosse removido dos tecidos, seguida de mais uma lavagem com 25 mL de TCA 10% (m/v) em água destilada e lavagem com acetona gelada. As condições de centrifugação para as lavagens foram as mesmas do procedimento de precipitação. Ao final do processo de precipitação e lavagem das amostras estas foram ressuspensas em 10 mL de água milli Q autoclavada.

A concentração das proteínas foi determinada utilizando o NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Após a quantificação do conteúdo proteico das amostras elas foram preparadas para a análise proteômica, utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas conforme descrita no item 3.1.5 e a identificação das proteínas foi realizada conforme descrita no item 3.1.6.

## 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Análise do Secretoma de *T. asperellum* TR 356 quando cultivado na ausência ou presença de *P. vulgaris*

Neste trabalho foram identificadas 19 proteínas em SCF (tabela 2) e 11 proteínas em SCC (tabela 3).

No secretoma SCF (Tabela 2) foram identificadas: duas *small secreted cysteine proteins* (SSCP), hidrofobina II e a cerato-platanina SM1; três peptidases, peptidase A1 e duas peptidases G1; um glicosídeo hidrolase da família 25; *Glycolipid anchored surface protein* GAS1; *gamma-crystallin related protein*; *Barwin-related endoglucanase*; *GroEL-intermediate domain like*; ATPase e 6 proteínas hipotéticas.

Na condição SCC foram identificadas 11 proteínas fúngicas secretadas por *T. asperellum* TR 356 (Tabela 3), sendo elas: três SSCPs, cerato-platanina SM1 e duas hidrofobinas II; uma ribonuclease; *Glycolipid anchored surface protein* GAS1; peptidase G1; *Barwin-related endoglucanase* e 4 proteínas hipotéticas.

Tabela 2. Proteínas identificadas no secretoma de *Trichoderma asperellum* TR 356

Número de acesso	Nome da proteína	Motivos de translocação	Score	Massa	Match	Cobertura da sequência (%)
jgi Triasp1 444259	ATPase, F0 complex, subunit A		1196,805	24841,9209	21	25,64
jgi Triasp1 345411	Barwin-related endoglucanase		1019,63	28112,6801	13	4,64
jgi Triasp1 103587	Cerato-platanin *		1468,102	14617,2668	23	31,16
jgi Triasp1 38441	Gamma-crystallin related		712,7471	11998,3885	13	25,47
jgi Triasp1 34239	Glicolípido ancorado a superfície da proteína GAS1		180,0187	57848,2601	8	2,57
jgi Triasp1 416692	Glicosídeo hidrolase, família 25 *		178,5666	24563,0393	10	21,05
jgi Triasp1 437948	GroEL-intermediate domain like		954,2429	29121,1475	7	11,87
jgi Triasp1 79710	Ribonuclease guanina específica N1 e T1	FKC	5152,191	16295,3257	38	43,24
jgi Triasp1 436135	Hidrofobina 2 *		5240,831	9324,6765	21	47,73
jgi Triasp1 408109	Proteína Hipotética	FFC	57507,22	10882,0633	124	61,22
jgi Triasp1 414269	Proteína Hipotética	YTC/YRC	18159,59	11567,1745	41	47,62
jgi Triasp1 378026	Proteína Hipotética	RNIH	3716,421	13684,1199	21	26,02
jgi Triasp1 399169	Proteína Hipotética		547,6988	24164,4188	8	8,41
jgi Triasp1 265094	Proteína Hipotética		542,132	18085,8645	11	25,15
jgi Triasp1 238458	Proteína Hipotética		16,1474	184111,4068	13	3,73
jgi Triasp1 451644	Peptidase A1 *		4387,076	39776,4133	50	25,84
jgi Triasp1 394258	Peptidase G1, eqolisina *		197,856	27155,9756	6	5,66
jgi Triasp1 442093	Peptidase G1, eqolisina aspartic peptidase *		7711,903	29011,9589	73	16,67
Enolase 1 OS S. cerevi	Controle positivo		1579,027	46873,2187	78	29,06

\* Proteínas candidatas a efetores segundo Guzman-Guzman et al., 2017

Tabela 3. Proteínas identificadas no secretoma de *Trichoderma asperellum* TR 356 na presença de *Phaseolus vulgaris*

Número de acesso	Nome da proteína	Motivos de translocação	Score	Massa	Match	Cobertura da sequência (%)
345411	Barwin-related endoglucanase		531,818	28112,6801	11	4,64
103587	Cerato platanina *		5528,94	14617,2668	40	47,83
34239	Glicolípido ancorado a superfície da proteína GAS1		1760,14	57848,2601	29	10,29
79710	Ribonuclease guanina específica N1 e T1	FKC	3195,22	16295,3257	30	43,24
479303	Hidrofobina 2 *		4098,46	10151,564	10	65,63
436135	Hidrofobina 2 *		7531,99	9324,6765	27	47,73
378026	Proteína Hipotética	RNIH	2243,48	13684,1199	17	26,02
265094	Proteína Hipotética		379,545	18085,8645	8	11,98
408109	Proteína Hipotética	FFC	20924,4	10882,0633	78	86,73
414269	Proteína Hipotética	YTC/YRC	14339,6	11567,1745	33	17,14
442093	Peptidase G1, eqolisina *		797,44	29011,9589	18	15,94
Enolase 1			1851,18	46873,2187	84	29,06

\* Proteínas candidatas a efetores segundo Guzman-Guzman et al., 2017

Das 30 proteínas identificadas 10 foram encontradas nas duas condições, sendo elas: a cerato platanina SM1, a hidrofobina II (Número de acesso no banco de dados 436135), ribonuclease; a proteína GAS1; peptidase G1; *Barwin-related endoglucanase* e 4 proteínas hipotéticas (Números de acesso 378026, 265094, 408109 e 414269) (Tabelas 2 e 3).

A proteína, Hidrofobina II ID 479303, foi detectada apenas no secretoma da interação, SCC. As hidrofobinas já foram descritas com papel na interação de fungos do gênero *Trichoderma* e seus hospedeiros, sendo que na interação com plantas pode atuar mediando a colonização radicular (Kim *et al.* 2001; Viterbo and Chet 2006; Dubey *et al.* 2014).

Oito genes codificadores de hidrofobinas II foram identificados no genoma de *T. asperellum* e destes um, *hfb2-6*, apresenta aumento de expressão em experimentos que simulam a interação *T. asperellum*/planta hospedeira (Huang *et al.* 2015). Huang e colaboradores também demonstraram que a proteína codificada por este gene HFB2-6 leva ao aumento da expressão de genes de defesa e de produção de auxina em *Populus*, sugerindo a sua participação na intrincada rede de resposta de defesa de plantas, assim como na promoção de crescimento da planta hospedeira.

Guzman e colaboradores (Guzmán-Guzmán *et al.* 2017) também demonstraram que o aumento da expressão do gene que codifica a hidrofobina TVHYDII, *tvhydii*, em *T. virens* correlaciona com a maior capacidade de colonização da raiz de *A. thaliana*. Assim como, com maior atividade antagônica de *T. virens* contra o fungo fitopatogênico *R. solani*.

Estes dados sugerem que o papel das hidrofobinas com expressão aumentada em experimentos de interação *Trichoderma* spp/plantas hospedeiras foi conservado nas espécies de *Trichoderma* micoparasitas, *T. virens* e *T. atroviride*, atuando no processo de colonização do tecido radicular da planta hospedeira, assim como, modulando sua resposta de defesa e crescimento. Desta forma, acredita-se que a hidrofobina detectada no presente trabalho também possa estar envolvida na colonização e modulação de resposta de defesa e crescimento de *P. vulgaris* pelo fungo micoparásita *T. asperellum*. Além disso, é importante ressaltar que nos trabalhos citados acima as plantas modelo foram *Populus* spp e *A. thaliana* e no presente trabalho *P. vulgaris*, o que sugere que no

caso das hidrofobinas a resposta desencadeada na planta hospedeira não é espécie específica.

Ainda com relação a proteínas SSCP, no presente trabalho a ceratoplatanina, ID 103587, identificada foi detectada tanto na ausência quanto na presença da planta hospedeira. Este resultado é corroborado por Djonovic et al (2006), que mostraram a secreção da proteína homóloga, Sm1, em *T. virens* tanto na presença quanto na ausência do algodoeiro.

Posteriormente Salas-Marina et al (Salas-marina *et al.* 2015) demonstraram, também, que a Sm1 (*T. virens*) e sua homóloga Epl1 (*T. atroviride*) modulam a resposta de defesa em tomateiro levando à resistência sistêmica contra os patógenos *A. solani*, *B. cinerea* e *Pseudomonas syringae*. Gomes e colaboradores (Gomes *et al.* 2015) mostraram o papel de EPL1 de *T. harzianum* ALL42 no seu reconhecimento pela planta hospedeira como um simbiote e não um patógeno, modulando a regulação da expressão de genes relacionados ao micoparasitismo, a capacidade de *T. harzianum* se enrolar nas hifas do patógeno e a expressão de genes relacionadas a defesa da planta.

Até o momento não há trabalhos mostrando que a espécie *T. asperellum* secreta cerato-platanina. Nossos resultados mostram que assim como as demais espécies de *Trichoderma* já citadas aqui, o isolado em estudo secreta cerato-platanina na presença ou não de feijoeiro.

As proteínas guanine-specific ribonuclease N1 e T1 e peptidase G1 já foram detectadas no secretoma de *T. virens* quando crescido na presença de milho (Lamdan *et al.* 2015). No entanto, não existem relatos quanto ao seu papel nesta interação.

O papel de peptidases de *Trichoderma* na interação com plantas hospedeiras ainda não foi elucidado. As informações da literatura em sua maioria mostram que estas enzimas são expressas por espécies de *Trichoderma* em associação com seus hospedeiros, planta ou fungo fitopatogênico (Stecca Steindorff *et al.* 2014; Lamdan *et al.* 2015). No entanto, ainda não existem relatos de análise do seu papel nestes processos de interação.

A proteína *barwin-related endoglucanase* foi identificada em ambas as condições. Em interação *Trichoderma*-patógeno elas estão envolvidas com a capacidade antagonística do *Trichoderma*, age diretamente sobre o patógeno hidrolisando sua

parede celular (Zhang *et al.* 2010). A hipótese para sua presença na interação *T. asperellum*-feijoeiro é que elas estariam hidrolisando a parede celular da planta e liberando oligossacarídeos que podem agir como DAMPs desencadeando resposta de defesa na planta.

As proteínas hipotéticas D 408109, ID 414269 e ID 378026 e a ribonuclease N1 e T1 com ID 79710 apresentaram os domínios de translocação FFC; YTC e YRC; RNIH e FKC, respectivamente (Tabelas 1 e 2). Estes domínios caracterizam as proteínas classificadas como efetores citoplasmáticos produzidos por patógenos que são translocados para o interior da célula hospedeira. Guzman e colaboradores (Guzmán-Guzmán *et al.* 2017) identificaram uma lista de genes nos genomas das espécies *T. harzianum*, *T. virens* e *T. atroviride* contendo estes domínios de translocação e propuseram que as proteínas codificadas possam atuar como um *effector-like*. No entanto, estudos futuros analisando mutantes com a deleção destes genes serão necessários para dar mais informação quanto à sua atuação como proteínas efetoras, modulando a resposta de defesa de plantas hospedeiras, tanto ETI quanto PTI.

Outras quatro proteínas anotadas como hipotéticas foram identificadas no secretoma do fungo crescido na presença de feijoeiro (Tabela 3). A proteína hipotética ID 378026 é ortóloga de uma proteína de *T. atroviride* (Triat 2 Protein ID 31624, JGI) e *T. harzianum* (Triha1 Protein ID 1760, JGI) as quais, também, não possuem função descritas. A análise do papel destas proteínas na interação de espécies de *Trichoderma* com seus hospedeiros representa um desafio, no entanto, poderá contribuir para a identificação de novas moléculas participantes deste complexo processo.

Os resultados encontrados na análise do secretoma da interação entre *T. asperellum* TR 356 e *P. vulgaris* foi menor do que o esperado quando comparados com um trabalho realizado anteriormente da análise proteômica da interação entre *T. harzianum* TR 274 e *P. vulgaris*, no qual foram identificadas 320 proteínas (dados não publicados). O menor número de proteínas identificadas no presente trabalho, pode ser devido a problemas técnicos relacionados ao preparo da amostra para a análise por espectrometria. O preparo da amostra é de fato um fator limitante desta técnica.

Como o proteoma é complexo, não há um método padrão de preparo de amostra, tornando a etapa inicial de busca da metodologia mais adequada essencial para trabalhos de análise proteômica. A metodologia escolhida para este trabalho é semelhante à já

utilizada em nosso grupo de pesquisa para preparo de amostras de secretomas da interação entre feijoeiro e espécies de Trichoderma. Desta forma, será necessária uma reavaliação de cada uma das etapas de preparo das amostras visando o aumento do número de proteínas identificadas.

#### **4.2. Análise do proteoma de folhas de *Phaseolus vulgaris* em interação com *T. asperellum* TR 356 e *S. sclerotiorum***

Foram identificadas proteínas com abundância diferencial em todos os tratamentos 75, 67 e 97 em PSS, PT e PTS, respectivamente quando comparadas ao controle, planta crescida sozinha (Figuras 9, 11 e 13). A presença dos fungos *T. asperellum* TR356 e *S. sclerotiorum* modulou significativamente a abundância de proteínas das folhas de feijoeiro e a expressão foi maior quando os dois fungos estavam presentes corroborando com alguns trabalhos de proteômica da interação Trichoderma-planta-patógeno. Utilizando a abordagem proteômica 2-DE e identificação por espectrometria de massas, Marra e colaboradores (Marra *et al.* 2006) identificou uma variedade de proteínas abundantes no proteoma de feijoeiro durante a interação com *T. atroviride*, com os patógenos *B. cinerea* e *R. solani* e quando todos estavam presentes, na qual foi encontrada uma maior quantidade de proteínas.

Mais recentemente os resultados das análises proteômicas da interação *T. harzianum* ALL42-Feijoeiro comum-patógenos *R. solani* e *F. solani* mostrou número de proteínas abundantes foi alterado tanto em folhas quanto em raízes de feijoeiro (Pereira *et al.* 2014). Diante disso observa-se que a presença dos fungos modula o proteoma da planta hospedeira.

##### **4.2.1. Proteínas com abundância diferencial em folhas de feijoeiro cultivados na presença do patógeno *S. sclerotiorum***

Das proteínas com abundância aumentada na condição PSS quando comparada ao controle planta sozinha, 52 % são proteínas envolvidas com resposta de defesa, 14 %

são proteínas de organelas, 7% são proteínas com atividade catalítica e sem GO (grupo de proteínas sem GO segundo o banco de dados), 5 % são proteínas de metabolismo e *protein binding*, 3 % são proteínas da fotossíntese e na resposta da planta ao íon cádmio e 2 % proteínas com atividade oxiredutora (Figura 8 A).

O fungo *S. sclerotiorum* é fungo necrotrófico, desta forma, a resposta clássica da planta hospedeira à sua presença é desencadear a resposta de defesa, portanto era esperado o maior percentual de proteínas no grupo proteínas de defesa, correspondendo os grupos proteínas relacionadas ao estresse oxidativo, salino, resposta de defesa, a biossíntese do hormônio ácido abscísico (ABA) e SAR (Figura 8 A).

A produção de ABA e a resposta de defesa em plantas parecem ser dois processos estreitamente relacionados. Já foi demonstrado que níveis aumentados de ABA em *A. thaliana* em interação com o fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum* contribui para a resistência desta planta ao estabelecimento do patógeno, assim como, em patossistemas com os fungos necrotróficos *A. brassicicola* e *P. Cucumerina* (Perchepied *et al.* 2010; Mbengue *et al.* 2016).

Outros trabalhos mostraram ainda que ABA regula as respostas de defesa através dos seus efeitos sobre a deposição de calose, a produção de intermediários reativos de oxigênio e a regulação da expressão de genes de defesa (Bari and Jones 2009). Lim *et al.* (Lim *et al.* 2015) mostraram também que ABA atua como um mensageiro químico controlando o fechamento dos estômatos através da ativação/desativação de canais de íons. A abertura natural dos estômatos é um ponto de entrada de patógenos, assim o fechamento dos estômatos quando a planta é colonizada por um patógeno pode ser uma estratégia na primeira linha de defesa das plantas hospedeiras contra a infecção por patógenos foliares, como no modelo de interação do presente trabalho *S. Sclerotiorum/ P. vulgaris*.

O percentual de proteínas relacionadas ao metabolismo e fotossíntese/respiração que apresentaram aumento em sua abundância está entre os menores valores 5 % e 3 %, respectivamente (Figura 8 A). Este resultado corrobora com dados obtidos para outros patossistemas que mostram redução do metabolismo de plantas hospedeiras quando infectadas por patógenos, dirigindo a sua maquinaria de síntese protéica para produção de proteínas relacionadas com defesa (Segarra *et al.* 2007).

Para as proteínas com menor abundância em PSS, 40 % estão envolvidas com

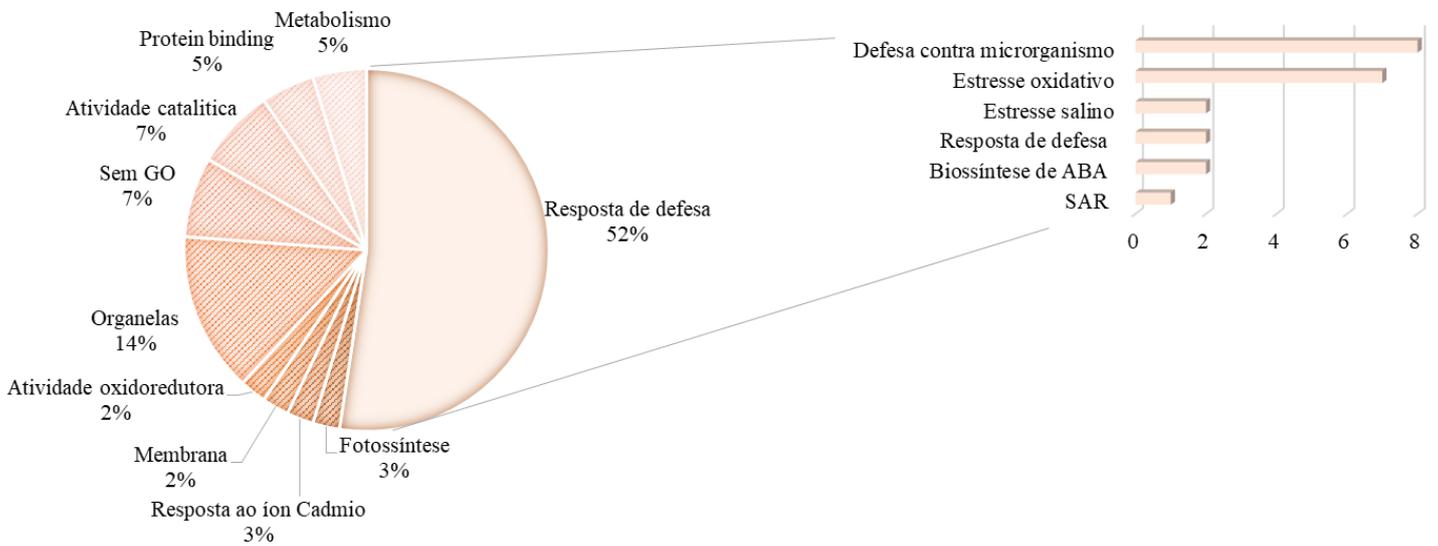
defesa, 21 % estão envolvidas em atividade oxiredoreductora, 9 % são proteínas de organelas e relacionadas os processos de metabolismo e fotossíntese e 6 % *protein binding* e proteínas de adesão (Figura 8 B). Do grupo de proteínas relacionadas a resposta de defesa, oito estão envolvidas com a cascata de MAPK.

A cascata de MAPK tem um papel central na sinalização da defesa de plantas contra a infecção por patógenos. A ativação de MAPKs é um dos eventos iniciais de sinalização após o reconhecimento de PAMPs e efetores de patógenos por plantas hospedeiras (Meng and Zhang 2013). A supressão de proteínas envolvidas na cascata MAPK pode ser um contra-ataque do patógeno para tentar se defender dos mecanismos de defesa da planta e assim promover a patogênese.

Na presença de *S. sclerotiorum* a planta diminui a expressão de algumas proteínas relacionadas à adesão, representando 6 % das proteínas com menor abundância (Figura 8 B). Não foi encontrado relatos das proteínas de adesão identificados no presente trabalho em interação feijoeiro-patógeno.

Uma proteína relacionada à biossíntese de JA foi identificada com a abundância diminuída em PSS, indicando um provável envolvimento desse hormônio na interação feijoeiro-*S. sclerotinia*. Já foi mostrado em um estudo anterior que o hormônio JA é o principal sinal na defesa contra *S. sclerotiorum* (Perchepied *et al.* 2010).

A



B

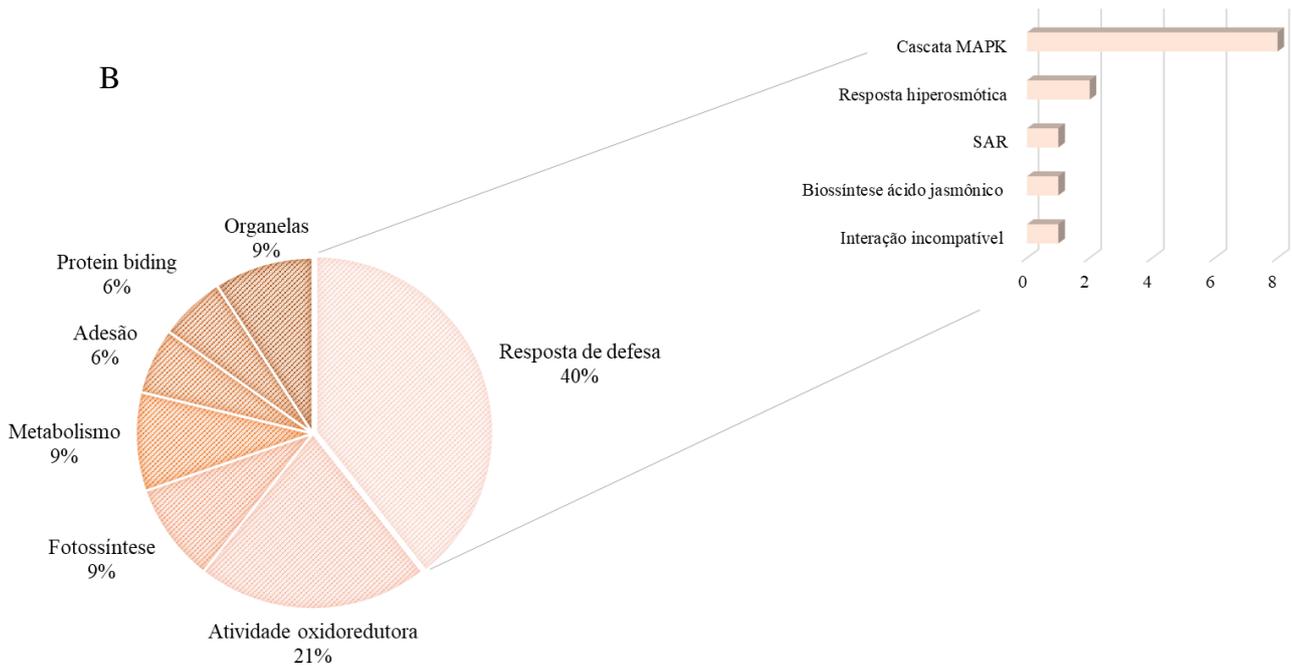


Figura 8. Categorização funcional das proteínas identificadas com maior (A) e menor (B) abundância em folhas de feijoeiro comum cultivado na presença do patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.

Das 75 proteínas identificadas com abundância diferencial na condição PSS, 42 apresentam aumento e 33 proteínas apresentaram diminuição na abundância (figura 9). As 10 proteínas com maior abundância foram: Metil transferase, *S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein* (SAMP\_3548), uma proteína da família de zinc finger (CCCH-type) (SAMP\_27189), 3 quitinases (SAMP\_8134; SAMP\_8401 e SAMP\_11052), uma glicosídeo hidrolase (SAMP\_12692), uma proteína inibidora de protease (SAMP\_12893), uma serina endopeptidase do tipo subtilisina (SAMP\_16169), uma osmotina 34 (SAMP\_29732) e uma *MLP-like protein 423* (SAMP\_2805) (Figura 9).

Proteínas da família metil transferase já tiveram sua função biológica descrita em diferentes modelos de interação planta-patógeno. Utilizando genética reversa Lee e colaboradores (Lee *et al.* 2016) mostraram que a histona lisina metil transferase regula a expressão de genes de defesa na presença do fitopatógeno *B. cinerea* e que ativam a PTI e SAR em *Arabidopsis thaliana*. Esta enzima controla a expressão das proteínas efetoras PEP1- e FLG 22, sugerindo um significativo papel na PTI na planta. O presente trabalho encontrou uma metil transferase diferente da citada por Lee et al. (2016), ela não foi validada ainda, mas sugere-se seu papel na interação planta-patógeno.

Cinco das dez proteínas com maior abundância em PSS são PR-proteínas, três quitinases (SAMP\_8134; SAMP\_8401 e SAMP\_11052), a proteína inibidora de protease (SAMP\_12893) e a osmotina 34 (SAMP\_29732) e a maior abundância delas é induzida em feijoeiro como resultado da presença de *S. sclerotiorum* melhorando a resistência da planta contra o patógeno. A presença de PR-proteínas no local da infecção caracteriza a resposta de defesa tipo SAR (Bari and Jones 2009).

O aumento na expressão de quitinases já foi descrita em outros patossistemas como, por exemplo: *Magnaporthe oryzae* e arroz, *F. solani/R. solani* e feijoeiro comum (Kim *et al.* 2001; Pereira *et al.* 2014). As quitinases expressas nestas interações atuam como antifúngicos, catalisando a hidrólise da quitina na parede celular dos patógenos, além disto, os oligossacarídeos resultantes de sua ação atuam também como com PAMPs desencadeando a PTI (Mathys *et al.* 2012). No entanto, já foi demonstrado que os patógenos têm mecanismos para escapar de sua ação. Van den Burg et al. (van den Burg *et al.* 2006) mostraram que a quitinase de tomateiro é alvo do efector Avr 4 do

patógeno *Cladosporium fulvum*, e que esta associação evita a ação das quitinases sobre a parede celular deste patógeno.

O aumento na expressão de osmotina já foi mostrado em diferentes patossistemas (Zhu *et al.* 1995; Abdin *et al.* 2011; Chowdhury *et al.* 2017), no entanto é o primeiro relato para o patossistema *S. sclerotiorum*/feijoeiro. A função de uma osmotina de tabaco foi hipotetizada por Abdin *et al.* (Abdin *et al.* 2011). Segundo esses autores ela poderia estar regulando as respostas de defesa da planta através por agir como um regulador transcricional de genes que codificam enzimas chaves de vias de defesa.

Com relação à proteína inibidora de protease (PR-6), Tu e colaboradores (Tu *et al.* 2018) demonstraram a relação entre o aumento da expressão de um inibidor de protease e resposta de defesa em alfafa contra mosca branca.

Os primeiros estudos evidenciando a importância das proteases do tipo subtilisina na defesa em plantas foram relatados ainda nos anos 90. Jorda *et al.* (Jordá *et al.* 1999) mostraram aumento na expressão das subtilisinas P69B e P69C em tomateiro, quando inoculado com *Pseudomonas syringae* e tratado com o hormônio ácido salicílico. Posteriormente, foi demonstrado aumento da expressão de uma subtilisina homóloga em uva no fruto ou na planta, parreira, após a inoculação com o patógeno *Plasmopara viticola* (Figueiredo *et al.* 2008, 2014, Monteiro *et al.* 2013). No caso da protease identificada no presente trabalho, MLP 423, não há trabalhos na literatura que descrevam o seu papel na interação entre planta-patógenos. No entanto, pela categorização do *Gene Ontology* sua função está relacionada com a resposta de *A. thaliana* a estresse biótico.

As 10 das proteínas com menor abundância em PSS são: Uma proteína da família de clivagem de Glicina (SAMP\_27546), duas rubisco ativase (SAMP\_21999 e SAMP\_15175), uma ribulose bifosfato carboxilase (SAMP\_17505), uma tioredoxina (SAMP\_4686), uma aldolase (SAMP\_10377), uma D-xilulose 5- fosfato redutoisomerase (SAMP\_1385), uma ATPsintase (SAMP\_3276), uma aminotransferase (SAMP\_28823) e uma glutamina sintase 2 (SAMP\_27628) (Figura 9).

A maior parte destas proteínas está relacionada ao metabolismo fotossintético do feijoeiro. Já foi demonstrado em outros modelos de interação que é comum que a planta

hospedeira faça a transição para um metabolismo não-fotossintético para se preparar para a resposta de defesa (Segarra *et al.* 2007). Sendo que, a menor abundância de rubisco ativase também já foi mostrado em folhas de feijoeiro cultivado na presença do patógeno *R. solani* (Pereira *et al.* 2014).

A menor abundância da proteína tioredoxina em folhas de feijoeiro no presente trabalho não corrobora com o trabalho de Liu *et al.* (Liu *et al.* 2016) que mostrou uma maior abundância das proteínas tioredoxinas no apoplasto de algodão durante uma interação com o patógeno *V. dahliae*.

As proteínas tioredoxina agem reduzindo os níveis de ROS em plantas, portanto, tem um papel crucial no balanço redox do apoplasto (Li *et al.* 2016). Desta forma, a sua menor abundância no patossistema *P. vulgaris/S. sclerotiorum* pode levar a um maior acúmulo de ROS e conseqüentemente uma resposta de hipersensibilidade mais intensa que em outros patossistemas. Por outro lado, a menor abundância de tioredoxina pode decorrer da supressão de proteínas de defesa da planta hospedeira por efetores do patógeno diminuindo assim a resposta de defesa da hospedeira

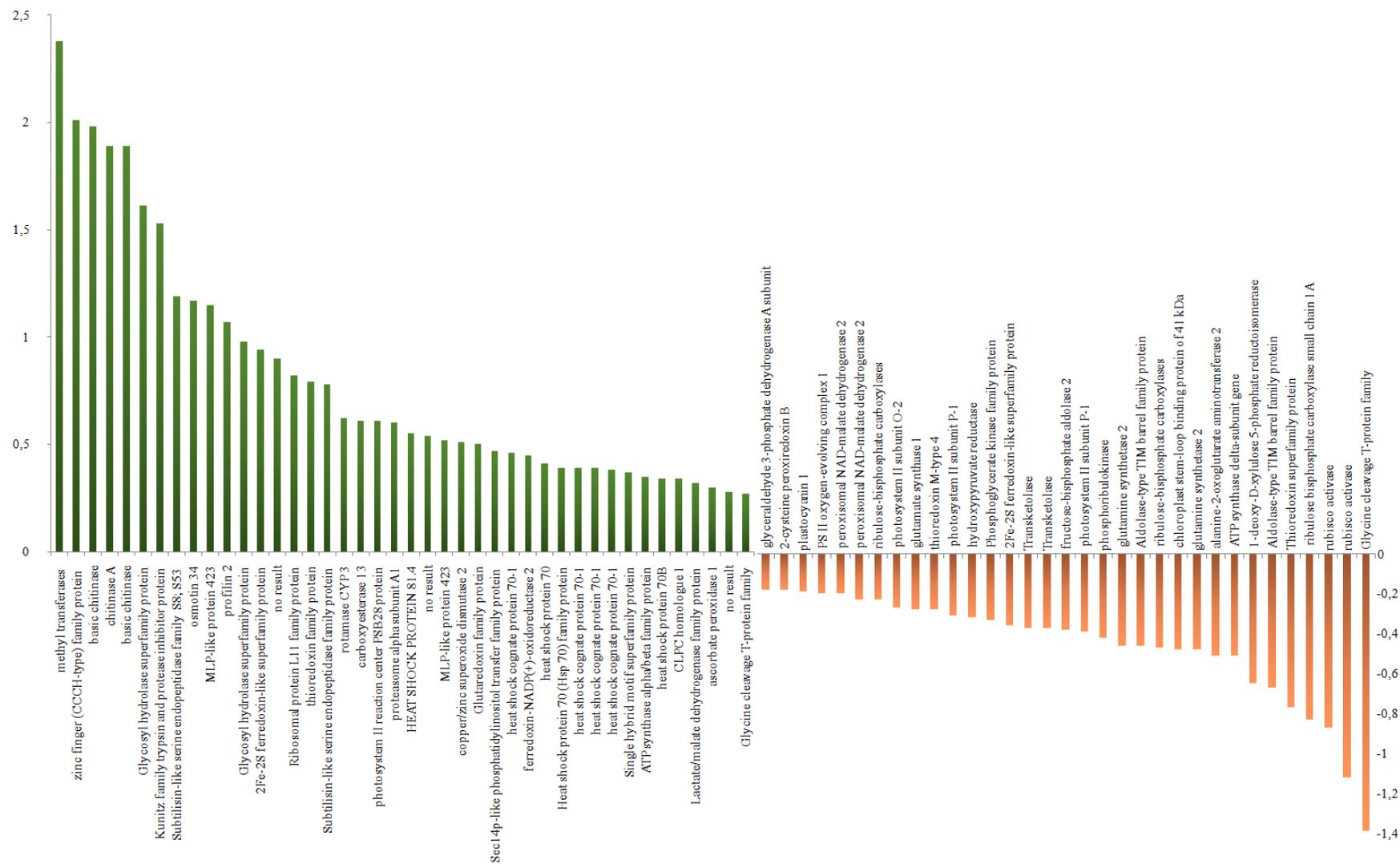


Figura 9. Proteínas identificadas com maior (Verde) e menor (laranja) abundância em folhas de feijoeiro comum na presença do patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.

#### 4.2.2. Proteínas com abundância diferencial em folhas de feijoeiro cultivados na presença de *T. asperellum* TR 356

Das 67 proteínas com abundância diferencial em feijoeiro inoculado com o isolado de *T. asperellum*, condição PT, 32 foram mais abundantes e 35 menos abundantes quando comparadas com a planta sozinha. Para as proteínas mais abundantes na condição PT, 49 % estão envolvidas com resposta de defesa, 13 % com metabolismo, 13 % com atividade oxido-redutora, as proteínas relacionadas fotossíntese, organelas, atividade catalíticas e as sem GO representaram 6 % cada grupo e 3 % são proteínas de adesão (Figura 10 A).

A presença do isolado *T. asperellum* TR 356 é capaz de modular a abundância de proteínas. Estudos da literatura mostram que quando em associação com uma planta hospedeira *T. Atroviride*, *T. virens* e *T. harzianum* confere benefícios à ela, melhorando a captação de nutrientes (Rawat and Tewari 2011), promoção de crescimento e estimulando respostas de defesa (Shoresh *et al.* 2010; Hermosa *et al.* 2013; Pereira *et al.* 2014). Estes estudos corroboram os resultados encontrados em PT no presente trabalho, onde o maior percentual foi obtido para os grupos de proteínas relacionadas à fotossíntese, metabolismo, e atividade oxido-redutora e, sendo maior que o percentual obtido em PSS (Figura 10A)

Proteínas envolvidas com fotossíntese, respiração, resposta a estresse, biossíntese de etileno e proteínas envolvidas no metabolismo de carboidrato foram diferencialmente reguladas por *T. asperellum* T-34 em planta de pepino, e a mudança no proteoma da planta a torna mais resistente ao ataque de *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans (Segarra *et al.* 2007). O isolado *T. asperellum* TR 356 pode ser capaz de alterar a resposta da planta à presença de uma eventual patógeno, desencadeando na planta os mecanismos de defesa RH e SAR (Figura 10 A). Este isolado pode ainda ativar outras vias de defesa comprovadas pela presença das proteínas HSPs relacionadas a tolerância da planta a estresse oxidativo, a serina transhidroximetil transferase 1 com função na defesa contra nematoides.

Das 35 proteínas com menor abundância em folhas de feijoeiro na presença de TR 356 46 % foram relacionadas a defesa, 14 % com organelas, 11 % com metabolismo, 8 % são *protein binding*; 6 % com fotossíntese, atividade oxido-redutora e

atividade catalítica e 3 % proteína estrutural (Figura 10 B), estes resultados sugerem que na interação com feijoeiro, o isolado de *T. asperellum* ocasiona uma diminuição de na abundância de algumas proteínas. Já foi descrito na literatura que microrganismos benéficos para a planta desenvolveram estratégias para minimizar ou mascarar as respostas de defesa da planta, permitindo assim sua colonização no hospedeiro, sem no entanto causar doenças (Zamioudis and Pieterse 2012).

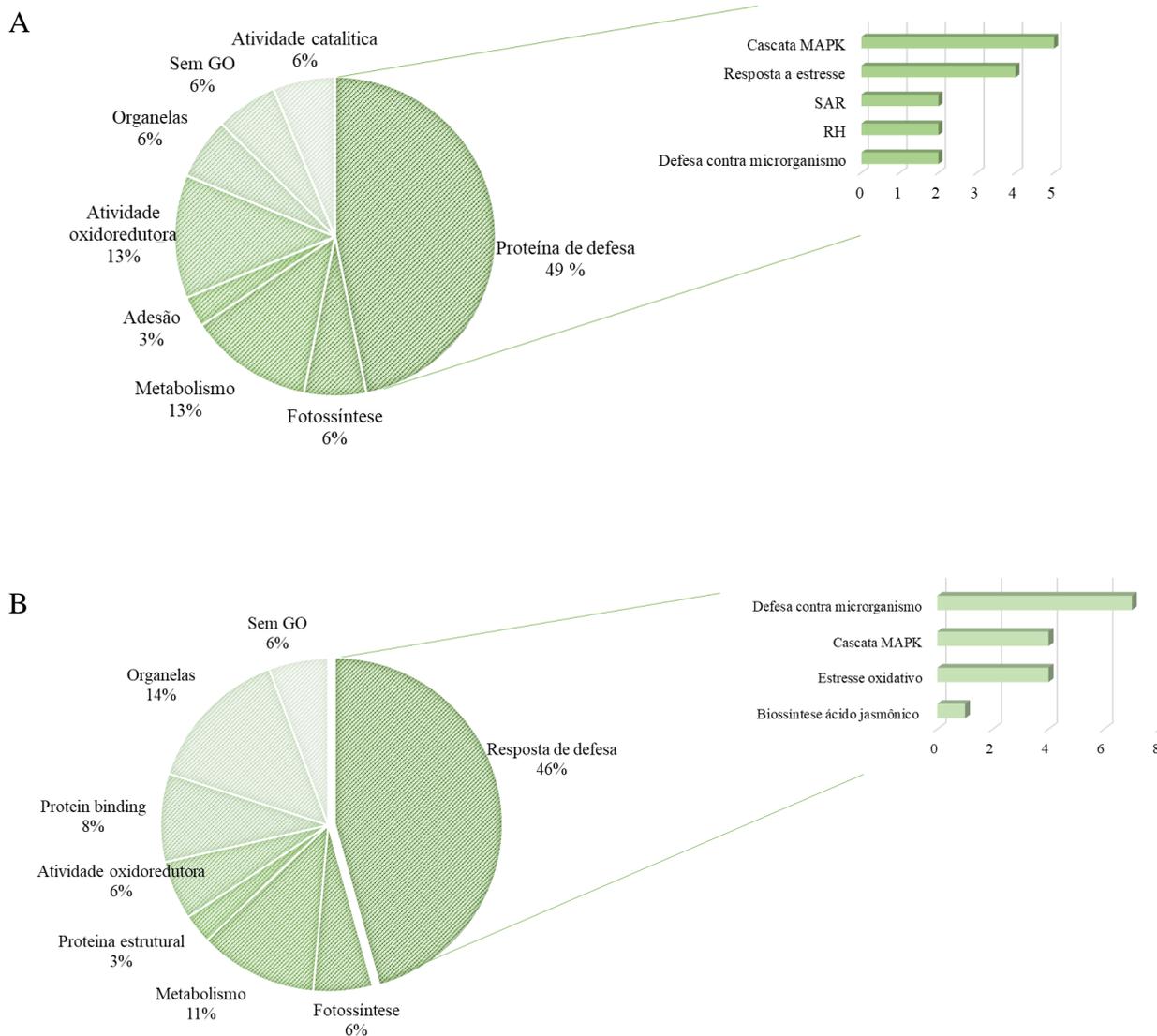


Figura 10. Categorização funcional das proteínas identificadas com maior (A) e menor (B) abundância em folhas de feijoeiro comum cultivado na presença do isolado *Trichoderma asperellum* TR 356.

As 10 proteínas com maior abundância em PT citam-se uma aldolase (SAMP\_22603), uma quitinase A (SAMP\_11052), *ribulose-bisphosphate carboxylase* (SAMP\_8435), duas *serine transhydroxymethyltransferase* 1 e 2 (SAMP\_4428 e SAMP\_14459), duas HSP 81.4 e 90.1 (SAMP\_14944 e SAMP\_16740), uma endopeptidase serina tipo-subtilisina (SAMP\_15495), uma *Chloroplast RNA binding* (SAMP\_22041) e uma sem anotação no banco de dados (SAMP\_8185) (Figura 11).

A presença de quitinase em folhas de feijoeiro indica que o isolado de *T. asperellum* é capaz de induzir resposta sistêmica na planta e uma das maneiras que ele faz isso é aumentando a abundância dessa proteína relacionada diretamente à defesa da planta e consequentemente induzindo a resposta do tipo RH e SAR (Figura 10).

Analisando as demais proteínas identificadas com maior abundância em PT relacionadas a defesa, observa-se que o isolado de Trichoderma é capaz de alterar positivamente mecanismos de defesa e resistência da planta. Isto é sugerido devido a presença de algumas HSPs, proteínas relacionadas à tolerância da planta ao estresse abiótico e biótico. HSP da família 90 como foi identificada no presente trabalho já teve sua função descrita em trabalhos anteriores (Breiman, 2014; Xu *et al.* 2012b). Segundo esses autores as HSPs agem como um regulador positivo da imunidade de plantas, interagindo diretamente com as proteínas PR e muito dos seus substratos são fatores de transcrição e quinases, que uma vez presente ativam mecanismos de defesa. A presença da proteína serina hidroximetiltransferase, também, já foi estudada em planta, mostrando ter um papel essencial na resistência de soja à nematoide (Kandoth *et al.* 2017).

Com relação as demais proteínas com maior abundância em PT, duas estão relacionadas ao metabolismo da planta, a proteína *Plastid fructose 1,6 – bifosfato aldolase* e a ribulose bifosfato carboxilase são enzimas importantes para o processo fotossintético da planta. A super expressão de uma aldolase de Arabidopsis em tabaco estimula a produção da proteína ribulose 1,5- bifosfato e seus precursores no ciclo de Calvin promovendo assim a fixação de CO<sub>2</sub> e consequentemente aumentando o crescimento da planta e da biomassa das plantas em campo (Uematsu *et al.* 2012). Estes resultados sugerem que o isolado TR 356 pode ser capaz de modular o metabolismo

fotossintético da planta pelo aumento da abundância de proteínas chaves envolvidas nos processos respiratório e fotossintético.

As top 10 proteínas menos abundantes em PT são uma *Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein* (SAMP\_7347), uma reductase (SAMP\_2813) e uma superóxido dismutase 2 (SAMP\_13026) uma ATP sintase (SAMP\_3276), uma proteína sem identificação (SAMP\_16679), uma tioredoxina (SAMP\_7291), uma lipoxigenase 2 (SAMP\_11811), *NADP-binding*, uma *rotamase CYP 4* (SAMP\_24979) e uma osmotina 34 (SAMP\_29732) (Figura 10B).

Algumas dessas proteínas com menor abundância já foram identificadas em trabalhos anteriores. A proteína TPR parece estar envolvida com a regulação hormonal das plantas, como a biossíntese de etileno e giberelinas (Yoshida *et al.* 2005; Greenboim-Wainberg *et al.* 2005) e do hormônio ABA (Rosado *et al.* 2006).

A baixa expressão da TPR e das proteínas relacionadas com estresse oxidativo, as tioredoxina, reductase e superóxido dismutase 2, pode estar relacionada com o tipo de interação estabelecida entre o feijoeiro e o fungo simbionte TR 356, em nessa interação benéfica, não haveria a explosão de ROS em folhas de feijoeiro, um mecanismo de defesa precoce em eventos compatíveis

O isolado *T. asperellum* TR 356 diminui a expressão da proteína de defesa lipoxigenase 2, o que contrasta com os dados da literatura. Estudos anteriores mostraram aumento da expressão do gene *lox 1* que codifica uma lipoxigenase de feijoeiro provocado pela presença do *T. harzianum* ALL 42 (Pereira *et al.* 2014; Gomes *et al.* 2015). Nossos resultados sugerem que a estratégia utilizada pelo isolado *T. asperellum* pode ser diferente das outras espécies, mas nem por isso ele estaria deixando de proteger a planta hospedeira, a hipótese seria que o isolado em estudo mantém a proteína lipoxigenase em menor abundância na célula para evitar sua atividade, uma vez que a atividade dessa enzima pode causar danos irreversíveis na membrana, os quais poderiam causar vazamento de conteúdos celulares e, em última análise, resultar em morte celular vegetal, trazendo desvantagem para ambos.

Até o presente momento não há trabalhos mostrando que fungo *Trichoderma* pode induzir ou não a expressão das proteínas *NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein*, *rotamase CYP 4*, e da ATP sintase. Já para a proteína osmotina-34,

o trabalho de Mayo et al (Mayo *et al.* 2016)corrobora a menor abundância dessa proteína encontrada aqui. Eles mostram que o gene OSM34 que codifica a osmotina 34 foi menos expresso em feijoeiro quando a planta foi crescida na presença de *Trichoderma. Velutinum*, mas seu papel nessa interação ainda não está esclarecido.

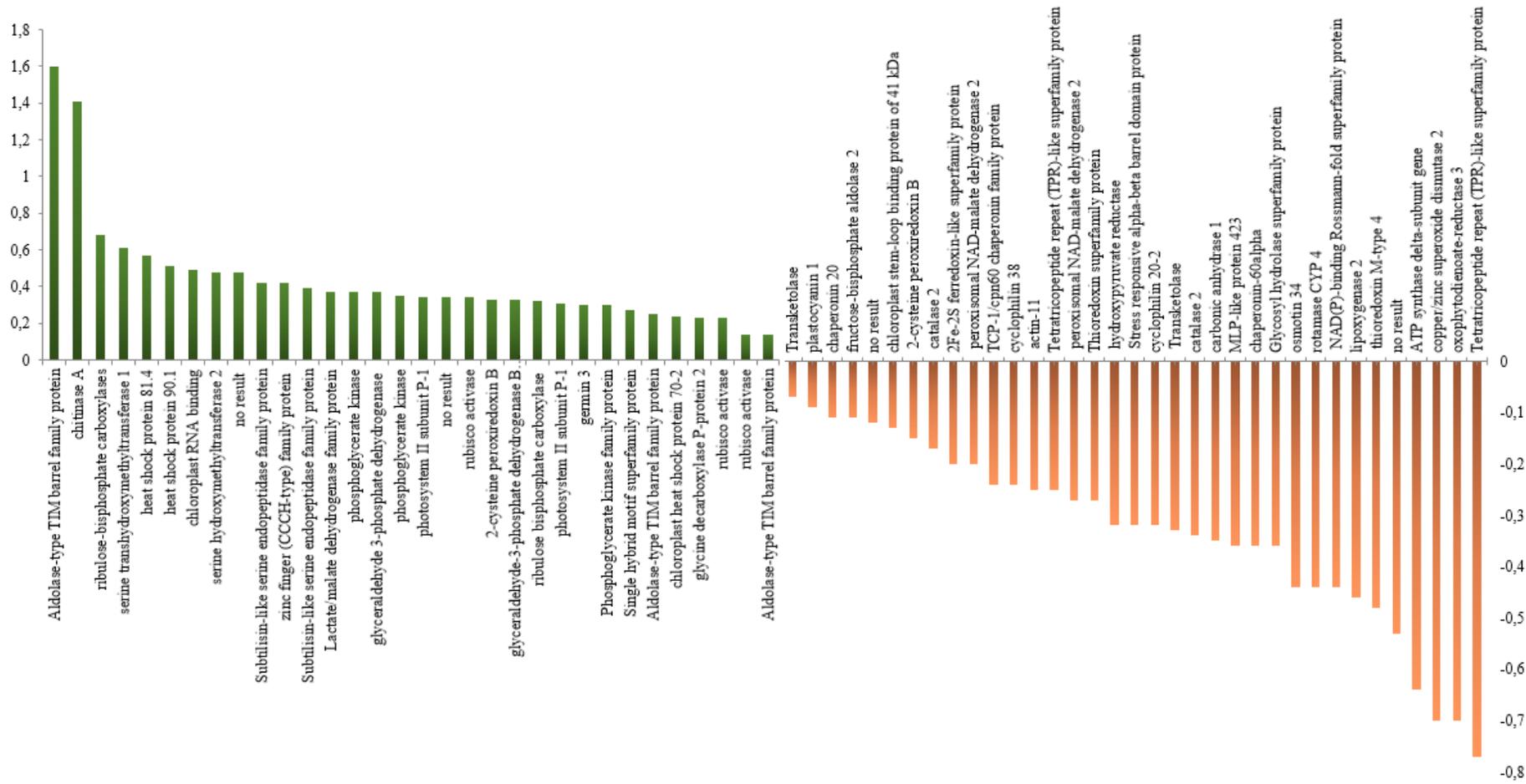


Figura 11. Proteínas identificadas com maior (Verde) e menor (laranja) abundância em folhas de feijoeiro comum quando crescido com *Trichoderma asperellum* TR 356.

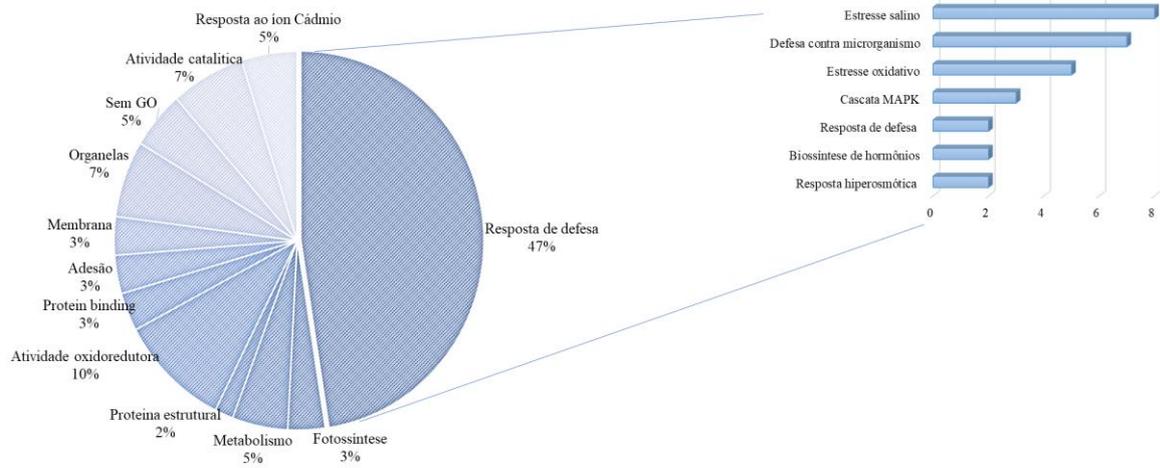
### 4.2.3. Proteínas com abundância diferencial em folhas de feijoeiro cultivados na presença de *T. asperellum* TR 356 e do patógeno *S. sclerotiorum*

A abundância de proteínas em feijoeiro foi modulada pela presença simultânea dos fungos antagonista TR 356 e do patógeno *S. sclerotiorum*, condição PTS. Das 97 proteínas com abundância diferencial em relação à planta sozinha, o controle, 61 foram mais abundantes e 36 foram menos abundantes. As proteínas com maior abundância foram agrupadas em 12 grupos, sendo eles: proteína estrutural 2 %; membrana, adesão, protein binding e fotossíntese representando 3 % cada um; metabolismo, resposta ao íon cádmio 5%; atividade catalítica 7% e o grupo resposta de defesa representando 47 % do total (Figura 12 A)

O grupo de maior destaque em PTS foi o das proteínas relacionadas a defesa, o que já era esperado uma vez que estudos prévios mostram que espécies, *T. virens*, *T. harzianum*, são capazes de interagir com as raízes das plantas e desencadear resposta de defesa e resistência sistêmica em planta hospedeira quando na presença de um patógeno (Landam *et al.* 2016; Pereira *et al.* 2014). Neste grupo de resposta de defesa estão incluídas proteínas relacionadas a resposta da planta à presença dos microrganismos, ao estresse salino, oxidativo, resposta de defesa e hiperosmótica, biossíntese de hormônio e proteínas envolvidas na cascata de MAPKs (Figura 12 A).

As proteínas com menor abundância na condição PTS, por sua vez, foram agrupadas em apenas 6 grupos: *protein binding* 5 %; atividade oxido-redutora e metabolismo 11 %, proteína estrutural 17 % e resposta de defesa 42 % (Figura 12 B), deste último grupo destacam-se, também, as proteínas envolvidas na cascata de MAPKs, sugerindo que os mecanismos de defesa desencadeados durante a interação do feijoeiro com *T. asperellum* e *S. sclerotiorum* pode ser sinalizada por essa cascata.

A



B

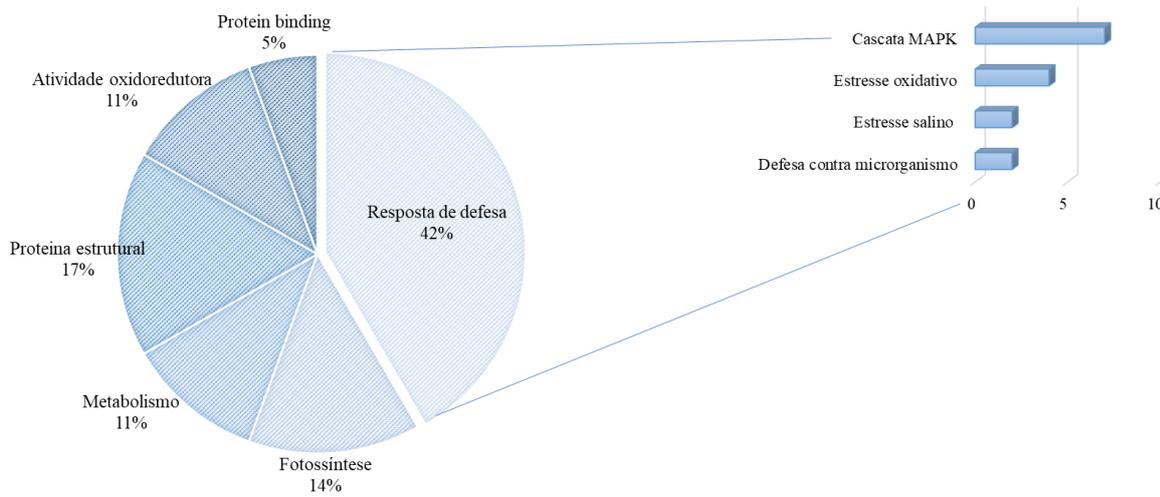


Figura 12. Categorização funcional das proteínas identificadas com maior (A) e menor (B) abundância em folhas de feijoeiro comum cultivado na presença do isolado *Trichoderma asperellum* TR 356 e do patógeno, *Sclerotinia sclerotiorum*.

As 10 proteínas identificadas com maior abundância em PTS foram: uma quitinase A (SAMP\_11052), uma GH (SAMP\_12692), uma ribulose bifosfato carboxilase (SAMP\_10752), albumina 2S (SAMP\_25844), três proteínas serina endopeptidase tipo subtilisina (SAMP\_16169, SAMP\_15495 e SAMP\_16610), uma glutationa S transferase (GST), uma *Selenium-binding protein 2* (SAMP\_24788) e uma sem identificação (SAMP\_16576).

Alguns fungos do gênero *Trichoderma* são capazes de interagir com as plantas e induzir mudanças em sua expressão gênica e em sua fisiologia. Entre as mudanças fenotípicas cita-se o aumento da resistência sistêmica em plantas às doenças. Neste trabalho a maior abundância da proteína quitinase A em folhas de feijoeiro sugere que o fungo *T. asperellum* pode estar induzindo sua maior expressão na planta para que esta responda melhor a presença do patógeno, estes resultados estão de acordo com dados da literatura (Figura 13). Pereira *et al* (2014), observaram uma maior atividade de quitinase em folhas de feijoeiro interagindo com *T. harzianum* e os patógenos *R. solani* e *F. solani*. Recentemente foi observado o aumento da atividade de quitinase em plântulas de bananeira induzidas por *T. viride*, *T. harzianum* e *T. koningii*, o que levou a uma supressão da doença provocada por *F. oxysporum* f. sp. *Cubense* (Nurbailis *et al.* 2016).

A menor abundância da ribulose bifosfato carboxilase, que como já foi citado neste trabalho, é uma enzima chave no processo de assimilação de CO<sub>2</sub> em plantas, ela foi identificada no patossistema feijoeiro/*T. harzianum* ALL42/*R. solani* e *F. solani* (Pereira *et al.*, 2014). A hipótese para a abundância diminuída dessa proteína em PSS e aumentada em PTS é que o patógeno diminua a abundância dela diminuindo, assim, a taxa fotossintética e respiratória da planta levando a morte do tecido no local da infecção, dessa forma o fungo necrotrófico conseguiria se alimentar de seus tecidos mortos. Por outro lado, na interação feijoeiro-*Trichoderma-S. sclerotiorum*, o simbionte *Trichoderma* induz maior abundância da proteína estimulando por sua vez o crescimento da planta resultando em uma indução de defesa à presença do patógeno.

As GSTs vêm ganhando importância e se tornando uma importante proteína relacionada a defesa da planta contra patógenos. Os primeiros trabalhos com GSTs de plantas mostrou que elas são proteínas multifuncionais com um importante papel na detoxificação celular de compostos endo e xenobióticos, como os herbicidas (Mauch

and Dudler 1993). Mais recentemente Sharma *et al.* (2014) mostrou que a superexpressão do gene GST classe Tau melhora a tolerância à salinidade e ao estresse oxidativo em vários estágios de desenvolvimento de *Arabidopsis*. No mesmo ano utilizando uma abordagem proteômica, Pereira *et al.* (2014) encontrou uma GST mais abundante nos mapas proteômicos de feijoeiro cultivado na presença de *T. harzianum* ALL 42 e dos patógenos *R. solani* e *F. solani*, sugerindo seu envolvimento em resposta de defesa, o que corrobora nosso resultado de que a GST identificada aqui está relacionada com a resposta de feijoeiro ao patógeno. A presença exclusiva de duas proteínas GSTs (material suplementar Tabela 4) e a expressão aumentada de outras GSTs na condição PTS no presente trabalho sugerem que sua expressão pode ser induzida pelo isolado *T. asperellum* TR 356 por causa da presença do patógeno.

Uma outra proteína relacionada a detoxificação da célula também foi identificada em PTS, a *Selenium-binding protein 2* (SBP). Em *Arabidopsis thaliana*, a super expressão do *AtSBP1* aumentou a tolerância da planta a dois compostos tóxicos, o selênio e o cádmio, encontrados frequentemente como poluentes de solo. A alta concentração de selênio é geralmente tóxica para as plantas (Schild *et al.* 2014). Os resultados encontrados aqui em PTS mostram que o isolado TR 356 além de melhorar a resistência de feijoeiro ao patógeno SS, também expressa proteínas que melhoram a resposta da planta a compostos que podem, em excesso, ser prejudiciais a mesma.

Neste trabalho também foi observado que três proteínas serino endopeptidase do tipo subtilisina foram mais expressas na interação planta/trichoderma/ patógeno, condição PTS, o que sugere o envolvimento dessas proteínas na resposta da planta ao patógeno e o Trichoderma estaria induzindo a expressão das proteínas. Bae *et al.* (Bae *et al.* 2013) usando a técnica de silenciamento gênico induzido por vírus em plantas de pimenta comprovou o envolvimento de algumas classes de proteases com defesa, o silenciamento das serinas proteases atrasa a resposta de hipersensibilidade da planta, o que a deixaria mais suscetível ao ataque do fungo, mostrando assim a importância dessas proteínas para a imunidade vegetal. O isolado TR 356 pode estar aumentando a abundância das serina endopeptidases do tipo subtilisina em feijoeiro para que ela responda melhor à *S. sclerotiorum*.

Em seu trabalho de revisão Vartapetian *et al.* (Vartapetian *et al.* 2011) mostra que as proteases tipo subtilisina de plantas seriam uma alternativa as capazes dos animais, já que as plantas não apresentam ortólogos dos genes caspases tendo, portanto,

papel ativo na morte celular programada que segundo Reape *et al* (2008) é observada em vários momentos da planta, como a formação e germinação das sementes, senescência, resposta a estresse abiótico e na resposta de defesa HR. Neste trabalho a maior abundância das serina endopeptidase tipo subtilisina pode estar relacionada a resposta de defesa HR potencializada pela presença de *T. asperellum* TR 356.

A albumina S2 é encontrada em sementes e são usadas como fonte de nutrientes (aminoácidos e esqueletos carbônicos) durante a germinação subsequente e o crescimento da planta. Há poucos estudos mostrando a indução da abundância dessas proteínas, recentemente Chen *et al.* (Chen *et al.* 2015) mostrou que o fator de transcrição TTG1 (*TRANSPARENT TESTA GLABRA1*) regula negativamente o acúmulo de proteínas de armazenamento através da repressão transcricional de 2S3, um gene que codifica uma albumina 2S. Ele age diretamente no regulador principal da maturação das sementes, o FUSCA3. As sementes de *Arabidopsis* contém dois grupos principais de proteínas de armazenamento em sementes: uma globulina 12 S (Cruciferina) tipo legumina e uma albumina S2 tipo napin (Baud *et al.* 2008).

A presença do isolado de *Trichoderma* pode regular de alguma forma a expressão dessa proteína, uma vez que sua expressão é aumentada na presença dele e a presença dessa proteína pode estar envolvida na defesa da planta ao patógeno. Albumina S2 pode ter papel na proteção da planta contra o ataque de fungos. Já foi relatada na literatura que uma proteína homóloga a albumina S2, de maracujá, inibiu o crescimento de *S. cerevisiae* e ainda inibiu a acidificação estimulada pela glicose do meio por células de *S. cerevisiae*, o que indica um provável comprometimento do metabolismo fúngico. A análise microscópica das células de levedura tratadas com albuminas 2S demonstrou alterações morfológicas na forma celular como a permeabilização da membrana plasmática, superfície celular, formação de parede celular e brotos, bem como na organização de organelas intracelulares (Agizzio *et al.* 2006).

Observando as Top 10 proteínas menos expressas em PTS é possível observar que também aparecem proteínas relacionadas a fotossíntese e ao metabolismo primário da planta, mas que não são as mesmas que foram mais reguladas. Assim podemos citar: cianase (SAMP\_21210), duas proteínas do fotossistema II (PS II) (SAMP\_1266 e SAMP\_4296), uma *binding protein* do cloroplasto (SAMP\_18699), uma chaperonina (SAMP\_9900), duas transcetolases (SAMP\_4358 e SAMP\_19303), uma ATPsintase

(SAMP\_3276) e uma osmotina 34 (SAMP\_29732). Nem todas essas proteínas já tiveram sua função descrita em um patossistema, o que dificulta uma discussão acerca dos seus papéis nessa interação.

As proteínas do fotossistema II, PS II oxygen-evolving complex 1 e a photosystem II subunit Q-2 assim como a *chloroplast stem-loop binding protein* of 41 kDa, estão envolvidas com a fotossíntese e têm sua abundância diminuída pela presença dos fungos *Trichoderma* e *Sclerotinia*. A análise proteômica de folhas de tomateiro após os danos causados pelo afídeo *M. euphorbiaea* mostrou que a expressão de algumas proteínas relacionadas com fotossíntese foi afetada pelo ataque do afídeo, entre elas estava a *PS II oxygen-evolving complex protein 3* (Coppola *et al.* 2013).

A *chloroplast stem-loop binding protein* of 41 kDa foi encontrada diminuída em folhas da planta *Potentilla fruticosa* L. crescidas sob altas temperaturas, ela liga os precursores dos ribossomos e participar do metabolismo de RNA nos cloroplastos (Guo *et al.* 2017). O que justificaria essa diminuição é o fato do experimento não ter sido realizado sob alta temperatura, ou ainda a presença dos fungos interfere em sua síntese.

As transcetolases que catalizam reações no ciclo de Calvin e são enzimas chave na via oxidativa das pentose-fosfato também foram identificadas em menor abundância em decorrência da presença dos fungos, porém seu papel na interação ainda não foi esclarecido.

A menor abundância da proteína osmotina 34 apresentada em PTS não era esperado uma vez que ela exibe atividade antifúngica e conforme vimos na figura 7 ela encontra-se aumentada na planta inoculada com o patógeno, condição PSS, e alguns estudos mostram que fungos da espécie *Trichoderma* aumentam a expressão de genes que codificam as PR-proteínas.

Analisando os resultados em PTS é possível observar que a presença dos dois fungos em feijoeiro influencia na abundância de proteínas, mas o mecanismo que cada fungo usa ainda não está esclarecido. Os resultados sugerem que o fungo *T. asperellum* faz um ajuste fino na escolha das proteínas que terão a abundância aumentada ou diminuída durante o contato com a planta que não traria prejuízo para ambos, mas que afetaria o crescimento do patógeno, intensificando seus mecanismos de defesa.

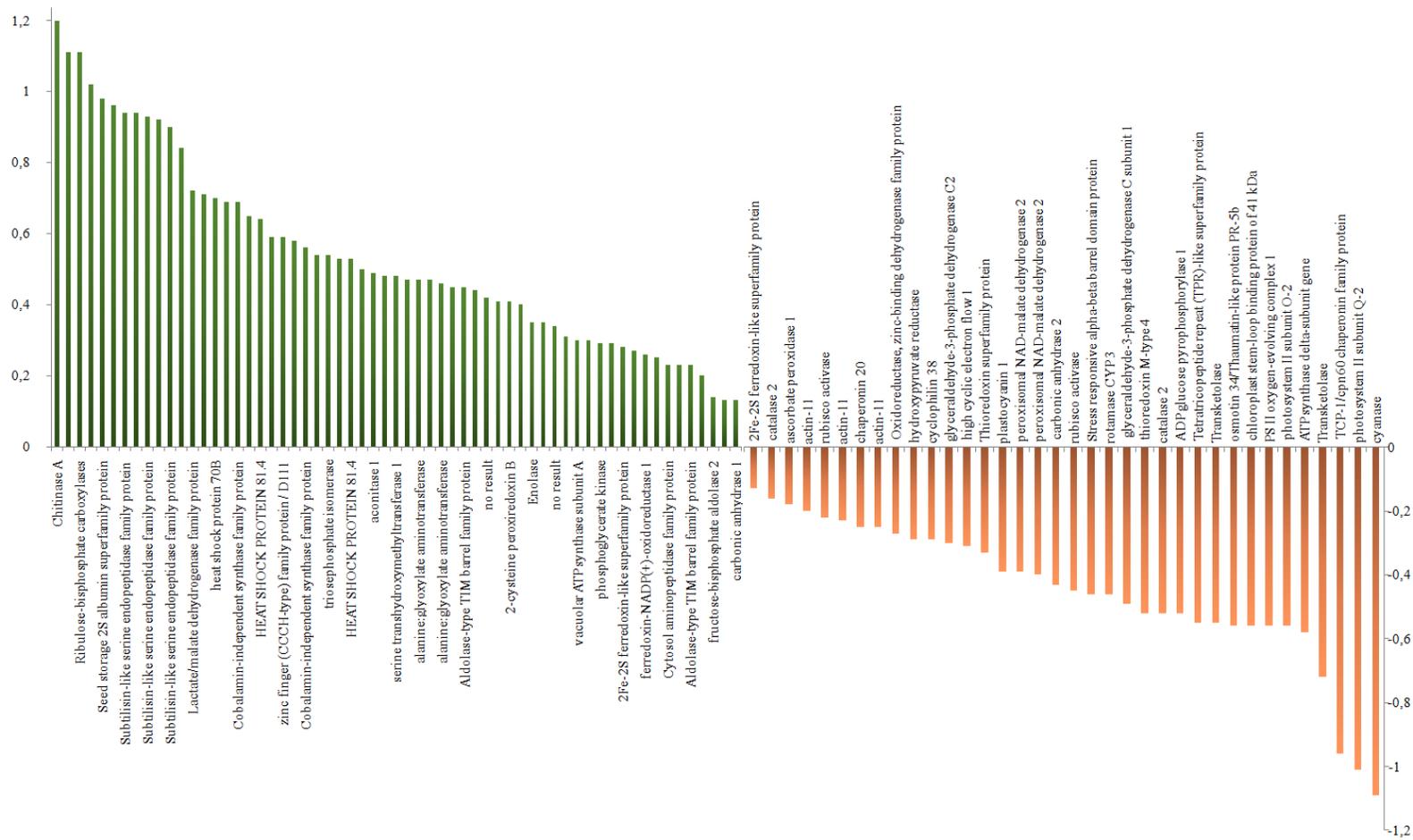


Figura 13. Proteínas identificadas com maior (Verde) e menor (laranja) abundância em folhas de feijoeiro comum quando crescido com *Trichoderma asperellum* TR 356 e *S. sclerotiorum*.

#### 4.2.4. Análise em cluster das proteínas diferencial expressas em feijoeiro na presença dos fungos *T. asperellum* TR356 e *S. sclerotiorum*

A alteração na expressão das proteínas de feijoeiro provocadas pela presença dos fungos *T. asperellum* e *S. sclerotiorum* fica mais evidente a partir da análise em cluster gerado com os dados da análise diferencial dos dados de proteômica sugerindo que a planta responde de forma diferente, a depender do tipo de fungo, se simbiote ou patógeno. O *heat map* das proteínas co-expressas em feijoeiro na interação com os dois fungos gerou 5 principais grupos de proteínas, sendo cada um representado por uma cor diferente (figura 14 A).

O grupo representado na figura 14 B mostra um perfil de abundância diferente dos demais grupos. As cinco primeiras proteínas, ribulose bifosfato carboxilase (SAMP\_10752), Glutathione S transferases (GTS) tau 8 (SAMP\_14658), albumina S2 (SAMP\_25844), serina endopeptidase tipo subtilisina (SAMP\_16610) e a selenium binding protein 2 (SAMP\_24788) não apresentam abundância aumentada nas condições PSS e PT, entretanto elas estão mais abundantes na condição PTS, sugerindo o envolvimento delas no patossistema feijoeiro/ *T. asperellum*/ *S. sclerotiorum*.

Essas proteínas já foram descritas em interações como essa o que corrobora nossos resultados (Pereira *et al.*, 2014). A expressão de duas proteínas ribulose bifosfato carboxilase (SAMP\_10752) e (SAMP\_8435), enzima chave no processo de assimilação de CO<sub>2</sub> em plantas, foi diminuída na presença do patógeno *S. sclerotiorum*, a primeira não foi expressa na presença do Trichoderma enquanto a segunda foi, porém apresentou uma maior expressão em PTS, a hipótese para esse comportamento é que o patógeno diminua a expressão delas para que assim diminua a taxa fotossintética da planta, que terá como consequência sua morte, dessa forma o fungo necrotrófico conseguiria se alimentar de seus tecidos mortos. Por outro lado, na interação dos 3, PTS, o simbiote Trichoderma é capaz de aumentar a expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo fotossintético da planta, como a ribulose bifosfato carboxilase, estimulando por sua vez o crescimento da planta e assim a ela responderia melhor a presença do patógeno.

A presença exclusiva de duas proteínas GSTs (material suplementar) e a expressão aumentada de outras GSTs na condição PTS no presente trabalho sugere que sua expressão pode ser induzida pelo isolado *T. asperellum* TR356 por causa da

presença do patógeno. O papel exato dela nessa interação não fica claro já que esta proteína está envolvida em vários mecanismos moleculares, provavelmente tem um papel importante na interação compatível feijoeiro/Sclerotinia. O aumento dessas cinco proteínas melhora a resposta de defesa de feijoeiro e pode agir como um elicitor de defesa, induzindo a expressão de outros genes de defesa.

Várias HSPs aparecem neste estudo confirmando seu papel na interação planta/patógeno. O review de Park and Seo (Park and Seo 2015) mostram que as HSPs estão envolvidas na defesa da planta contra estresse salino, hídrico, frio, altas temperaturas e o ataque de patógenos. As plantas respondem à invasão do patógeno usando diferentes respostas inatas mediadas pelos receptores PRRs (PAMPs) ou pelas proteínas R (proteínas de resistência – ETI), as HSPs têm um indispensável papel como chaperonas moleculares no controle da qualidade de PRRs presentes na membrana plasmática e proteínas R intracelulares contra invasores potenciais (Breiman 2014). As HSPs 81.4 e 90 (SAMP\_14944 e 16740 respectivamente) foram encontradas com a expressão aumentada nas condições PT e PTS sugerindo que sua expressão é induzida pelo *T. asperellum* TR274 (Figura 14 B).

HSP90 interage com proteínas R citoplasmáticas contendo os *nucleotide-binding domain* (NBD) e *leucine-rich repeats* (LRR), os quais medeiam a defesa contra patógenos. A HSP90, SGT1 (*suppressor of G-two allele of Skp1*) contém um domínio TPR e a RAR1 (*required for Mla12 resistance*) contém dois módulos ligantes de zinco chamados CHORD (*cysteine- and histidine-rich domain*) juntos formam um complexo molecular chaperona que está envolvido com a imunidade da planta (Kadota and Shirasu 2012). Não há descrição da função molecular especificamente da 81.4 e da 90.1 mas os resultados encontrados aqui nos levam a sugerir um papel na interação Planta-Trichoderma-patógeno induzido pelo simbionte.

As HSPs SAMP\_ 13174, 15877, 27945, 21768 e 16338 correspondendo as HSPs 70, 70.1, 70, 70.1 e 81.4 respectivamente presentes em PTS e PSS podem ter um papel importante na interação planta-patógeno (Figura 14B). As HSPs da família 70 são importantes chaperonas com papel crítico na resposta da planta a estresse biótico. HSPs 70 regulam a reprodução e movimento viral, os quais promovem a infecção viral (Hafren *et al.* 2010), elas melhoram a infecção de *N. benthamiana* pelo vírus do mosaico do tabaco, vírus da batata e vírus do mosaico da melancia (Chen *et al.* 2008).

A figura 14 C mostra um grupo de proteínas de feijoeiro que apresentam maior expressão na presença do patógeno, condição PSS. Desta se destaca a SAMP\_29732, uma osmotina. Essa PR-proteína (PR-5) tem sua expressão aumentada em plantas para em decorrência da presença de fungo fitopatogênico, desencando na planta uma resposta sistêmica adquirida (SAR) como já foi descrito na literatura. Porém, o interessante é que a presença do fungo *Trichoderma* diminui sua expressão conforme foi observado em PT e PTS. Essa menor expressão pode ser uma forma do fungo *Trichoderma* se defender do ataque da planta hospedeira, assim ele diminui a expressão de uma proteína que venha a lhe causar dano, mas em contra-partida aumenta a expressão de outras proteínas da planta voltadas para o ataque do patógeno.

Já o grupo representado na figura 14 D mostra um perfil de proteínas com maior expressão em feijoeiro quando o patógeno estava presente e que não há aumento significativo quando o simbionte está presente, mas quando os dois fungos estão presentes há uma maior expressão delas.

Com exceção da proteína de defesa quitinase A (SAMP\_11052) que está presente nas três condições, as demais têm uma abundância maior em PSS e PTS. A quitina e os fragmentos de quitina gerados a partir de sua degradação pela enzima quitinase são reconhecidos como PAMPs/MAMPs e desencadeam a PTI/MTI em plantas e induzem expressão de genes que vão codificar proteínas efetores que vão desencadear a ETI.

Os resultados observados para as demais proteínas desse grupo sugerem que a expressão delas é induzida pela presença do patógeno, sendo elas uma proteína *zinc finger* (CCCH-type), duas quitinases básicas, duas GH, duas serina endopeptidase do tipo subtilisina. Já a expressão da proteína adenosil L-dependente de metionina só é aumentada na presença do patógeno, sugerindo algum papel dela nessa interação.

A análise proteômica permitiu a identificação de algumas proteínas exclusivas para cada condição (Tabela suplementar 1), algumas chamam a atenção como a proteína *disease resistance protein* (TIR-NBS-LRR class) foi identificada na condição PTS. Essas proteínas codificadas por genes de resistência da planta contém dois domínios típicos: Um a *nucleotide binding site* (NBS) e um *leucine-rich repeat* (LRR). As proteínas NBS-LRR de plantas detectam moléculas efetoras de patógenos e insetos que são responsáveis pela virulência (Li *et al.*, 2012). Nosso resultado sugere que o reconhecimento das estruturas dos fungos é feito pelas proteínas NBS-LRR de feijoeiro,

esse reconhecimento podendo induzir respostas de defesa e resistência na planta do tipo ETI, corroborando os demais resultados discutidos no presente trabalho. Glazebrook e colaboradores (2005) mostraram que a indução de resistência mediada pelas proteínas NBS-LRR só é efetiva contra fungos biotróficos, mas os resultados sugerem que essas proteínas também medeiam os mecanismos de resistência de feijoeiro contra o patógeno necrotrófico em estudo, *S. sclerotiorum*.

Aqui também foi encontrada um Elongation factor Tu domain 2 (Ef Tu) de *T. asperellum* unicamente na condição PT, sugerindo que ele, agindo como um PAMP, pode estar sendo reconhecido pelos receptores específicos de feijoeiro e, conseqüentemente, desencadeando a PTI. O Ef-Tu é reconhecido por uma LRR-kinase em *Arabidopsis* (Zipfel *et al.* 2006). Uma peptidase M e uma proteína carbohidrato esterase da família 16 de *Trichoderma* também foram encontradas unicamente em PT, sugerindo um possível papel na interação planta-trichoderma.

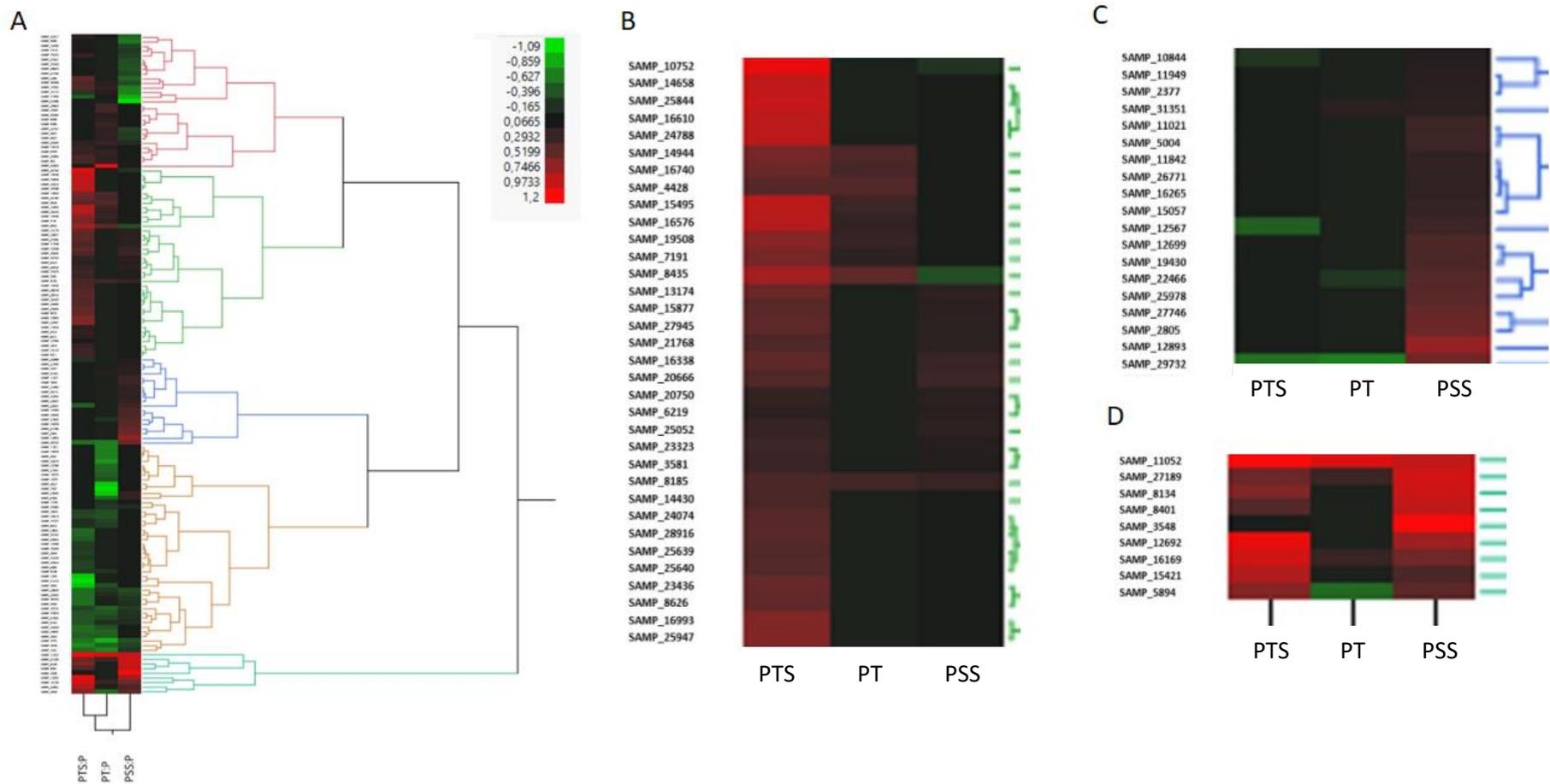


Figura 14. Análise em cluster das proteínas diferencial expressas em folhas feijoeiro na presença de *Trichoderma asperellum* TR 274 e *Sclerotinia sclerotiorum*, separadas em 5 cluster representados pelas cores a direita da figura A. Para melhor entendimento da figura ela foi desmembrada em B, C e D. A Lista com os nomes das proteínas correspondentes aos SAMPs números encontra-se em anexo, tabela suplementar 2.

## 5. CONCLUSÃO

Na relação simbiótica com feijoeiro comum, *T. asperellum* TR356 secretou algumas proteínas que já foram descritas como MAMPs/DAMPs e outras prováveis candidatas a efetores que estão envolvidas nessa interação, podendo atuar na colonização ou na indução de defesa da planta hospedeira.

A presença dos fungos no patossistema feijoeiro comum/*T. asperellum*/*S. sclerotium* altera a abundância de proteínas na planta hospedeira. O isolado *T. asperellum* TR356 presente na rizosfera de feijoeiro foi capaz de modular a abundância de proteínas relacionadas à resposta de defesa durante a interação com o patógeno *S. sclerotium*, sugerindo que o simbionte é capaz de induzir resposta sistêmica em folhas de feijoeiro. A presença do simbionte também aumenta a abundância de proteínas relacionadas ao metabolismo fotossintético e ao metabolismo básico da planta.

A maior abundância de proteínas envolvidas na via de síntese dos hormônios SA e JA confirma os dados da literatura sobre a resistência sistêmica induzida por *Trichoderma* ser sinalizada por esses dois hormônios simultaneamente. As proteínas envolvidas na cascata MAPK podem ter um papel importante nessa interação.

Este trabalho identificou algumas proteínas com um provavelmente papel em algum mecanismo de defesa e resistência. A validação funcional das proteínas na interação com feijoeiro e o patógeno poderá contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos no patossistema descrito no presente estudo, além de contribuir para a seleção de genes de resistência de feijoeiro ao patógeno *S. sclerotium*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdin MZ, Kiran U, Alam A. 2011.** Analysis of osmotin, a PR protein as metabolic modulator in plants. *Bioinformation* **5**: 336–40.
- Afzal AJ, Wood AJ, Lightfoot DA. 2008.** Plant Receptor-Like Serine Threonine Kinases: Roles in Signaling and Plant Defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 507–517.
- Agizzio AP, Da Cunha M, Carvalho AO, Oliveira MA, Ribeiro SF, Gomes VM. 2006.** The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. *Plant Sci.* **171**: 515–522.
- Bae C, Kim S min, Lee DJ, Choi D. 2013.** Multiple Classes of Immune-Related Proteases Associated with the Cell Death Response in Pepper Plants. *PLoS ONE* **8**.
- Bari R, Jones JDG. 2009.** Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* **69**: 473–488.
- Baud S, Dubreucq B, Miquel M, Rochat C, Lepiniec L. 2008.** Storage Reserve Accumulation in Arabidopsis: Metabolic and Developmental Control of Seed Filling. *The Arabidopsis Book* **6**: e0113.
- Beckers GJ, Conrath U. 2007.** Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 425–431.
- Bigirimana J, De Meyer G, Poppe J, Elad, Y, Hofte M. 1997.** Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. Mededelingen van de Faculteit Land bouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent. **62**: 1001-1007.
- Block A, Guo M, Li G, Elowsky C, Thomas E, Alfano JR. 2010.** Innate Immunity. *Cell* **12**: 1–24.
- Boersma JG, Hou A, Gillard CL, McRae KB, Conner RL. 2015.** Impact of common bacterial blight on the yield, seed weight and seed discoloration of different market

classes of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Canadian Journal of Plant Science* **95**: 703–710.

**Boller T, Felix G. 2009.** A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 379–406.

**Bos JIB, Chaparro-Garcia A, Quesada-Ocampo LM, McSpadden Gardener BB, Kamoun S. 2009.** Distinct amino acids of the *Phytophthora infestans* effector AVR3a condition activation of R3a hypersensitivity and suppression of cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 269–281.

**Breiman, A. 2014.** Plant Hsp90 and its co-chaperones. *Curr. Protein Pept. Sci.* **15**:232-244.

**Brotman Y, Briff E, Viterbo A, Chet I. 2008.** Role of Swollenin, an Expansin-Like Protein from *Trichoderma*, in Plant Root Colonization. *Plant Physiology* **147**: 779–789.

**Café Filho AC, Lobo JM. 2000.** Manejo de fatores físicos e culturais para controle de patógenos do solo. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* **8**: 267-301.

**Camejo D, Guzmán-Cedeño Á, Moreno A. 2016.** Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry* **103**: 10–23.

**Carvalho DDC, Geraldine AM, Junior ML, De Mello SCM. 2015.** Biological control of white mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **50**: 1220–1224.

**Cassetari Neto D, Machado AQ, Silva RA. (2010).** Manual de doenças de Soja. São Paulo: Cheminova Brasil LTDA. **57**.

**Chen M, Zhang B, Li C, Kulaveerasingam H, Chew FT, Yu H. 2015.** *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* Regulates the Accumulation of Seed Storage Reserves in Arabidopsis. *Plant Physiology* **169**: 391–402.

**Chen Z, Zhou, T., Wu, X., Hong, Y., Fan, Z. and Li, H. 2008.** Influence of cytoplasmic heat shock protein 70 on viral infection of *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant Pathol.* **9**:809-817.

- Chowdhury S, Basu A, Kundu S. 2017.** Overexpression of a New Osmotin-Like Protein Gene (SindOLP) Confers Tolerance against Biotic and Abiotic Stresses in Sesame. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1–16.
- Christensen AB, Cho BH, Naesby M, Gregersen PL, Brandt J, Madriz-Ordenana K, Collinge DB, Thordal-Christensen H. 2002.** The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis related proteins. *Mol Plant Pathol* **3**:135-144
- CONAB. 2017.** Acompanhamento da safra brasileira de grãos. *Monitoramento agrícola- Safra 2017* **4**: 1–98.
- CONAB. 2018.** 1. mercado nacional 1.1 feijão comum.
- Coppola V, Coppola M, Rocco M, et al. 2013.** Transcriptomic and proteomic analysis of a compatible tomato-aphid interaction reveals a predominant salicylic acid-dependent plant response. *BMC Genomics* **14**: 1.
- Dalio RJD, Magalhaes DM, Rodrigues CM, et al. 2017.** PAMPs, PRRs, effectors and R-genes associated with citrus-pathogen interactions. *Annals of Botany* **119**: 749–774.
- Dias LLC, Silveira V, Santa-Catarina C, Balbuena TS, Floh EIS. 2007.** Comparative analysis of the two-dimensional gel electrophoresis patterns during seed development in *Ocotea catharinensis*. *Proteomics*.
- Djonović S, Pozo MJ, Dangott LJ, Howell CR, Kenerley CM. 2006.** Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **19**: 838–53.
- Djonovic S, Vargas W a, Kolomiets M V, Horndeski M, Wiest A, Kenerley CM. 2007.** A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant physiology* **145**: 875–889.
- Dou D, Kale SD, Wang X, et al. 2008.** RXLR-Mediated Entry of *Phytophthora sojae* Effector Avr1b into Soybean Cells Does Not Require Pathogen-Encoded Machinery. *the Plant Cell Online* **20**: 1930–1947.
- Dubey MK, Jensen DF, Karlsson M. 2014.** Hydrophobins are required for conidial

hydrophobicity and plant root colonization in the fungal biocontrol agent *Clonostachys rosea*. *BMC Microbiology* **14**.

**Ekengren SK, Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP, Martin GB. 2003.** TwoMAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *Plant J.* **36**: 905–17

**Elmore JM, Lin ZD, Coaker G. 2012.** NIH Public Access. **14**: 365–371.

**EMBRAPA Arroz e feijão. 2011.** Doenças de feijoeiro. Brasília, DF

**EMBRAPA Arroz e feijão. 2016.** Dados conjunturais da produção de feijão comum (*Phaseolus vulgaris L.*) e caupi (*Vigna unguiculata (L.) Walp*) no Brasil (1985 a 2014): área, produção e rendimento. Santo Antônio de Goiás.

**FAO. 2017.** *FAO/INFOODS Databases FAO/INFOODS global food composition database for pulses Version 1.0 -uPulses1.0 User guide.*

**Figueiredo A, Fortes AM, Ferreira S, et al. 2008.** Transcriptional and metabolic profiling of grape (*Vitis vinifera L.*) leaves unravel possible innate resistance against pathogenic fungi. *Journal of Experimental Botany* **59**: 3371–3381.

**Figueiredo A, Monteiro F, Sebastiana M. 2014.** Subtilisin-like proteases in plant pathogen recognition and immune priming: a perspective. *Frontiers in Plant Science* **5**: 1–4.

**Flor HH. 1971.** Current status of the gene-for-gene concept. : 275–296.

**Fu ZQ, Dong X. 2013.** Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 839–863.

**Geromanos SJ, Vissers JPC, Silva JC, et al. 2009.** The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics* **9**: 1683–95.

**Gimenez-Ibanez S, Ntoukakis V, Rathjen JP. 2009.** The LysM receptor kinase CERK1 mediates bacterial perception in Arabidopsis. *Plant Signaling and Behavior* **4**: 539–541.

**Gomes EV, Costa M do N, de Paula RG, et al. 2015.** The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance

induction and self cell wall protection. *Scientific Reports* **5**: 17998.

**Gómez-Mendoza DP, Junqueira M, Do Vale LHF, et al. 2014.** Secretomic survey of trichoderma harzianum grown on plant biomass substrates. *Journal of Proteome Research* **13**: 1810–1822.

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

**Gohre V, Robatzek S. 2008.** Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology* **46**: 189–215.

**Greenboim-Wainberg Y, Maymon I, Borochoy R, Alvarez J, Olszewski N, Ori N, Eshed Y, Weiss D. 2005.** Cross talk between gibberellin and cytokinin: The Arabidopsis GA response inhibitor SPINDLY plays a positive role in cytokinin signaling. *Plant Cell.* **17**: 92–102

**Guo Y, Wang Z, Guan X, et al. 2017.** Proteomic analysis of *Potentilla fruticosa* L. leaves by iTRAQ reveals responses to heat stress. *PLoS ONE* **12**: 1–23.

**Gururani MA, Venkatesh J, Upadhyaya CP, Nookaraju A, Pandey SK, Park SW. 2012.** Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **78**: 51–65.

**Guzmán-Guzmán P, Alemán-Duarte MI, Delaye L, Herrera-Estrella A, Olmedo-Monfil V. 2017.** Identification of effector-like proteins in *Trichoderma* spp. and role of a hydrophobin in the plant-fungus interaction and mycoparasitism. *BMC Genetics* **18**: 16.

**Harman GE, Petzoldt R, Comis A, Chen J. 2004.** Interactions Between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and Maize Inbred Line Mo17 and Effects of These Interactions on Diseases Caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* **94**: 147–153.

**Hafren A, Hofius D, Ronnholm G, Sonnewald U, Makinen K. 2010.** HSP70 and its cochaperone CPIP promote potyvirus infection in *Nicotiana benthamiana* by regulating viral coat protein functions. *Plant cell.* **22**:523-535.

- Hamel LP, Nicole MC, Sritubtim S, Morency MJ, Ellis M, et al. 2006.** Ancient signals: comparative genomics of plantMAPK and MAPKK gene families. *Trends Plant Sci.* **11**:192–98.
- Heidel AJ, Clarke JD, Antonovics J, Dong X. 2004.** Fitness costs of mutations affecting the systemic acquired resistance pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **168**: 2197–2206.
- Hermosa R, Belén Rubio M, Cardoza RE, Nicolás C, Monte E, Gutiérrez S. 2013.** The contribution of Trichoderma to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology* **16**: 69–80.
- Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E. 2012.** Plant-beneficial effects of Trichoderma and of its genes. *Microbiology* **158**: 17–25.
- Huang Y, Mijiti G, Wang Z, et al. 2015.** Functional analysis of the class II hydrophobin gene HFB2-6 from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum* ACCC30536. *Microbiological Research* **171**: 8–20.
- Jones JDG, Dangl JL. 2006.** The plant immune system. *Nature Reviews* **444**: 323–329.
- Jordá L, Coego A, Conejero V, Vera P. 1999.** A genomic cluster containing four differentially regulated subtilisin- like processing protease genes is in tomato plants. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 2360–2365.
- Kadota Y, Shirasu K. 2012.** The HSP90 complex of plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**: 689-697.
- Kandath, P. K. & Mitchum, M. G. 2013.** War of the worms: how plants fight underground attacks. *Curr Opin Plant Biol* **16**: 457–463.
- Kamoun S. 2006.** A Catalogue of the Effector Secretome of Plant Pathogenic Oomycetes. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 41–60.
- Kim S, Ahn IP, Lee YH. 2001.** Analysis of genes expressed during rice-Magnaporthe grisea interactions. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **14**: 1340–6.
- Lakshman DK, Natarajan SS, Lakshman S, Garrett WM, Dhar AK. 2008.** Optimized protein extraction methods for proteomic analysis of *Rhizoctonia solani*. *Mycologia* **100**: 867–875.

- Lamdan N-L, Shalaby S, Ziv T, Kenerley CM, Horwitz B a. 2015.** Secretome of Trichoderma interacting with maize roots: role in induced systemic resistance. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **14**: 1054–63.
- Lee S, Fu F, Xu S, Lee SY, Yun D-J, Mengiste T. 2016.** Global regulation of plant immunity by histone lysine methyl transferases. *The Plant Cell* **28**: tpc.00012.2016.
- Leite RMVBDC. 2005.** Comunicado 76 Técnico. *Society*: 1–3.
- Li F, Pignatta D, Bendix C, Brunkard JO, Cohn MM, Tung J, Sun H, Kumar P, Baker B. 2012.** MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**:1790–1795.
- Li Y-B, Han L-B, Wang H-Y, et al. 2016.** The thioredoxin GbNRX1 plays a crucial role in homeostasis of apoplastic reactive oxygen species in response to Verticillium dahliae infection in cotton. *Plant physiology* **170**: 2392–2406.
- Lim CW, Baek W, Jung J, Kim JH, Lee SC. 2015.** Function of ABA in stomatal defense against biotic and drought stresses. *International Journal of Molecular Sciences* **16**: 15251–15270.
- Liu J, Peng H, Cui J, et al. 2016.** Molecular Characterization of A Novel Effector Expansin-like Protein from Heterodera avenae that Induces Cell Death in Nicotiana benthamiana. *Scientific Reports* **6**: 35677.
- Lobo JM. 2002.** Alien plant pathogens in Brazil. In: Pimentel, D. (Org.). Biological invasions: economic and environmental costs of alien plant, animal & microbe species. Boca Raton: CRC Press 69-88.
- Lobo Jr M, Geraldine AM, Diego D, Carvalho C. 2009.** Controle biológico de patógenos habitantes do solo com Trichoderma spp., na cultura do feijoeiro comum. *Circular Técnica* **85**: 3.
- Lorito M, Woo SL, Harman GE, Monte E. 2010.** Translational research on Trichoderma: from 'omics to the field. *Annual review of phytopathology* **48**: 395–417.
- Mackey D, Holt BF, Wiig A, Dangl JL. 2002.** RIN4 interacts with Pseudomonas syringae type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell* **108**: 743–754.

**MAPA. 2015. Feijão – Cultivo, produção e comércio.**

**Marra R, Ambrosino P, Carbone V, et al. 2006.** Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. : 307–321.

**Martínez-Medina A, Fernández I, Sánchez-Guzmán MJ, Jung SC, Pascual JA, Pozo MJ. 2013.** Deciphering the hormonal signalling network behind the systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* in tomato. *Frontiers in Plant Science* **4**: 1–12.

**Mathys J, De Cremer K, Timmermans P, et al. 2012.** Genome-Wide Characterization of ISR Induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma hamatum* T382 Against *Botrytis cinerea* Infection. *Frontiers in Plant Science* **3**: 108.

**Mauch F, Dudler R. 1993.** Differential Induction of Distinct Glutathione-S-Transferases of Wheat by Xenobiotics and by Pathogen Attack'. *Plant Physiol* **102**: 1193–1201.

**Mayo S, Cominelli E, Sparvoli F, et al. 2016.** Development of a qPCR Strategy to Select Bean Genes Involved in Plant Defense Response and Regulated by the *Trichoderma velutinum* – *Rhizoctonia solani* Interaction. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1109.

**Mbengue M, Navaud O, Peyraud R, et al. 2016.** Emerging Trends in Molecular Interactions between Plants and the Broad Host Range Fungal Pathogens *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1–9.

**Medina ML, Kiernan UA, Francisco WA. 2004.** Proteomic analysis of rutin-induced secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Fungal Genetics and Biology*. **41**: 327-335.

**Meng X, Zhang S. 2013.** MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling. *Annual Review of Phytopathology* **51**: 245–266.

**Miller RNG, Alves GSC, Van Sluys MA. 2017.** Plant immunity: Unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. *Annals of Botany* **119**: 681–687.

**Monaghan J, Zipfel C. 2012.** Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 349–357.

- Morán-Diez E, Rubio B, Domínguez S, Hermosa R, Monte E, Nicolás C. 2012.** Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* after 24h incubation with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Journal of Plant Physiology* **169**: 614–620.
- Monteiro F, Sebastiana M, Pais MS, Figueiredo A. 2013.** Reference gene selection and validation for the early responses to downy mildew infection in susceptible and resistant *Vitis vinifera* cultivars. *PLoS ONE* **8**:e72998. 10.1371
- Nawrocka J, Mallolepsza U. 2013.** Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological Control* **67**: 149–156.
- Nurbailis, Mardinus, Nasir N, Dharma A, Habazar T. 2016.** The chitinase activity in banana seedling that induced by *Trichoderma* spp. As resistance response to fusarium *Oxyporum* f.sp.cubense. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology* **6**: 356–360.
- Oliveira SHF. 2005.** Manejo do mofo-branco. *DBO Agrotecnologia*, São Paulo. **2**: 8-13.
- Oliveira MV, Santos F M, Bisinoto FF, Hamawaki OT. 2011.** Eficiência de fungicidas no controle da incidência e severidade do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) na cultura da soja. *Enciclopedia Biosfera*, Centro Científico Conhecer – Goiânia. **7**:12.
- Park OK. 2004.** Proteomic studies in plants. *J. Bioch. Mol. Biol.* **37**: 133-138.
- Park C-J, Seo Y-S. 2015.** Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. *The plant pathology journal* **31**: 323–33.
- Perchepied L, Balagué C, Riou C, et al. 2010.** Nitric oxide participates in the complex interplay of defense-related signaling pathways controlling disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **23**: 846–60.
- Pereira JL, Queiroz RML, Charneau SO, et al. 2014a.** Analysis of *Phaseolus vulgaris* response to its association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the presence or absence of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. *PLoS ONE* **9**.

- Pereira JL, Queiroz RML, Charneau SO, et al. 2014b.** Analysis of *Phaseolus vulgaris* response to its association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the presence or absence of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. *PLoS ONE* **9**.
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van Der Ent S, Van Wees SCM. 2009.** Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* **5**: 308–316.
- Pieterse CMJ, Pelt J a Van, Wees SCM Van, et al. 2005.** Indução De Resistência Sistêmica Por Rizobactérias E Comunicação Na Rota De Sinalização Para Uma Defesa Refinada. *Rapp* **13**: 277–295.
- Pieterse CMJ, van Wees S, van Pett J, et al. 1998.** A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1571–1580.
- Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakker PAHM. 2014.** Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology* **52**: 347–375.
- Pires CSS, Fontes EMG, Sujii ER. 2003.** Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas: O algodão como estudo de caso. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*
- Plett JM, Daguerre Y, Wittulsky S, et al. 2014.** Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus JAZ6* protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 8299–8304.
- Plett JM, Kemppainen M, Kale SD, et al. 2011.** A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Current Biology* **21**: 1197–1203.
- Plett JM, Martin F. 2012.** Poplar root exudates contain compounds that induce the expression of MiSSP7 in *Laccaria bicolor*. *Plant signaling & behavior* **7**: 12–5.
- Raffaele S, Kamoun S. 2012.** Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. *Nature Reviews Microbiology* **10(6)**:417-430.
- Ramada MHS, Steindorff AS, Bloch C, Ulhoa CJ. 2016.** Secretome analysis of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivated in different media supplemented with *Fusarium solani* cell wall or glucose. *Proteomics* **16**: 477–490.

- Rawat R, Tewari L. 2011.** Effect of abiotic stress on phosphate solubilization by biocontrol fungus *Trichoderma* sp.. *Curr Microbiol.***62(5)**:1521–6.17.
- Reape TJ, Molony EM, McCabe PF. 2008.** Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *J Exp Bot.* **59**: 435–444.
- Rosado A, Schapire AL, Bressan RA, et al. 2006.** The Arabidopsis Tetratricopeptide Repeat-Containing Protein TTL1 Is Required for Osmotic Stress Responses and Abscisic Acid Sensitivity. *Plant Physiology* **142**: 1113–1126.
- Roux M, Schwessinger B, Albrecht C, Chinchilla D, Jones A, et al. 2011.** The Arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Cell* **23**:2440–55
- Salas-marina MA, Isordia-jasso MI, Islas-osuna MA, Delgado-sánchez P. 2015.** The Epl1 and Sm1 proteins from *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma virens* differentially modulate systemic disease resistance against different life style pathogens in *Solanum lycopersicum*. **6**: 1–13.
- Salas-Marina MA, Silva-Flores MA, Uresti-Rivera EE, Castro-Longoria E, Herrera-Estrella A, Casas-Flores S. 2011.** Colonization of Arabidopsis roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *European Journal of Plant Pathology* **131**: 15–26.
- Scala A, Pazzagli L, Comparini C, Santini A, Tegli S, Cappugi G. 2004.** Ceratoplatenin, an early-produced protein by *Ceratocystis fimbriata* f.sp. platani, elicits phytoalexin synthesis in host and non-host plants. *Journal of Plant Pathology* **86**: 27–33.
- Schild F, Kieffer-Jaquinod S, Palencia A, et al. 2014.** Biochemical and biophysical characterization of the selenium-binding and reducing site in Arabidopsis thaliana homologue to mammals selenium-binding protein 1. *Journal of Biological Chemistry* **289**: 31765–31776.
- Schmutz J, McClean PE, Mamidi S, et al. 2014.** A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics* **46**: 707–713.

- Segarra G, Casanova E, Bellido D, Odena MA, Oliveira E, Trillas I. 2007.** Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics* **7**: 3943–3952.
- Shailendar Kumar M, Sriikiran Chakravarthy S, Babu PR, Rao K V., Reddy VD. 2015.** Classification of cytochrome P450s in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Systematics and Evolution* **301**: 211–216.
- Sharma S, Aggarwal R, Yadav A, Gupta S. 2014.** Protein mapping of *Chaetomium globosum*, a potential biological control agent through proteomics approach. *J Plant Biochem Biotechnol* **23**:284–292
- Shoresh M, Harman GE, Mastouri F. 2010.** Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annual Review of Phytopathology* **48**: 21–43.
- Stangarlin JR, Schulz DG, Franzener G, Assi L, Schwan-Estrada KRF, Kuhn OJ. 2010.** Indução De Fitoalexinas Em Soja E Sorgo Por Preparações De *Saccharomyces Boulardii*. *Arq. Inst. Biol* **77**: 91–98.
- Stecca Steindorff A, Soller Ramada MH, Siqueira A, et al. 2014.** Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. *BMC Genomics* **15**.
- Steindorff AS, Henrique M, Ramada S, et al. 2014.** Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. : 1–14.
- Stergiopoulos I, de Wit PJGM. 2009.** Fungal Effector Proteins. *Annual Review of Phytopathology* **47**: 233–263.
- Sooriyaarachchi S, Jaber E, Covarrubias AS, Ubhayasekera W, Asiegbu FO and Mowbray SL. 2011.** Expression and betaglucan binding properties of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) antimicrobial protein (Sp-AMP). *Plant Mol Biol* **77**:33-45.
- Thomma BPHJ, Nürnberger T, Joosten MHJ. 2011.** Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *The Plant Cell* **23**: 4–15.

- Tjalsma H, Bolhuis JDH, 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 Reviews*. **64(3)**:515-547.
- Tu X, Liu Z, Zhang Z. 2018.** Comparative transcriptomic analysis of resistant and susceptible alfalfa cultivars (*Medicago sativa* L.) after thrips infestation. *BMC Genomics* **19**: 116.
- Uematsu K, Suzuki N, Iwamae T, Inui M, Yukawa H. 2012.** Increased fructose 1,6-bisphosphate aldolase in plastids enhances growth and photosynthesis of tobacco plants. *Journal of Experimental Botany* **63**: 3001–3009.
- Van Den Burg HA, Harrison SJ, Joosten MHAJ, Vervoort J, de Wit PJGM. 2006.** *Cladosporium fulvum* Avr4 Protects Fungal Cell Walls Against Hydrolysis by Plant Chitinases Accumulating During Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 1420–1430.
- Van Loon L, Loon LC Van. 1997.** Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* **103**: 753–765.
- Van Loon LC, Van Strien EA. 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.
- Vartapetian AB, Tuzhikov AI, Chichkova N V, Taliansky M, Wolpert TJ. 2011.** A plant alternative to animal caspases : subtilisin-like proteases. *Cell Death and Differentiation* **18**: 1289–1297.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL, Lorito M. 2008.** Trichoderma-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 1–10.
- Viterbo A, Chet I. 2006.** TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Molecular Plant Pathology* **7**: 249–258.
- Viterbo A, Harel M, Chet I. 2004.** Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots. *FEMS Microbiology Letters* **238**: 151–158.

- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF. 2009.** Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology* **47**: 177–206.
- Walters DR, Ratsep J, Havis ND. 2013.** Controlling crop diseases using induced resistance: Challenges for the future. *Journal of Experimental Botany* **64**: 1263–1280.
- Wendland A, Lobo JM, Sartorato A, Rava Seijas CA. 2014.** Doenças da parte aérea. In: Gonzaga AC (Ed.). Feijão: o produtor pergunta, a Embrapa responde (Coleção 500 Perguntas, 500 Respostas). *EMBRAPA* **2**:153-161.
- Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Jan JX, Gooley AA, Hughes E, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF. 1996.** From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Nature Biotechnology* **14**: 61-65.
- Win J, Krasileva K V., Kamoun S, Shirasu K, Staskawicz BJ, Banfield MJ. 2012.** Sequence divergent RXLR effectors share a structural fold conserved across plant pathogenic oomycete species. *PLoS Pathogens* **8**: 1–5.
- Xiang T, Zong N, Zou Y, et al. 2008.** Pseudomonas syringae Effector AvrPto Blocks Innate Immunity by Targeting Receptor Kinases. *Current Biology* **18**: 74–80.
- Xu ZS, Li ZY, Chen Y, Chen M, Li LC, Ma YZ. 2012b.** Heat shock protein 90 in plants: molecular mechanisms and roles in stress responses. *Int. J. Mol. Sci.* **13**:15706-15723.
- Yang HH, Yang SL, Peng KC, Lo CT, Liu SY. 2009.** Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* **113**: 924–932.
- Yoshida H, Nagata M, Saito K, Wang KL, Ecker JR. 2005.** *Arabidopsis* ETO1 specifically interacts with and negatively regulates type 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases. *BMC Plant Biol.* **5**:14
- Zamioudis C, Pieterse CMJ. 2012.** Modulation of Host Immunity by Beneficial Microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**: 139–150.
- Zhang S, Klessig DF. 2001.** MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science* **6**: 520–527.
- Zhu B, Chen THH, Li PH. 1995.** Expression of three osmotin-like protein genes in

response to osmotic stress and fungal infection in potato. *Plant Molecular Biology* **28**: 17–26.

**Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, Felix G. 2006.** Perception of the bacterial PAMPEF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell* **125**: 749–760.

**Zipfel C, Robatzek. 2010.** Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity. *Cmaj* **138**: 413–418.

**Zurbriggen MD, Carrillo N, Hajirezaei MR. 2010.** ROS signaling in the hypersensitive response: When, where and what for? *Plant Signaling and Behavior* **5**: 393–396.

## 8. ANEXO

Tabela suplementar 1. Proteínas unicas identificadas nas folhas de *Phaseolus vulgaris* cultivado com patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (PSS) e *Trichoderma asperellum* TR 356 (PT) e com os dois fungos simultaneamente (PTS).

Accession	Description	Score	Protein name
<b>CONDIÇÃO PSS</b>			
SAMP_12664	Phvul 011G177000	949,63	Glycosyl hydrolase superfamily protein
SAMP_12807	Phvul 011G062400	595,76	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
SAMP_13783	Phvul 008G255000	1269	Ribosomal protein L30/L7 family protein
SAMP_16438	Phvul 008G176700	628,15	ascorbate peroxidase 4
SAMP_16439	Phvul 008G176700	445,45	ascorbate peroxidase 4
SAMP_18344	Phvul 004G099600	910,52	receptor like protein 43 (LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase)
SAMP_19497	Phvul 007G260000	1774,12	actin-11
SAMP_19737	Phvul 007G145200	853,43	Histone superfamily protein
SAMP_26138	Phvul 006G148600	525,13	F-box family protein with a domain of unknown function (DUF295)
SAMP_26702	Phvul 006G151800	862,95	peroxiredoxin IIF
SAMP_27357	Phvul 006G197200	2403,28	CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein
SAMP_28166	Phvul 002G028000	576,5	Protein phosphatase 2C family protein
SAMP_4960	Phvul 003G020000	15,29	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
<b>CONDIÇÃO PT</b>			
SAMP_10959	Phvul 011G139100	3777,71	Thiamine biosynthesis Thi4 protein
SAMP_11132	Phvul 011G044000	44,05	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase family protein
SAMP_1177	Phvul 010G136300	360,81	ATP-dependent RNA helicase eIF4A
SAMP_1178	Phvul 010G136300	360,81	ATP-dependent RNA helicase eIF4A
SAMP_11864	jgi Triasp1 470558 g	574,17	GPR1/FUN34/YaaH-class plasma membrane protein
SAMP_12443	Phvul 011G048000	801,69	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
SAMP_12904	Phvul 011G029800	512,18	photosystem II stability/assembly factor
SAMP_13452	Phvul 008G100400	441,84	laccase 17

SAMP_13931	Phvul 008G116500	658,17	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
SAMP_14442	Phvul 008G133000	524,53	Galactosyltransferase family protein
SAMP_14770	Phvul 008G051700	489,04	2-phosphoglycolate phosphatase 1
SAMP_15565	Phvul 008G116600	176,85	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
SAMP_17091	Phvul 004G169500	845,42	Domain of unknown function (DUF313)
SAMP_1837	Phvul 010G084600	504,55	AT-hook motif nuclear-localized protein 1
SAMP_18383	Phvul 004G057700	67,02	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2
SAMP_1863	Phvul 010G135800	59,38	lipoxygenase 1
SAMP_19281	Phvul 007G162900	733,49	Ribosomal protein L4/L1 family
SAMP_19296	Phvul 007G040700	447,63	S-methyl-5-thioribose kinase
SAMP_20109	Phvul 007G235600	742,83	AMMECR1 family
SAMP_20561	Phvul 007G055800	59,38	Lipoxygenase
SAMP_20711	Phvul 007G202900	640,07	agenet domain-containing protein
SAMP_20859	Phvul 007G064900	778,31	phosphoglucomutase
SAMP_21752	Phvul 007G023200	676,53	clathrin adaptor complexes medium subunit family protein
SAMP_22518	Phvul 001G218300	502,28	Class II aaRS and biotin synthetases superfamily protein
SAMP_22703	Phvul 001G264000	434,2	Nucleic acid-binding proteins superfamily
SAMP_22880	Phvul 001G251800	119,29	peroxisomal ABC transporter 1
SAMP_2304	jgi Triasp1 303982 C	534,82	Peptidase M
SAMP_25148	Phvul 006G194800	703,48	Quinone reductase family protein
SAMP_25590	Phvul 006G192500	442,16	ARM repeat superfamily protein
SAMP_25760	Phvul 006G199800	944,01	mitochondrial HSO70 2
SAMP_26629	Phvul 006G220100	444,8	Translation elongation factor EF1B, gamma chain
SAMP_26655	Phvul 006G093400	1062,28	no found
SAMP_27198	Phvul 006G164100	549,34	Protein of unknown function, DUF642

SAMP_27915	Phvul 002G302900	567,48	acetyl Co-enzyme a carboxylase biotin carboxylase subunit
SAMP_28022	Phvul 002G299000	429,38	phosphoinositide 4-kinase gamma 4
SAMP_28887	Phvul 002G090900	994,85	eukaryotic elongation factor 5A-1
SAMP_28975	Phvul 002G033100	543,06	no found
SAMP_29089	Phvul 002G309500	705,19	AGAMOUS-like 91/ Transcription factor, MADS-box
SAMP_29762	Phvul 002G102800	417,36	beta glucosidase 40
SAMP_2992	Phvul 003G294900	565,35	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
SAMP_30488	Phvul 002G032900	760,69	no found
SAMP_30827	Phvul 002G215800	588,69	mitochondrial HSO70 2
SAMP_31232	Phvul 002G175500	59,38	Lipoxygenase
SAMP_3344	Phvul 003G090900	943,55	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein
SAMP_4183	Phvul 003G096400	451,93	multifunctional protein 2
SAMP_4993	Phvul 003G194200	64,4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-related protein
SAMP_6258	Phvul 009G156600	293,13	plant U-box 22
SAMP_6552	Phvul 009G072300	524,05	endoplasmic reticulum-type calcium-transporting ATPase 3
SAMP_7286	Phvul 009G018700	839,26	ABA-responsive element binding protein 3
SAMP_7538	Phvul 009G023100	63,26	Glucose-1-phosphate adenyltransferase family protein
SAMP_7805	jgi Triasp1 446228 f	547,94	Carbohydrate esterase family 16 protein
SAMP_7871	Phvul 009G230600	929,93	eukaryotic translation initiation factor 4A1
SAMP_8469	Phvul 009G079100	603,04	eukaryotic translation initiation factor 4A1
SAMP_8577	jgi Triasp1 3399 CE	487,97	hypothetical protein
SAMP_8670	jgi Triasp1 338161 g	753,19	no annotation
SAMP_8692	Phvul 005G157000	59,38	Lipoxygenase
SAMP_8701	Phvul 005G157100	566,5	eif4a-2
SAMP_9221	Phvul 005G031000	444,02	Ribosomal RNA processing Brix domain protein
SAMP_9600	jgi Triasp1 447626 f	564	Elongation factor Tu domain 2
SAMP_9673	Phvul 005G075400	521,69	no annotation

## CONDIÇÃO PTS

SAMP_10139	Phvul 005G137400	6,53	carbamoyl phosphate synthetase B
SAMP_10189	Phvul 005G154100	709	glyoxalase 2-4
SAMP_10829	Phvul 011G101200	666,52	basic leucine zipper 9
SAMP_10978	Phvul 011G173900	2684,6	SOUL heme-binding family protein
SAMP_11806	Phvul 011G066700	644,16	Ras-related small GTP-binding family protein
SAMP_14181	Phvul 008G171600	562,92	Phosphoglycerate mutase family protein
SAMP_14240	Phvul 008G267500	48,93	DEA(D/H)-box RNA helicase family protein
SAMP_14579	Phvul 008G285100	626,01	photosystem II light harvesting complex gene 2.1
SAMP_14906	Phvul 008G093700	652,5	ferretin 1
SAMP_15248	Phvul 008G249500	650,23	Peroxidase superfamily protein
SAMP_15334	Phvul 008G195600	1932,19	glutathione S-transferase PHI 9
SAMP_15768	Phvul 008G195500	714,47	glutathione S-transferase PHI 9
SAMP_1587	Phvul 010G041700	581,55	GroES-like family protein
SAMP_16440	Phvul 008G107900	6,53	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
SAMP_17290	Phvul 004G013500	20719,3	carbonic anhydrase 1
SAMP_18663	Phvul 004G057600	0	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2
SAMP_19150	Phvul 007G022500	1701,03	ferredoxin 3
SAMP_19720	Phvul 007G152500	48,93	glutamate-ammonia ligases
SAMP_20952	Phvul 007G239500	1032,18	no found
SAMP_21679	Phvul 007G189300	6,53	Myosin family protein with Dil domain
SAMP_22000	Phvul 001G234300	5184,38	rubisco activase
SAMP_22001	Phvul 001G234300	5184,38	rubisco activase
SAMP_24071	Phvul 001G224100	765,01	Photosystem II reaction center PsbP family protein
SAMP_24831	Phvul 001G010500	29,43	GTP1/OBG family protein

SAMP_25339	Phvul 006G063000	738,04	Duplicated homeodomain-like superfamily protein
SAMP_2539	Phvul 003G020600	671,3	Ribosomal protein L10 family protein
SAMP_25440	Phvul 006G135500	48,93	seed imbibition 2
SAMP_27642	Phvul 006G118100	631,7	ATP-citrate lyase B-1
SAMP_27702	Phvul 006G097000	1825,83	copper/zinc superoxide dismutase 1
SAMP_28663	Phvul 002G196400	545,78	chlorophyll A/B binding protein 1
SAMP_29945	Phvul 002G074600	835,18	Ribosomal protein L10 family protein
SAMP_3060	Phvul 003G131400	2118,68	germin 3
SAMP_31256	Phvul 002G257600	1479,3	no found
SAMP_4074	jgi Triasp1 511036 e	803,62	hypothetical protein
SAMP_4160	Phvul 003G097700	48,93	no found
SAMP_4448	Phvul 003G153000	605,66	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein
SAMP_467	Phvul 010G101200	48,93	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative
SAMP_4731	Phvul 003G005200	6,53	myosin 2
SAMP_6192	Phvul 009G056700	48,93	J-domain protein required for chloroplast accumulation response 1
SAMP_6460	Phvul 009G117700	738,13	Ribosomal protein L3 family protein
SAMP_6522	Phvul 009G254300	743,85	beta-xylosidase 1
SAMP_6538	Phvul 009G111500	37,88	NADP-malic enzyme 3
SAMP_74	Phvul 010G139300	635,69	beta galactosidase 1
SAMP_7934	Phvul 009G226700	814,27	aldehyde dehydrogenase 7B4
SAMP_8709	Phvul 005G065700	782,34	D-mannose binding lectin protein with Apple-like carbohydrate-binding domain
SAMP_8817	Phvul 005G034700	1848,18	
SAMP_9129	Phvul 005G059200	124,06	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of plastid 2
SAMP_925	Phvul 010G129900	1189,17	germin-like protein 1
SSsamp_1430	jgi Scsc1 1430 SS10	1074,31	hydrogen ion transmembrane transporter activity
SSsamp_1923	jgi Scsc1 1923 SS10	1596,97	no annotation
SSsamp_2277	jgi Scsc1 2277 SS10	881,58	protein binding
SSsamp_316	jgi Scsc1 316 SS1G	1028,94	Mitochondrial ribosomal protein L27

Tabela suplementar 2. Nomes das proteínas correspondentes aos números de acesso SAMPs e suas cores de acordo com a análise de cluster.

Número SAMP_	Nome da proteína
10377	<i>Aldolase</i>
4686	<i>Tioredoxina</i>
12290	<i>fructose-bisphosphate aldolase 2</i>
23101	<i>glutamate synthase 1</i>
25626	<i>Ferredoxina</i>
27627	<i>glutamine synthetase 2</i>
27628	<i>glutamine synthetase 2</i>
28823	<i>alanine-2-oxoglutarate aminotransferase 2</i>
27766	<i>phosphoribulokinase</i>
1385	<i>xylulose 5-phosphate reductoisomerase</i>
30308	<i>Aldolase-type TIM barrel family protein</i>
17505	<i>ribulose bisphosphate carboxylase small chain 1A</i>
15175	<i>rubisco activase</i>
21999	<i>rubisco activase</i>
27546	<i>Glycine cleavage T-protein family</i>
14459	<i>serine hydroxymethyltransferase 2</i>
22041	<i>chloroplast RNA binding</i>
26382	<i>chloroplast heat shock protein 70-2</i>
8088	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit</i>
8580	<i>phosphoglycerate kinase</i>
15767	<i>photosystem II subunit P-1</i>
4697	<i>photosystem II subunit P-1</i>
9027	<i>Phosphoglycerate kinase family protein</i>
22990	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit</i>
8579	<i>phosphoglycerate kinase</i>
23445	<i>2-cysteine peroxiredoxin B</i>
802	<i>rubisco activase</i>
22603	<i>Aldolase-type TIM barrel family protein</i>
10752	<i>ribulose-bisphosphate carboxylases</i>
14658	<i>glutathione S-transferase TAU 8</i>
25844	<i>seed storage 2S albumin superfamily protein</i>
16610	<i>Subtilisin-like serine endopeptidase family protein</i>
24788	<i>selenium-binding protein 2</i>
14944	<i>HEAT SHOCK PROTEIN 81.4</i>
16740	<i>heat shock protein 90.1</i>
4428	<i>serine transhydroxymethyltransferase 1</i>
15495	<i>Subtilisin-like serine endopeptidase family protein</i>
16576	<i>no result</i>
19508	<i>Lactate/malate dehydrogenase family protein</i>
7191	<i>germin 3</i>
8435	<i>ribulose-bisphosphate carboxylases</i>
13174	<i>heat shock protein 70</i>
15877	<i>heat shock cognate protein 70-1</i>
27945	<i>Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein</i>
21768	<i>heat shock cognate protein 70-1</i>
16338	<i>HEAT SHOCK PROTEIN 81.4</i>
20666	<i>photosystem II reaction center PSB28 protein</i>
20750	<i>ATP synthase alpha/beta family protein</i>

6219	<i>CLPC homologue 1</i>
25052	<i>heat shock cognate protein 70-1</i>
23323	<i>no result</i>
3581	<i>Glycine cleavage T-protein family</i>
8185	<i>no result</i>
14430	<i>Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein</i>
24074	<i>triosephosphate isomerase</i>
28916	<i>aconitase 1</i>
25639	<i>alanine:glyoxylate aminotransferase</i>
25640	<i>alanine:glyoxylate aminotransferase</i>
23436	<i>Cobalamin-independent synthase family protein</i>
8626	<i>triosephosphate isomerase</i>
16993	<i>Cobalamin-independent synthase family protein</i>
25947	<i>heat shock protein 70B</i>
15454	<i>Aldolase superfamily protein</i>
2313	<i>ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase 1</i>
6571	<i>Cytosol aminopeptidase family protein</i>
17289	<i>carbonic anhydrase 1</i>
1819	<i>vacuolar ATP synthase subunit A</i>
23153	<i>Enolase</i>
8311	<i>RAB GTPase homolog E1B</i>
10844	<i>ascorbate peroxidase 1</i>
11949	<i>Lactate/malate dehydrogenase family protein</i>
2377	<i>heat shock protein 70B</i>
31351	<i>Single hybrid motif superfamily protein</i>
11021	<i>proteasome alpha subunit A1</i>
5004	<i>carboxyesterase 13</i>
11842	<i>Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein</i>
26771	<i>heat shock cognate protein 70-1</i>
16265	<i>ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase 2</i>
15057	<i>Glutaredoxin family protein</i>
12567	<i>rotamase CYP 3</i>
12699	<i>Ribosomal protein L11 family protein</i>
19430	<i>thioredoxin family protein</i>
22466	<i>no result</i>
25978	<i>2Fe-2S ferredoxin-like superfamily protein</i>
27746	<i>profilin 2</i>
2805	<i>MLP-like protein 423</i>
12893	<i>Kunitz family trypsin and protease inhibitor protein</i>
29732	<i>osmotin 34</i>
11811	<i>lipoxygenase 2</i>
24979	<i>rotamase CYP 4</i>
9567	<i>NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein</i>
16679	<i>no result</i>
12788	<i>chaperonin-60alpha</i>
17291	<i>carbonic anhydrase 1</i>
19776	<i>cyclophilin 20-2</i>
16771	<i>actin-11</i>
2813	<i>oxophytodienoate-reductase 3</i>
7347	<i>Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein</i>

13026	<i>copper/zinc superoxide dismutase 2</i>
6364	<i>MLP-like protein 423</i>
12291	<i>fructose-bisphosphate aldolase 2</i>
23686	<i>2-cysteine peroxiredoxin B</i>
24414	<i>Thioredoxin superfamily protein</i>
27577	<i>2Fe-2S ferredoxin-like superfamily protein</i>
6872	<i>catalase 2</i>
14851	<i>ADP glucose pyrophosphorylase 1</i>
25102	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C subunit 1</i>
29455	<i>carbonic anhydrase 2</i>
16098	<i>actin-11</i>
26443	<i>actin-11</i>
3604	<i>Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein</i>
25239	<i>actin-11</i>
16416	<i>high cyclic electron flow 1</i>
6866	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2</i>
8108	<i>chaperonin 20</i>
1266	<i>photosystem II subunit Q-2</i>
21210	<i>cyanase</i>
9900	<i>TCP-1/cpn60 chaperonin family protein</i>
18699	<i>chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa</i>
19303	<i>Transketolase</i>
30243	<i>photosystem II subunit O-2</i>
4296	<i>PS II oxygen-evolving complex 1</i>
18732	<i>hydroxypyruvate reductase</i>
27824	<i>peroxisomal NAD-malate dehydrogenase 2</i>
27825	<i>peroxisomal NAD-malate dehydrogenase 2</i>
6162	<i>plastocyanin 1</i>
22664	<i>Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein</i>
24847	<i>catalase 2</i>
7659	<i>Stress responsive alpha-beta barrel domain protein</i>
3276	<i>ATP synthase delta-subunit gene</i>
4358	<i>Transketolase</i>
7291	<i>thioredoxin M-type 4</i>
11052	<i>chitinase A</i>
27189	<i>zinc finger (CCCH-type) family protein / D111/</i>
8134	<i>basic chitinase</i>
8401	<i>basic chitinase</i>
3548	<i>S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein</i>
12692	<i>Glycosyl hydrolase superfamily protein</i>
16169	<i>Subtilisin-like serine endopeptidase family S8; S53</i>
15421	<i>Subtilisin-like serine endopeptidase family protein</i>
5894	<i>Glycosyl hydrolase superfamily protein</i>

Tabela suplementar 3. Proteínas com abundância diferencial em folhas de feijoeiro quando cultivado com *Sclerotinia sclerotiorum* (PSS), *Trichoderma asperellum* TR356 (PT) e os dois fungos simultaneamente (PTS).

Accession	Description	Protein name	GO	Score	PSS:P_Ratio	PSS:P_Log(e)Ratio	PSS:P_Log(e)StdDev	PSS:P_P
<b>CONDIÇÃO PSS</b>								
SAMP_10377	Phvul005G051800 1	Aldolase-type TIM barrel family protein	oxidoreductase activity	10377,99	0,511708569	-0,67	0,22	0
SAMP_12290	Phvul011G039100 1	fructose-bisphosphate aldolase 2	jasmonic acid biosynthetic process/oxidoreduction c	28528,77	0,683861412	-0,38	0,14	0
SAMP_15175	Phvul008G192400 1	rubisco activase	systemic acquired resistance, salicylic acid mediated :	5184,98	0,418951547	-0,87	0,47	0
SAMP_15767	Phvul008G196500 1	photosystem II subunit P-1	MAPK cascade	16158,01	0,677056884	-0,39	0,27	0
SAMP_17505	Phvul004G073400 1	ribulose bisphosphate carboxylase small chain 1A	photosynthesis	31201,89	0,436049294	-0,83	0,24	0
SAMP_18699	Phvul007G172100 1	chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa	photosynthesis	7917,54	0,618783398	-0,48	0,25	0
SAMP_18732	Phvul007G019300 1	hydroxypyruvate reductase	oxidoreductase activity	8985,42	0,726149042	-0,32	0,26	0
SAMP_19303	Phvul007G006600 1	Transketolase	chloroplast thylakoid membrane	17234,83	0,690734327	-0,37	0,11	0
SAMP_21999	Phvul001G234300 1	rubisco activase	defense response, incompatible interaction/systemic :	5718,93	0,326279793	-1,12	0,4	0
SAMP_27546	Phvul006G148700 1	Glycine cleavage T-protein family	glycine cleavage complex	1864,47	0,249075308	-1,39	0,96	0
SAMP_27627	Phvul006G155800 1	glutamine synthetase 2	hyperosmotic response/response to salt stress	3213,11	0,63128364	-0,46	0,23	0
SAMP_27628	Phvul006G155800 2	glutamine synthetase 2	hyperosmotic response/response to salt stress, temp	3213,11	0,618783398	-0,48	0,28	0
SAMP_27766	Phvul002G133100 1	phosphoribulokinase	MAPK cascade	11007,41	0,657046828	-0,42	0,18	0
SAMP_28823	Phvul002G150800 1	alanine-2-oxoglutarate aminotransferase 2	photorespiration/glycine:2-oxoglutarate aminotransfe	3020,02	0,600495585	-0,51	0,4	0
SAMP_30243	Phvul002G024000 1	photosystem II subunit O-2	MAPK cascade	55834,18	0,763379486	-0,27	0,13	0
SAMP_3276	Phvul003G211100 1	ATP synthase delta-subunit gene	MAPK cascade and response to chitin	13371,07	0,600495585	-0,51	0,41	0
SAMP_4296	Phvul003G249800 2	PS II oxygen-evolving complex 1	MAPK cascade	52559,57	0,818730751	-0,2	0,1	0
SAMP_4358	Phvul003G037400 1	Transketolase	chloroplast thylakoid membrane	9091,38	0,690734327	-0,37	0,19	0
SAMP_4697	Phvul003G247600 1	photosystem II subunit P-1	MAPK cascade	18308,32	0,733446954	-0,31	0,2	0
SAMP_6162	Phvul009G020300 1	plastocyanin 1	cysteine biosynthetic process	55314,65	0,826959136	-0,19	0,08	0
SAMP_1385	Phvul010G023000 1	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	oxidoreductase activity	3153,01	0,522045789	-0,65	0,54	0,01
SAMP_23101	Phvul001G123900 1	glutamate synthase 1	defense response, incompatible interaction and resp	1334,85	0,755783741	-0,28	0,24	0,01
SAMP_27824	Phvul002G216800 2	peroxisomal NAD-malate dehydrogenase 2	oxidoreductase activity	13940,95	0,794533599	-0,23	0,2	0,01
SAMP_30308	Phvul002G180300 1	Aldolase-type TIM barrel family protein	oxidoreductase activity/oxidation-reduction process	1626,77	0,63128364	-0,46	0,41	0,01
SAMP_10752	Phvul011G089000 1	ribulose-bisphosphate carboxylases	calcium-dependent cell-cell adhesion/integral to meml	57771,93	0,794533599	-0,23	0,21	0,02
SAMP_22990	Phvul001G098100 1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subu	oxidoreductase activity,	12050,98	0,835270205	-0,18	0,16	0,02

SAMP_4686	Phvul003G128100	1 Thioredoxin superfamily protein	plasma membrane	6506,18	0,463013077	-0,77	0,78	0,02
SAMP_9027	Phvul005G050700	1 Phosphoglycerate kinase family protein	cysteine biosynthetic process, MEMBRANE	6134,53	0,718923724	-0,33	0,3	0,02
SAMP_23686	Phvul001G194200	1 2-cysteine peroxiredoxin B	MAPK cascade	43015,56	0,835270205	-0,18	0,19	0,03
SAMP_8435	Phvul009G144500	1 ribulose-bisphosphate carboxylases	calcium-dependent cell-cell adhesion	6646,12	0,625002269	-0,47	0,39	0,03
SAMP_25626	Phvul006G216600	1 2Fe-2S ferredoxin-like superfamily protein	protein binding	114056,1	0,697676316	-0,36	0,41	0,04
SAMP_27825	Phvul002G216800	1 peroxisomal NAD-malate dehydrogenase 2	oxidoreductase activity	13940,95	0,818730751	-0,2	0,2	0,04
SAMP_7291	Phvul009G133900	1 thioredoxin M-type 4	protein binding	9388,97	0,755783741	-0,28	0,33	0,04
SAMP_15057	Phvul008G156300	1 Glutaredoxin family protein	protein disulfide oxidoreductase activity	4263,94	1,648721271	0,5	0,47	0,95
SAMP_3581	Phvul003G080400	1 Glycine cleavage T-protein family	glycine cleavage complex	8017,62	1,309964465	0,27	0,28	0,95
SAMP_13026	Phvul011G086300	1 copper/zinc superoxide dismutase 2	cellular response to oxidative stress	1311,76	1,665291179	0,51	0,56	0,97
SAMP_23323	Phvul001G238100	1 no result	no result	1337,26	1,323129814	0,28	0,32	0,97
SAMP_2377	Phvul003G154800	1 heat shock protein 70B	response to endoplasmic reticulum stress/response t	2441,65	1,404947596	0,34	0,32	0,97
SAMP_27945	Phvul002G301400	1 Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	endoplasmic reticulum	910,87	1,476980773	0,39	0,37	0,97
SAMP_5004	Phvul003G295200	1 carboxyesterase 13	nucleus	889,86	1,840431425	0,61	0,51	0,97
SAMP_12699	Phvul011G079400	1 Ribosomal protein L11 family protein	RNA methylation/ribosome biogenesis/response to c	1597,73	2,270499821	0,82	0,74	0,98
SAMP_11021	Phvul011G155200	1 proteasome alpha subunit A1	endopeptidase activity/response to zinc ion/proteoly:	1174,1	1,822118844	0,6	0,46	0,99
SAMP_11052	Phvul011G167300	1 chitinase A	defense response to fungus/chitinase activity	746,21	6,619368586	1,89	1,2	0,99
SAMP_15421	Phvul008G229100	1 Subtilisin-like serine endopeptidase family protein	serine-type endopeptidase activity/negative regulati	180,23	2,181472203	0,78	0,68	0,99
SAMP_20666	Phvul007G153500	1 photosystem II reaction center PSB28 protein	plasma membrane-derived thylakoid photosystem II	3877,64	1,840431425	0,61	0,45	0,99
SAMP_20750	Phvul007G034800	1 ATP synthase alpha/beta family protein	response to cadmium ion	3932,82	1,41906754	0,35	0,34	0,99
SAMP_21768	Phvul007G157200	1 heat shock cognate protein 70-1	response to salt stress/negative regulation of seed ge	3714,25	1,476980773	0,39	0,28	0,99
SAMP_3548	Phvul003G263600	1 S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransfer	chloroplast	40,46	10,8049041	2,38	2,02	0,99
SAMP_6364	Phvul009G252400	1 MLP-like protein 423	defense response	3094,69	1,682027618	0,52	0,46	0,99
SAMP_10844	Phvul011G071300	1 ascorbate peroxidase 1	response to oxidative stress	15632,48	1,349858824	0,3	0,2	1
SAMP_11842	Phvul011G002100	1 Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family prot	integral to membrane	819,25	1,599994191	0,47	0,32	1
SAMP_11949	Phvul011G159000	1 Lactate/malate dehydrogenase family protein	defense response to bacterium	4662,81	1,377127754	0,32	0,23	1
SAMP_12567	Phvul011G026900	1 rotamase CYP 3	response to abscisic acid stimulus	14460,94	1,858928051	0,62	0,24	1
SAMP_12692	Phvul011G077900	1 Glycosyl hydrolase superfamily protein	defense response to fungus, incompatible interaction	485,2	5,002811299	1,61	1,1	1
SAMP_12893	Phvul011G169900	1 Kunitz family trypsin and protease inhibitor protein	response to hydrogen peroxide	1330,07	4,61817669	1,53	0,76	1
SAMP_13174	Phvul011G065000	1 heat shock protein 70	response to endoplasmic reticulum stress/ response t	4248,68	1,50681778	0,41	0,25	1
SAMP_15877	Phvul008G013000	1 heat shock cognate protein 70-1	response to bacterium	3642,02	1,462284582	0,38	0,26	1
SAMP_16169	Phvul008G229500	1 Subtilisin-like serine endopeptidase family S8; S53	serine-type endopeptidase activity	1571,54	3,287081395	1,19	0,33	1
SAMP_16265	Phvul008G189200	1 ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase 2	protein binding	5190,48	1,568312167	0,45	0,26	1
SAMP_16338	Phvul008G281400	1 HEAT SHOCK PROTEIN 81.4	response to stress	2012,37	1,733253039	0,55	0,43	1
SAMP_19430	Phvul007G215900	1 thioredoxin family protein	systemic acquired resistance	2191,56	2,203396474	0,79	0,48	1

SAMP_22466	Phvul001G024500 1	no result	no result	4659,77	2,459603053	0,9	0,14	1
SAMP_25052	Phvul001G169000 1	heat shock cognate protein 70-1	response to salt stress AND negative regulation of s	2588,33	1,476980773	0,39	0,29	1
SAMP_25978	Phvul006G216700 1	2Fe-2S ferredoxin-like superfamily protein	abscisic acid biosynthetic process	20249,71	2,559981412	0,94	0,33	1
SAMP_26771	Phvul006G170200 1	heat shock cognate protein 70-1	response to hydrogen peroxide	695,93	1,584073998	0,46	0,32	1
SAMP_27189	Phvul006G047900 1	zinc finger (CCCH-type) family protein / D111/G-patc	nucleus	3312,32	7,463317276	2,01	0,17	1
SAMP_27746	Phvul002G307700 1	profilin 2	protein binding/actin cytoskeleton organization	1715,4	2,915379653	1,07	0,98	1
SAMP_2805	Phvul003G109100 1	MLP-like protein 423	defense response	10277,35	3,158192834	1,15	0,25	1
SAMP_29732	Phvul002G155500 1	osmotin 34	defense response to fungus, incompatible interaction	3865,7	3,2219925	1,17	0,28	1
SAMP_31351	Phvul002G006000 1	Single hybrid motif superfamily protein	glycine cleavage complex	25429,91	1,447734622	0,37	0,16	1
SAMP_5894	Phvul009G256400 2	Glycosyl hydrolase superfamily protein	defense response to fungus, incompatible interaction	1977,74	2,664456293	0,98	0,33	1
SAMP_6219	Phvul009G162100 1	CLPC homologue 1	chloroplast organization	954,15	1,404947596	0,34	0,29	1
SAMP_8134	Phvul009G116600 1	basic chitinase	defense response to fungus	1225,29	7,242743123	1,98	0,62	1
SAMP_8185	Phvul009G059000 1	no result	no result	1319,72	1,716006899	0,54	0,4	1
SAMP_8401	Phvul009G116500 1	basic chitinase	chitinase activity/defense response to fungus	737,03	6,619368586	1,89	0,61	1

#### CONDIÇÃO PT

SAMP_18732	Phvul007G019300 1	hydroxypyruvate reductase	oxidoreductase activity	8985,42	0,726149042	-0,32	0,19	0
SAMP_3276	Phvul003G211100 1	ATP synthase delta-subunit gene	MAPK cascade/systemic acquired resistance, salicyl	13371,07	0,527292432	-0,64	0,31	0
SAMP_4358	Phvul003G037400 1	Transketolase	transketolase activity/chloroplast thylakoid membran	9091,38	0,718923724	-0,33	0,2	0
SAMP_6162	Phvul009G020300 1	plastocyanin 1	cysteine biosynthetic process	55314,65	0,913931182	-0,09	0,07	0
SAMP_27824	Phvul002G216800 2	peroxisomal NAD-malate dehydrogenase 2	regulation of photorespiration	13940,95	0,763379486	-0,27	0,15	0
SAMP_7291	Phvul009G133900 1	thioredoxin M-type 4	protein binding	9388,97	0,618783398	-0,48	0,25	0
SAMP_6872	Phvul009G011100 1	catalase 2	response to oxidative stress	7424,46	0,843664815	-0,17	0,11	0
SAMP_13026	Phvul011G086300 1	copper/zinc superoxide dismutase 2	response to stress	1311,76	0,49658531	-0,7	0,48	0
SAMP_16679	Phvul004G013600 1	no result	no result	1902,45	0,588604987	-0,53	0,37	0
SAMP_17291	Phvul004G013500 2	carbonic anhydrase 1	MAPK cascade	18332,12	0,704688094	-0,35	0,12	0
SAMP_27577	Phvul006G216800 1	2Fe-2S ferredoxin-like superfamily protein	protein binding	114056,1	0,818730751	-0,2	0,09	0
SAMP_7659	Phvul009G228300 1	Stress responsive alpha-beta barrel domain protein	cysteine biosynthetic process	2014,73	0,726149042	-0,32	0,29	0,01
SAMP_8108	Phvul009G224900 1	chaperonin 20	cysteine biosynthetic process/response to salt stres	36306,12	0,895834136	-0,11	0,09	0,01
SAMP_19776	Phvul007G001100 1	cyclophilin 20-2	protein histidine kinase binding	7674,62	0,726149042	-0,32	0,27	0,01
SAMP_24414	Phvul001G186000 1	Thioredoxin superfamily protein	defense response to bacterium	11119,06	0,763379486	-0,27	0,23	0,01
SAMP_24847	Phvul001G001000 1	catalase 2	response to oxidative stress	6273,29	0,71177032	-0,34	0,27	0,01
SAMP_6364	Phvul009G252400 1	MLP-like protein 423	defense response/response to biotic stimulus	3094,69	0,697676316	-0,36	0,37	0,01
SAMP_29732	Phvul002G155500 1	osmotin 34	defense response to fungus, incompatible interaction	3865,7	0,644036423	-0,44	0,37	0,01
SAMP_2813	Phvul003G131600 1	oxophytodienoate-reductase 3	response to wounding and to fungus	1145,94	0,49658531	-0,7	0,54	0,01
SAMP_23686	Phvul001G194200 1	2-cysteine peroxiredoxin B	MAPK cascade/systemic acquired resistance, salicyli	43015,56	0,860707971	-0,15	0,14	0,02

SAMP_12788	Phvul011G082600 1   chaperonin-60alpha	chloroplast stroma	2039,33	0,697676316	-0,36	0,33	0,02
SAMP_24979	Phvul001G219400 1   rotamase CYP 4	response to oxidative stress	1707,78	0,644036423	-0,44	0,43	0,02
SAMP_5894	Phvul009G256400 2   Glycosyl hydrolase superfamily protein	defense response to fungus, incompatible interaction	1977,74	0,697676316	-0,36	0,38	0,02
SAMP_11811	Phvul011G056500 1   lipoxygenase 2	response to fungus/to bacterium/to wounding	629,62	0,63128364	-0,46	0,44	0,02
SAMP_18699	Phvul007G172100 1   chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa	photosynthesis	7917,54	0,878095435	-0,13	0,14	0,03
SAMP_9567	Phvul005G034800 1   NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	plasma membrane	21,82	0,644036423	-0,44	0,44	0,03
SAMP_16771	Phvul004G001000 1   actin-11	actin cytoskeleton organization	4059,26	0,778800783	-0,25	0,31	0,03
SAMP_27825	Phvul002G216800 1   peroxisomal NAD-malate dehydrogenase 2	oxidoreductase activity	13940,95	0,818730751	-0,2	0,22	0,04
SAMP_22664	Phvul001G235600 1   Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	defense response to bacterium and response to cold	4077,57	0,778800783	-0,25	0,3	0,04
SAMP_12291	Phvul011G039100 2   fructose-bisphosphate aldolase 2	jasmonic acid biosynthetic process	23183,71	0,895834136	-0,11	0,11	0,04
SAMP_9900	Phvul005G051700 1   TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	chloroplast organization	3910,23	0,786627865	-0,24	0,23	0,04
SAMP_19303	Phvul007G006600 1   Transketolase	chloroplast thylakoid membrane	17234,83	0,93239382	-0,07	0,09	0,05
SAMP_18631	Phvul004G017000 1   cyclophilin 38	MAPK cascade and defense response, incompatible	3904,09	0,786627865	-0,24	0,23	0,05
SAMP_22466	Phvul001G024500 1   no result	no result	4659,77	0,886920439	-0,12	0,14	0,05
SAMP_7347	Phvul009G050400 1   Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	chloroplast thylakoid membrane	1530,99	0,463013077	-0,77	0,82	0,05
SAMP_21999	Phvul001G234300 1   rubisco activase	defense response, incompatible interaction/systemic acquired resistance	5718,93	1,1502738	0,14	0,16	0,95
SAMP_30308	Phvul002G180300 1   Aldolase-type TIM barrel family protein	oxidoreductase activity/oxidation-reduction process	1626,77	1,284025417	0,25	0,26	0,95
SAMP_7191	Phvul009G227800 1   germin 3	defense response to bacterium/nutrient reservoir activity	3166,55	1,349858824	0,3	0,32	0,95
SAMP_14459	Phvul008G184200 1   serine hydroxymethyltransferase 2	plant-type hypersensitive response/defense response	752,21	1,616074385	0,48	0,55	0,95
SAMP_8579	Phvul005G050800 2   phosphoglycerate kinase	response to endoplasmic reticulum stress	1068,8	1,41906754	0,35	0,37	0,96
SAMP_16740	Phvul004G107700 1   heat shock protein 90.1	response to stress/cellular response to calcium ion	764,86	1,665291179	0,51	0,52	0,96
SAMP_23418	Phvul001G035500 1   glycine decarboxylase P-protein 2	glycine cleavage complex	1090,56	1,258600015	0,23	0,22	0,97
SAMP_19508	Phvul007G273500 1   Lactate/malate dehydrogenase family protein	cellular carbohydrate metabolic process/nucleotide biosynthesis	1273,28	1,447734622	0,37	0,34	0,97
SAMP_10377	Phvul005G051800 1   Aldolase-type TIM barrel family protein	oxidoreductase activity	10377,99	1,1502738	0,14	0,11	0,98
SAMP_15495	Phvul008G229400 1   Subtilisin-like serine endopeptidase family protein	serine-type endopeptidase activity/ Metabolic process	1968,93	1,521961536	0,42	0,41	0,98
SAMP_15175	Phvul008G192400 1   rubisco activase	systemic acquired resistance, salicylic acid mediated	5184,98	1,258600015	0,23	0,18	0,99
SAMP_11052	Phvul011G167300 1   chitinase A	defense response to fungus/chitinase activity	746,21	4,095955267	1,41	1,16	0,99
SAMP_8185	Phvul009G059000 1   no result	no result	1319,72	1,616074385	0,48	0,34	0,99
SAMP_8580	Phvul005G050800 1   phosphoglycerate kinase	response to endoplasmic reticulum stress	8668,46	1,447734622	0,37	0,36	0,99
SAMP_23445	Phvul001G194100 1   2-cysteine peroxiredoxin B	systemic acquired resistance, salicylic acid mediated	44550,09	1,390968147	0,33	0,27	0,99
SAMP_15767	Phvul008G196500 1   photosystem II subunit P-1	MAPK cascade and defense response, incompatible	16158,01	1,363425117	0,31	0,14	1
SAMP_17505	Phvul004G073400 1   ribulose bisphosphate carboxylase small chain 1A	photosynthesis	31201,89	1,377127754	0,32	0,14	1
SAMP_4697	Phvul003G247600 1   photosystem II subunit P-1	MAPK cascade and defense response, incompatible	18308,32	1,404947596	0,34	0,11	1
SAMP_22990	Phvul001G098100 1   glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit	oxidoreductase activity	12050,98	1,447734622	0,37	0,11	1
SAMP_9027	Phvul005G050700 1   Phosphoglycerate kinase family protein	cysteine biosynthetic process	6134,53	1,349858824	0,3	0,15	1

SAMP_8435	Phvul009G144500	1 ribulose-bisphosphate carboxylases	calcium-dependent cell-cell adhesion	6646,12	1,973877746	0,68	0,34	1
SAMP_8088	Phvul009G006600	1 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subu	photosystem II assembly	9260,7	1,390968147	0,33	0,14	1
SAMP_4428	Phvul003G286600	1 serine transhydroxymethyltransferase 1	plant-type hypersensitive response	4949,73	1,840431425	0,61	0,25	1
SAMP_26382	Phvul006G219500	1 chloroplast heat shock protein 70-2	chloroplast organization	12957,51	1,271249144	0,24	0,18	1
SAMP_22041	Phvul001G223800	1 chloroplast RNA binding	MAPK cascade and defense response, incompatible	2940,05	1,632316236	0,49	0,18	1
SAMP_16169	Phvul008G229500	1 Subtilisin-like serine endopeptidase family protein	serine-type endopeptidase activity	1571,54	1,476980773	0,39	0,24	1
SAMP_27189	Phvul006G047900	1 zinc finger (CCCH-type) family protein / D111/	nucleus	3312,32	1,521961536	0,42	0,12	1
SAMP_31351	Phvul002G006000	1 Single hybrid motif superfamily protein	glycine cleavage complex	25429,91	1,309964465	0,27	0,11	1
SAMP_14944	Phvul008G281300	1 heat shock protein 81.4	response to stress	989,66	1,768267039	0,57	0,46	1
SAMP_16576	Phvul008G229300	1 no result	no result	1406,65	1,404947596	0,34	0,29	1
SAMP_22603	Phvul001G007700	1 Aldolase-type TIM barrel family protein	oxidoreductase activity	927,65	4,953032542	1,6	1,45	1
SAMP_802	Phvul010G016000	1 rubisco activase	MAPK cascade and defense response, incompatible	4503,13	1,404947596	0,34	0,2	1
<b>CONDIÇÃO PTS</b>								
SAMP_3276	Phvul003G211100	1 ATP synthase delta-subunit gene	MAPK cascade	13371,07	0,559898376	-0,58	0,27	0
SAMP_4358	Phvul003G037400	1 Transketolase	transketolase activity	9091,38	0,486752242	-0,72	0,15	0
SAMP_6162	Phvul009G020300	1 plastocyanin 1	cysteine biosynthetic process	55314,65	0,677056884	-0,39	0,08	0
SAMP_27824	Phvul002G216800	2 peroxisomal NAD-malate dehydrogenase 2	oxidoreductase activity	13940,95	0,670320042	-0,4	0,18	0
SAMP_7291	Phvul009G133900	1 thioredoxin M-type 4	protein binding	9388,97	0,594520559	-0,52	0,19	0
SAMP_27577	Phvul006G216800	1 2Fe-2S ferredoxin-like superfamily protein	protein binding	114056,1	0,878095435	-0,13	0,08	0
SAMP_7659	Phvul009G228300	1 Stress responsive alpha-beta barrel domain protein	cysteine biosynthetic process	2014,73	0,63128364	-0,46	0,41	0
SAMP_8108	Phvul009G224900	1 chaperonin 20	cysteine biosynthetic process/response to salt stress	36306,12	0,778800783	-0,25	0,09	0
SAMP_24414	Phvul001G186000	1 Thioredoxin superfamily protein	defense response to bacterium	11119,06	0,718923724	-0,33	0,21	0
SAMP_24847	Phvul001G001000	1 catalase 2	response to oxidative stress	6273,29	0,594520559	-0,52	0,33	0
SAMP_29732	Phvul002G155500	1 osmotin 34/Thaumatococcus-like protein PR-5b	defense response to fungus, incompatible interaction	3865,7	0,571209062	-0,56	0,32	0
SAMP_18699	Phvul007G172100	1 chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa	photosynthesis	7917,54	0,571209062	-0,56	0,15	0
SAMP_27825	Phvul002G216800	1 peroxisomal NAD-malate dehydrogenase 2	regulation of photorespiration/oxidoreductase activit	13940,95	0,677056884	-0,39	0,15	0
SAMP_22664	Phvul001G235600	1 Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily prote	chloroplast thylakoid /defense response to bacterium	4077,57	0,576949804	-0,55	0,39	0
SAMP_9900	Phvul005G051700	1 TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	chloroplast organization	3910,23	0,382892894	-0,96	0,41	0
SAMP_19303	Phvul007G006600	1 Transketolase	chloroplast thylakoid membrane	17234,83	0,576949804	-0,55	0,1	0
SAMP_4296	Phvul003G249800	2 PS II oxygen-evolving complex 1	MAPK cascade/regulation of response to biotic stim	52559,57	0,571209062	-0,56	0,07	0
SAMP_29455	Phvul002G071200	2 carbonic anhydrase 2	MAPK cascade/regulation of response to biotic stim	6143,52	0,65050909	-0,43	0,28	0
SAMP_30243	Phvul002G024000	1 photosystem II subunit O-2	MAPK cascade	55834,18	0,571209062	-0,56	0,07	0
SAMP_6866	Phvul009G168400	1 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2	response to salt stress	13689,79	0,740818212	-0,3	0,21	0
SAMP_25102	Phvul001G259000	1 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C subu	response to oxidative stress	611,72	0,612626388	-0,49	0,33	0
SAMP_1266	Phvul010G052300	1 photosystem II subunit Q-2	photosynthesis;photorespiration	18948,58	0,364218983	-1,01	0,27	0

SAMP_3604	Phvul003G0603001	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family	oxidoreductase activity	12774,53	0,763379486	-0,27	0,17	0
SAMP_12567	Phvul011G0269001	rotamase CYP 3	oxidoreductase activity	14460,94	0,63128364	-0,46	0,2	0
SAMP_21999	Phvul001G2343001	rubisco activase	MAPK cascade/systemic acquired resistance, salicyli	5718,93	0,637628159	-0,45	0,2	0
SAMP_18732	Phvul007G0193001	hydroxypyruvate reductase	oxidoreductase activity	8985,42	0,748263574	-0,29	0,22	0,01
SAMP_18631	Phvul004G0170001	cyclophilin 38	MAPK cascade/systemic acquired resistance, salicyli	3904,09	0,748263574	-0,29	0,23	0,01
SAMP_25239	Phvul006G2099001	actin-11	structural constituent of cytoskeleton	3707,5	0,818730751	-0,2	0,17	0,01
SAMP_26443	Phvul006G2098001	actin-11	actin cytoskeleton organization	3707,5	0,794533599	-0,23	0,17	0,01
SAMP_16416	Phvul008G1120001	high cyclic electron flow 1	photosynthesis	5024,48	0,733446954	-0,31	0,23	0,02
SAMP_16098	Phvul008G0110001	actin-11	structural constituent of cytoskeleton	2884,2	0,778800783	-0,25	0,17	0,02
SAMP_15175	Phvul008G1924001	rubisco activase	MAPK cascade	5184,98	0,802518799	-0,22	0,21	0,02
SAMP_21210	Phvul007G2750001	cyanase	response to salt stress	5099,56	0,336216482	-1,09	1,21	0,04
SAMP_6872	Phvul009G0111001	catalase 2	response to oxidative stress	7424,46	0,852143792	-0,16	0,16	0,05
SAMP_10844	Phvul011G0713001	ascorbate peroxidase 1	response to oxidative stress	15632,48	0,835270205	-0,18	0,18	0,05
SAMP_14851	Phvul008G2840001	ADP glucose pyrophosphorylase 1	photorespiration	1311,41	0,594520559	-0,52	0,62	0,05
SAMP_6571	Phvul009G1950001	Cytosol aminopeptidase family protein	aminopeptidase activity	1128,25	1,258600015	0,23	0,28	0,95
SAMP_6219	Phvul009G1621001	CLPC homologue 1	actin filament binding/proton-transporting ATPase ac	954,15	1,258600015	0,23	0,23	0,95
SAMP_8579	Phvul005G0508002	phosphoglycerate kinase	response to endoplasmic reticulum stress	1068,8	1,336427477	0,29	0,31	0,95
SAMP_16610	Phvul008G2289001	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein	serine-type endopeptidase activity	106,49	2,559981412	0,94	1,39	0,95
SAMP_20750	Phvul007G0348001	ATP synthase alpha/beta family protein	response to cadmium ion	3932,82	1,309964465	0,27	0,26	0,96
SAMP_1819	Phvul010G1639001	vacuolar ATP synthase subunit A	hyperosmotic response	1012,5	1,349858824	0,3	0,32	0,96
SAMP_12692	Phvul011G0779001	Glycosyl hydrolase superfamily protein	defense response to fungus, incompatible interactior	485,2	3,034358438	1,11	1,08	0,96
SAMP_15454	Phvul008G2820001	Aldolase superfamily protein	anthocyanin-containing compound biosynthetic pro	2432,78	1,221402762	0,2	0,2	0,96
SAMP_8401	Phvul009G1165001	basic chitinase	defense response to fungus	737,03	1,599994191	0,47	0,56	0,97
SAMP_23101	Phvul001G1239001	Glutamate synthase 1	defense response, incompatible interaction	1334,85	1,138828378	0,13	0,13	0,97
SAMP_28916	Phvul002G1050001	aconitase 1	response to reactive oxygen species and hyperosmo	452,23	1,632316236	0,49	0,46	0,98
SAMP_2313	Phvul003G2632001	ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase 1	protein binding	1010,53	1,296930074	0,26	0,25	0,98
SAMP_14658	Phvul008G1136001	glutathione S-transferase TAU 8	response to cadmium ion	638,53	2,611696417	0,96	0,82	0,98
SAMP_24788	Phvul001G2659001	selenium-binding protein 2	chloroplast	616,41	2,559981412	0,94	0,74	0,98
SAMP_23436	Phvul001G1138001	Cobalamin-independent synthase family protein	response to salt stress	1385,84	1,750672504	0,56	0,49	0,99
SAMP_8134	Phvul009G1166001	basic chitinase	defense response to fungus	1225,29	1,993715528	0,69	0,67	0,99
SAMP_21768	Phvul007G1572001	heat shock cognate protein 70-1	defense response to bacterium	3714,25	1,552707215	0,44	0,26	0,99
SAMP_12290	Phvul011G0391001	fructose-bisphosphate aldolase 2	jasmonic acid biosynthetic process	28528,77	1,1502738	0,14	0,09	0,99
SAMP_11052	Phvul011G1673001	chitinase A	defense response to fungus/hitinase activity	746,21	3,320117081	1,2	1,1	0,99
SAMP_25844	Phvul006G2075001	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed stor	anchored to plasma membrane	1848,39	2,664456293	0,98	0,84	0,99
SAMP_5894	Phvul009G2564002	Glycosyl hydrolase superfamily protein	defense response to fungus, incompatible interaction	1977,74	2,033991215	0,71	0,26	1

SAMP_17289	Phvul004G013500 3   carbonic anhydrase 1	MAPK cascade	18332,12	1,138828378	0,13	0,1	1
SAMP_1385	Phvul010G023000 1   1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	oxidoreductase activity	3153,01	1,716006899	0,54	0,22	1
SAMP_16993	Phvul004G051600 1   Cobalamin-independent synthase family protein	response to salt stress	1295,02	1,993715528	0,69	0,49	1
SAMP_15421	Phvul008G229100 1   Subtilisin-like serine endopeptidase family protein	serine-type endopeptidase activity	180,23	2,459603053	0,9	0,44	1
SAMP_23153	Phvul001G186100 1   Enolase	response to abscisic acid stimulus	7818,74	1,41906754	0,35	0,15	1
SAMP_23323	Phvul001G238100 1   no result	no result	1337,26	1,404947596	0,34	0,22	1
SAMP_27945	Phvul002G301400 1   Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	endoplasmic reticulum	910,87	1,69893226	0,53	0,24	1
SAMP_20666	Phvul007G153500 1   photosystem II reaction center PSB28 protein	plasma membrane-derived thylakoid photosystem II	3877,64	1,568312167	0,45	0,37	1
SAMP_14430	Phvul008G151800 1   Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family	oxidoreductase activity	3838,7	1,50681778	0,41	0,21	1
SAMP_15877	Phvul008G013000 1   heat shock cognate protein 70-1	response to bacterium and response to hydrogen peroxide	3642,02	1,648721271	0,5	0,17	1
SAMP_3581	Phvul003G080400 1   Glycine cleavage T-protein family	glycine cleavage complex	8017,62	1,363425117	0,31	0,16	1
SAMP_8626	Phvul005G144100 1   triosephosphate isomerase	hyperosmotic response	1548,18	1,716006899	0,54	0,24	1
SAMP_25639	Phvul006G029100 2   alanine:glyoxylate aminotransferase	plasma membrane	12393,97	1,584073998	0,46	0,22	1
SAMP_8311	Phvul009G173200 1   RAB GTPase homolog E1B	chloroplast	914,23	1,41906754	0,35	0,27	1
SAMP_25052	Phvul001G169000 1   heat shock cognate protein 70-1	response to bacterium and response to hydrogen peroxide	2588,33	1,349858824	0,3	0,24	1
SAMP_25947	Phvul006G170300 1   heat shock protein 70B	response to hydrogen peroxide	1722,73	2,013752683	0,7	0,5	1
SAMP_25640	Phvul006G029100 1   alanine:glyoxylate aminotransferase	response to salt stress	5705,51	1,599994191	0,47	0,23	1
SAMP_24074	Phvul001G181000 1   triosephosphate isomerase	response to salt stress/cysteine biosynthetic process	923,3	1,616074385	0,48	0,32	1
SAMP_13174	Phvul011G065000 1   heat shock protein 70	response to bacterium/response to hydrogen peroxide	4248,68	1,803988368	0,59	0,16	1
SAMP_10752	Phvul011G089000 1   ribulose-bisphosphate carboxylases	calcium-dependent cell-cell adhesion	57771,93	3,034358438	1,11	0,14	1
SAMP_30308	Phvul002G180300 1   Aldolase-type TIM barrel family protein	oxidoreductase activity	1626,77	1,568312167	0,45	0,31	1
SAMP_7191	Phvul009G227800 1   germin 3	defense response to bacterium	3166,55	1,915540783	0,65	0,34	1
SAMP_16740	Phvul004G107700 1   heat shock protein 90.1	response to stress	764,86	1,786038401	0,58	0,46	1
SAMP_23418	Phvul001G035500 1   glycine decarboxylase P-protein 2	glycine cleavage complex	1090,56	1,336427477	0,29	0,18	1
SAMP_19508	Phvul007G273500 1   Lactate/malate dehydrogenase family protein	oxidoreductase activity	1273,28	2,054433269	0,72	0,37	1
SAMP_10377	Phvul005G051800 1   Aldolase-type TIM barrel family protein	oxidoreductase activity	10377,99	1,258600015	0,23	0,11	1
SAMP_15495	Phvul008G229400 1   Subtilisin-like serine endopeptidase family protein	response to cadmium ion	1968,93	2,534509196	0,93	0,4	1
SAMP_8185	Phvul009G059000 1   no result	no result	1319,72	1,521961536	0,42	0,3	1
SAMP_23445	Phvul001G194100 1   2-cysteine peroxiredoxin B	MAPK cascade/systemic acquired resistance, salicylic acid	44550,09	1,50681778	0,41	0,22	1
SAMP_17505	Phvul004G073400 1   ribulose bisphosphate carboxylase small chain 1A	photosynthesis	31201,89	1,599994191	0,47	0,13	1
SAMP_22990	Phvul001G098100 1   glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit	oxidoreductase activity	12050,98	1,284025417	0,25	0,12	1
SAMP_8435	Phvul009G144500 1   ribulose-bisphosphate carboxylases	calcium-dependent cell-cell adhesion	6646,12	2,316366916	0,84	0,3	1
SAMP_4428	Phvul003G286600 1   serine transhydroxymethyltransferase 1	defense response, incompatible interaction	4949,73	1,616074385	0,48	0,24	1
SAMP_16169	Phvul008G229500 1   Subtilisin-like serine endopeptidase family protein	serine-type endopeptidase activity	1571,54	2,773194711	1,02	0,25	1
SAMP_27189	Phvul006G047900 1   zinc finger (CCCH-type) family protein / D111	nucleus	3312,32	1,803988368	0,59	0,12	1
SAMP_14944	Phvul008G281300 1   HEAT SHOCK PROTEIN 81.4	response to stress	989,66	1,896480852	0,64	0,47	1
SAMP_16576	Phvul008G229300 1   no result	no result	1406,65	2,509290432	0,92	0,37	1
SAMP_802	Phvul010G016000 1   rubisco activase	MAPK cascade	4503,13	1,491824707	0,4	0,27	1
SAMP_25626	Phvul006G216600 1   2Fe-2S ferredoxin-like superfamily protein	protein binding	114056,1	1,323129814	0,28	0,1	1
SAMP_16338	Phvul008G281400 1   HEAT SHOCK PROTEIN 81.4	response to stress	2012,37	1,69893226	0,53	0,34	1