



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DIVERSIDADE, RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E PERFIL DE
EXPRESSÃO GÊNICA DE TRANSPORTADORES MFS EM
Trichoderma spp.**

JOMAL RODRIGUES BARBOSA FILHO

GOIÂNIA-GO

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☒ Dissertação ☐ Tese

2. Nome completo do autor

Jomal Rodrigues Barbosa Filho

3. Título do trabalho

Diversidade, Relações Filogenéticas e Perfil de Expressão Gênica de Transportadores MFS em *Trichoderma* spp.

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento ☐ SIM ☒ NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);
 - b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Raphaella De Castro Georg, Professora do Magistério Superior**, em 20/05/2021, às 14:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **JOMAL RODRIGUES BARBOSA FILHO, Discente**, em 21/05/2021, às 09:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2081428** e o código CRC **1A80CD79**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☒ Dissertação ☐ Tese ☐ Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Jomal Rodrigues Barbosa Filho

3. Título do trabalho

Diversidade, Relações Filogenéticas e Perfil de Expressão Gênica de Transportadores MFS em *Trichoderma* spp.

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;

- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Jomal Rodrigues Barbosa Filho, Discente**, em 09/02/2023, às 12:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raphaela De Castro Georg, Professora do Magistério Superior**, em 10/02/2023, às 13:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3517934** e o código CRC **3948899D**.

JOMAL RODRIGUES BARBOSA FILHO

**DIVERSIDADE, RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E PERFIL DE
EXPRESSÃO GÊNICA DE TRANSPORTADORES MFS EM
Trichoderma spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica e Genética

Orientadora: Profa. Dra. Raphaela de Castro Georg

GOIÂNIA-GO

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Barbosa Filho, Jomal Rodrigues
Diversidade, Relações Filogenéticas e Perfil de Expressão Gênica
de Transportadores MFS em *Trichoderma* spp. [manuscrito] / Jomal
Rodrigues Barbosa Filho. - 2021.
xcvi, 96 f.

Orientador: Profa. Dra. Raphaela de Castro Georg.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas, Goiânia, 2021.
Bibliografia. Anexos.
Inclui gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Trichoderma. 2. MFS. 3. Metais. 4. Micoparasitismo. 5.
Expressão Gênica. I. Georg, Raphaela de Castro, orient. II. Título.

CDU 57



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 523 da sessão de Defesa de Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, que confere a **Jomal Rodrigues Barbosa Filho** o título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração em Bioquímica e Genética.

Aos vinte e um dias do mês de abril de 2021, a partir das 14:00 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “Diversidade, Relações Filogenéticas e Perfil de Expressão Gênica de Transportadores MFS em *Trichoderma* spp.”. Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Professora Doutora Raphaela de Castro Georg (ICB - UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor Alexandre Siqueira Guedes Coelho (EA - UFG), membro titular externo; Doutor Andrei Stecca Steindorff (JGI), membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora Raphaela de Castro Georg, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte e um dias do mês de abril de 2021.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Raphaela De Castro Georg, Professora do Magistério Superior**, em 21/04/2021, às 16:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andrei Stecca Steindorff, Usuário Externo**, em 21/04/2021, às 16:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Siqueira Guedes Coelho, Professor do Magistério Superior**, em 22/04/2021, às 18:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2015155** e o código CRC **8408F4D1**.

À minha família e amigos.

Agradecimentos

Gostaria de iniciar agradecendo à minha família: meu pai, Jomal Rodrigues Barbosa, minha mãe, Célia Rodrigues Botelho, minha irmã Dayana Rodrigues Barbosa e, claro, nossa cachorrinha Moana. Sem o apoio e a paciência de vocês, terminar o mestrado teria sido muito mais difícil.

Agradeço à minha grandiosa orientadora, Prof^{fa} Dr^a Raphaela de Castro Georg, bem como o Prof. Dr. Cirano José Ulhoa e a Prof^{fa} Dr^a Valdirene Neves Monteiro, por me ensinarem a fazer Ciência todos os dias.

Muito obrigado aos meus melhores amigos Matheus Pires, Gabriel Alexandre, Aline Menegat, Laura Cordeiro, Marianna Lacerda, Thais Almeida, Leandro Túlio, Carol Gradim, João Batista, Ana Karoline, Igor Calassa, Amanda Nunes, Gustavo Ayres e Francis Patrício. Amo vocês!

Agradeço também às minhas colegas de laboratório e grandes amigas Thuana Mota, Letícia Harumi e Stéphanie Naoum, além do Gustavo Henrique Soares e da Nathalia Oliveira. Não poderia existir uma equipe melhor para se trabalhar!

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) da UFG, por me proporcionar um local de trabalho adequado para o desenvolvimento de nossas pesquisas, aos professores do programa (principalmente Prof^{fa} Dr^a Kátia Flávia Fernandes e Prof^{fa} Dr^a Karla de Aleluia Batista) pelos ensinamentos, e também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro fornecido ao longo do mestrado, mesmo com tantos cortes de verbas sofridos.

Num momento tão difícil para a Ciência, especialmente para a Ciência brasileira, gostaria também de agradecer a todos os cientistas que consolidaram o conhecimento que possibilitou o desenvolvimento do presente trabalho, bem como todos os cientistas que lutam diariamente para melhorar o mundo. A vocês, o meu muito obrigado!

*“Sinto-me nascido a cada momento
Para a eterna novidade do mundo...”
(Fernando Pessoa)*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT	XII
IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA A SOCIEDADE.....	XIV
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. <i>Major Facilitator Superfamily</i>	15
1.2. O gênero <i>Trichoderma</i>	20
1.3. Os metais.....	27
1.3.1. Cádmio	29
1.3.2. Alumínio.....	31
1.3.3. Tolerância aos metais.....	32
2. OBJETIVOS	35
2.1. Objetivo geral.....	35
2.2. Objetivos específicos	35
3. METODOLOGIA.....	36
3.1. Levantamento dos transportadores MFS	36
3.1.1. Busca por sequências anotadas.....	36
3.1.2. BlastP	36
3.1.3. Regiões Transmembrana	37
3.1.4. Peso molecular e quantidade de resíduos de aminoácidos.....	37
3.2. Classificação das sequências em famílias.....	37
3.4. Análise de MFSs em transcriptomas de <i>T. harzianum</i>	39
4. RESULTADOS	42
4.1. Levantamento dos transportadores MFS em <i>Trichoderma</i> spp.	42
4.2. Classificação das sequências em famílias.....	45
4.3. Análises filogenéticas.....	47
4.4. Análise de MFSs em transcriptomas de <i>T. harzianum</i>	52
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÕES	61
Referências Bibliográficas.....	62
ANEXO I – Famílias e subfamílias MFS identificadas em <i>Trichoderma</i> spp.	76

ANEXO II – Genes MFS de <i>T. harzianum</i> diferencialmente expressos durante crescimento em contato com 0.08, 1.5 e 3.0 mg/mL de AlCl_3 , 1.0 e 2.0 mg/mL de CdCl_2 , e 24 e 36 horas em contato com parede celular de <i>S. sclerotiorum</i> ...	84
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura biológica de transportadores MFS.....	17
Figura 2 – Tipos de transportes realizados por transportadores MFS.....	18
Figura 3 – Morfologia de <i>Trichoderma</i> spp. em meio de cultura batata-dextrose-agar (BDA).....	23
Figura 4 – Esquema dos mecanismos de tolerância a metais utilizados por fungos...	33
Figura 5 – Distribuição de proteínas MFS em <i>Trichoderma</i> spp.	42
Figura 6 – Hélices transmembrana e tamanho das MFSs de <i>Trichoderma</i> spp.....	45
Figura 7 – Distribuição das MFS putativas de <i>Trichoderma</i> spp. em suas respectivas famílias.....	46
Figura 8 – Quantidade de membros de cada família MFS encontrados por espécie de <i>Trichoderma</i>	47
Figura 9 – Árvores filogenéticas dos transportadores MFS das famílias SHS e GPH.....	48
Figura 10 – Análise filogenética da família HIF (2.A.1.28.) de <i>Trichoderma</i> spp.....	50
Figura 11 – Expressão diferencial de transportadores MFS de <i>T. harzianum</i> em condições de estresses biótico e abiótico.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Divisão das espécies de <i>Trichoderma</i> em seções.....	21
Tabela 2 – Concentrações orientadas de metais para solos e águas subterrâneas no Brasil, de acordo com a resolução nº420 do CONAMA, 2009.....	28
Tabela 3 – Modelos de substituição selecionados para as árvores filogenéticas das famílias MFS.....	38
Tabela 4 – Distribuição de proteínas MFS em <i>Trichoderma</i> spp.....	43
Tabela 5 – Genes MFS de <i>T. harzianum</i> diferencialmente expressos exclusivamente em cada tipo de estresse.....	54

RESUMO

O gênero *Trichoderma* compreende fungos filamentosos com capacidade de micoparasitismo e boa tolerância a estresses abióticos, como a presença de metais. Em ambas condições, transportadores celulares são essenciais para a absorção de nutrientes e extrusão dos íons metálicos. Dentre eles, está a *Major Facilitator Superfamily* (MFS), que corresponde à maior superfamília de transportadores secundários presentes nos organismos. No entanto, ainda faltam estudos que quantifiquem e caracterizem esses importantes transportadores em *Trichoderma* spp. Desta forma, o presente estudo objetivou identificar os transportadores MFS presentes em 32 espécies do gênero, bem como suas relações filogenéticas e perfis de expressão gênica. Para isso, foi feito um levantamento *in silico* de todas as MFS putativas das espécies de *Trichoderma* cujos proteomas de referência estivessem disponíveis no banco de dados *Mycocosm* do *Joint Genome Institute* (JGI), utilizando a ferramenta BlastP. Essas sequências foram então categorizadas em suas respectivas famílias, de acordo com similaridade com sequências de aminoácidos depositadas no *Transporter Classification Database* (TCDB), e foram construídas árvores filogenéticas de máxima verossimilhança para cada uma das famílias utilizando o software IQTREE. Foram feitas as análises dos perfis de expressão dos genes codificadores de MFS de *T. harzianum* durante o micoparasitismo e presença de metais, utilizando dados públicos de RNA-Seq. Foram identificadas 8.467 MFS putativas em *Trichoderma* spp., com uma média de 264 ± 51 sequências, número maior do que o encontrado em outros organismos. As espécies mais relacionadas ao micoparasitismo apresentaram uma maior quantidade dessas sequências. 55,5% das sequências apresentaram 12 hélices transmembrana e 85,5% apresentaram peso molecular de 50 a 70 kDa, com média de 58 kDa. Ao todo, foram identificadas 24 famílias MFS nas 32 espécies analisadas, sendo as relacionadas à nutrição, manutenção da homeostase e defesa da célula as mais abundantes. Não houve enriquecimento de famílias em nenhuma espécie estudada. Já nas inferências filogenéticas, as sequências se agruparam por similaridade de funções e não de linhagens, além disso, as famílias SHS e GPH apresentaram subdivisões. Em *T. harzianum*, além de um maior número de genes MFS diferencialmente expressos durante o micoparasitismo, houve também uma maior indução deles nesta condição, em relação à presença de metais. Na presença de cádmio, houve uma maior repressão dos transportadores, comparado com o crescimento na presença de

alumínio. Foi observado que as famílias ACS e DHA2 foram as mais diferencialmente expressas durante micoparasitismo 24 h, enquanto que FHS e PHS foram as mais diferencialmente expressas na presença de alumínio 1,5 e 3,0 mg/mL e MCT na presença de cádmio 2,0 mg/mL. O presente estudo traz novas elucidações sobre a caracterização dos transportadores MFS e suas funções durante situações de estresse enfrentadas por *Trichoderma* spp. durante o seu crescimento no ambiente.

Palavras-Chave: *Trichoderma*; MFS; Metais; Micoparasitismo; Expressão Gênica.

ABSTRACT

The *Trichoderma* genus comprises filamentous fungi with mycoparasitism ability and high tolerance to abiotic stresses, such as the presence of metals. In both conditions, cellular transporters are vital to nutrients absorption and metallic ion extrusion. Among those, the Major Facilitator Superfamily (MFS) correspond to the largest superfamily of secondary transporters found in every organism, however a deep understanding of those is needed in *Trichoderma* spp. The present work aimed to identify the MFS transporters from 32 species of this genus, as well as to study their phylogenetic relationship and gene expression profiles. Global MFS identification were performed *in silico* using the *Trichoderma* spp. reference proteomes available on the MycoCosm database from Joint Genome Institute (JGI), by searching for annotated aminoacid sequences using the BlastP tool. The sequences were categorized in their respective families, according to reference sequences from the *Transporter Classification Database* (TCDB), and maximum likelihood phylogenetic trees were estimated for each of the families, using the IQTREE software. Lastly, MFS genes expression profiles were investigated during mycoparasitism and presence of metals, using RNA-Seq public data. 8,467 putative MFS were identified in *Trichoderma* spp., with a mean of 264 ± 51 sequences, and this number was higher than those found in other organisms. Mycoparasitic species presented a higher number of MFS. 55.5% of the sequences showed 12 transmembrane helices and 85.5% showed molecular weights between 50 and 70 kDa, with a mean of 58 kDa. In total, 24 MFS families were identified in the analyzed species, and the families regarding to nutrition, maintenance of homeostasis and cell defense showed a higher number of members. We did not observed enrichment of families in any species analyzed. In the phylogenetic inference the sequences grouped according to their functions and not to their lineage, moreover, SHS and GPH families showed subdivisions. In *T. harzianum*, besides a higher number of differently expressed genes during mycoparasitism, a higher number of upregulated genes was also observed in this condition compared to those in the presence of metals. In the presence of cadmium, we observed a higher downregulation of MFS genes than in the presence of aluminum. We also observed that ACS and DHA2 families were mostly differentially expressed during mycoparasitism 24 h, whilst FHS and PHS were mostly differentially expressed during the presence of aluminum 1.5 and 3.0 mg/mL, and MCT during the presence of cadmium 2.0 mg/mL. This work shed light on the description of MFS transporters and their functions during some of

the biotic and abiotic stresses faced by *Trichoderma* spp. in the course of its development on environment.

Keywords: *Trichoderma*; MFS; Metals; Mycoparasitism; Gene Expression.

IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA A SOCIEDADE

Trichoderma é um fungo presente no solo, que vive nas raízes das plantas, promovendo o seu crescimento e evitando o crescimento de outros fungos que possam causar doenças nas lavouras. Portanto, este fungo é utilizado na agricultura para diminuir o uso de defensivos agrícolas e vem sendo também estudado para o uso na retirada de metais de águas e do solo, por exemplo, em desastres ambientais, como os ocorridos nas cidades de Mariana e Brumadinho. Desta forma, entender como *Trichoderma* consegue atacar outros organismos e sobreviver em altas concentrações de metais pode auxiliar nos usos deste fungo.

Assim, o presente trabalho focou em proteínas responsáveis pela importação e exportação de moléculas pela célula: os transportadores, mais especificamente os transportadores MFS (*Major Facilitator Superfamily*). A forma como os transportadores desta família funcionam é classificada como transporte ativo secundário, que consiste na passagem de duas moléculas ao mesmo tempo para gerar uma modificação na estrutura dessa proteína, possibilitando a passagem destas moléculas para o outro lado, seja para dentro ou para fora da célula.

O estudo mostrou que há cerca de 8.467 proteínas desta família no gênero *Trichoderma*, com uma média de 264 por espécie. Esta quantidade é maior do que a encontrada em plantas e leveduras. Além disso, espécies de *Trichoderma* mais especializadas no combate a outros seres vivos apresentam uma maior quantidade destas proteínas. Além disso, também foi observada uma maior quantidade dessas proteínas envolvidas na nutrição, na estabilidade e na defesa das células de *Trichoderma*. O metal cádmio, afetou o crescimento do fungo de maneira mais negativa que o metal alumínio e também observamos que condições mais extremas podem prejudicar a absorção de nutrientes ou excreção de metabólitos pelo fungo.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Major Facilitator Superfamily*

As protocélulas desenvolveram ao longo da evolução mecanismos de transporte de diferentes moléculas pela bicamada lipídica, a partir da inserção de proteínas integrais na membrana, que formaram canais e transportadores de solutos. Com a possibilidade de transporte de novos íons e elementos orgânicos, a diversidade de reações bioquímicas aumentou consideravelmente, permitindo, inclusive, o envio de metabólitos oriundos destas reações para o meio extracelular. Hoje, 30% do genoma humano codifica proteínas de membrana, sendo grande parte desse número correspondente a proteínas transportadoras (POHORILLE; SCHWEIGHOFER; WILSON, 2005).

As moléculas podem atravessar a membrana por diferentes mecanismos de transporte, classificados como transporte passivo ou ativo. No primeiro, a difusão do soluto pela bicamada lipídica ocorre sem a utilização de energia e a favor de um gradiente de concentração, numa tentativa de manter o equilíbrio termodinâmico do meio. Assim, moléculas pequenas, apolares e neutras conseguem atravessar facilmente a membrana, processo classificado como difusão simples. Por outro lado, moléculas maiores e hidrofílicas necessitam de carreadores, que são proteínas que formam canais seletivos na membrana e que catalisam esse transporte, classificado, por sua vez, como difusão facilitada (GADSBY, 2009).

Já no transporte ativo, o transporte do soluto é realizado contra seu gradiente eletroquímico e, por isso, necessita de alguma fonte de energia capaz de alterar a estrutura da proteína transportadora para que a passagem do soluto ocorra. Desta forma, o transporte ativo pode ser classificado em primário, quando utiliza fótons ou a hidrólise do ATP para promover o transporte, ou secundário, quando utiliza o potencial eletroquímico do cotransporte de íons/solutos (YAN, 2015).

Dentro deste último grupo, a *Major Facilitator Superfamily* (MFS) constitui a maior superfamília de transportadores secundários, composta por proteínas evolutivamente antigas e que são encontradas em todos os grupos de seres vivos, apresentando uma grande variedade de solutos transportados, tais como: nucleosídeos, peptídeos, aminoácidos, lipídios e íons orgânicos e inorgânicos (YAN, 2015).

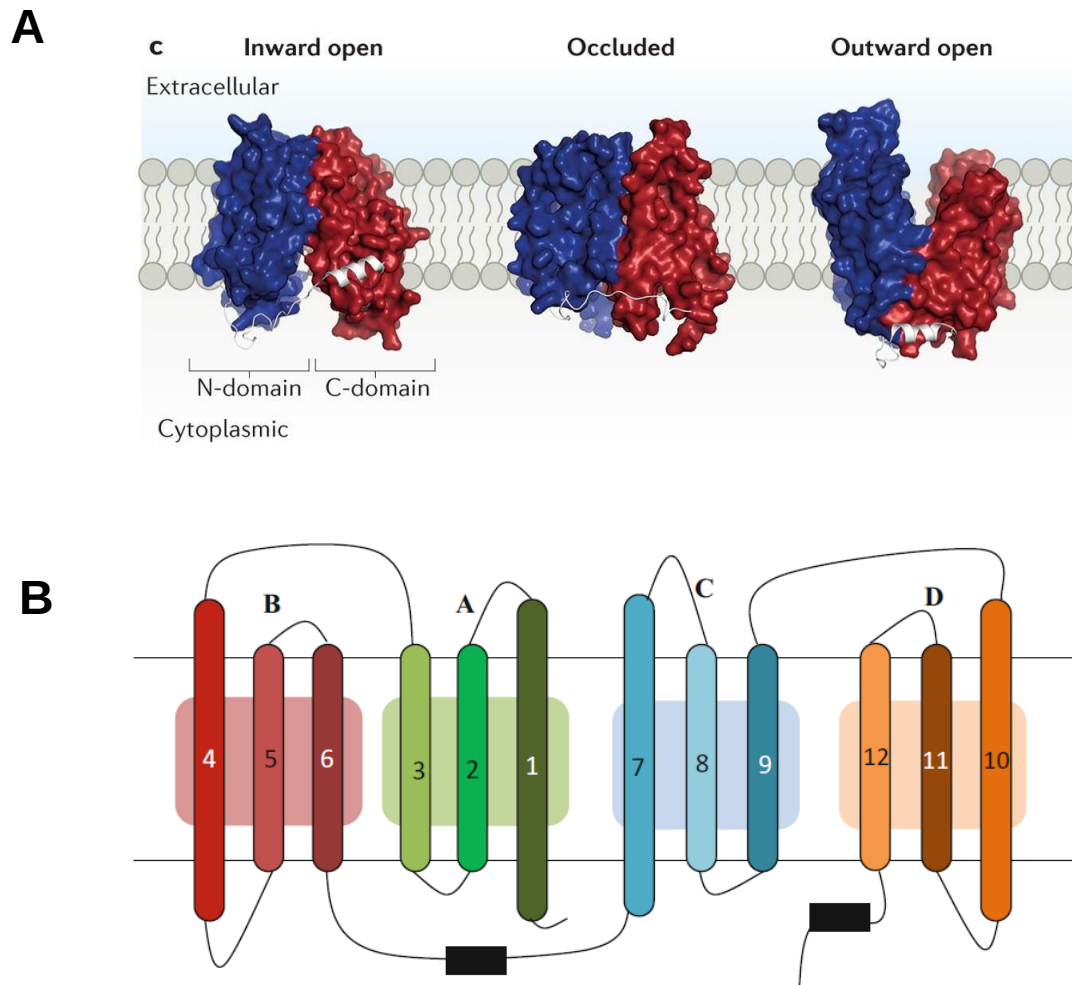
Essa família de transportadores começou a ser estudada, provavelmente, em 1919 por Edge (BANG; ORSKOV, 1937), que observou que a taxa de influxo de

glicose em eritrócitos humanos era afetada pela concentração deste soluto, e, mais tarde, LeFevre (1948) evidenciou a presença de um mecanismo de transporte ativo utilizado por essas células para captura de glicose. No entanto, foi apenas em 1993 que o termo *Major Facilitator Superfamily* começou a ser utilizado. Até o momento, os transportadores de glicose em humanos (GLUT1, GLUT2, GLUT3 e GLUT4) e a lactato permease (LacY) de *Escherichia coli* são os membros mais estudados da superfamília MFS (YAN, 2015).

De acordo com o *Transporter Classification Database* (TCDB), a superfamília MFS possui 89 famílias descritas, indicada no banco de dados com o código de identificação 2.A.1., além de 15 famílias que são descritas separadamente: 2.A.2 - Glycoside-Pentoside-Hexuronide (GPH):Cation Symporter; 2.A.12 - ATP:ADP Antiporter (AAA), 2.A.17 - Proton-dependent Oligopeptide Transporter (POT/PTR); 2.A.48 - Reduced Folate Carrier (RFC); 2.A.57 - Equilibrative Nucleoside Transporter (ENT); 2.A.60 - Organo Anion Transporter (OAT); 2.A.71 - Folate-Biopterin Transporter (FBT); 2.A.85 - Aromatic Acid Exporter (ArAE); 2.A.100 - Ferroportin (Fpn); 2.A.125 - Eukaryotic Riboflavin Transporter (E-RFT); 4.H.1 - Lysyl Phosphatidylglycerol Synthase/Flippase (MprF); 5.B.2 - Eukaryotic Cytochrome b561 (Cytb561); 9.B.57 - Conidiation and Conidial Germination Protein (CCGP); 9.B.111 - 6 TMS Lysyl tRNA Synthetase (LysS); e 9.B.143 - 6 TMS DUF1275/Pf0691 (disponível em: <http://www.tcdb.org/superfamily.php>). Essa classificação se dá por três critérios principais: mecanismo de transporte, relações filogenéticas e substrato transportado (SAIER et. al., 2016).

Com relação à sua estrutura, a maioria das proteínas MFS apresentam de 400 a 600 aminoácidos e 12 hélices transmembrana (TM1-TM12), divididas em dois domínios similares, N- e C-terminal, onde resíduos de aminoácidos dos dois domínios se juntam para formar o sítio de ligação do soluto transportado. Além disso, essa estrutura ainda apresenta quatro motivos diferentes, para os quais as nomenclaturas variam de acordo com o autor, compostos por repetições de três α -hélices, e essas estruturas padrões são conhecidas como dobraduras MFS (ou MFS *fold*) (Figura 1) (KAKARLA et al., 2017; QUISTGAARD et al., 2016).

Figura 1 – Estrutura biológica de transportadores MFS.



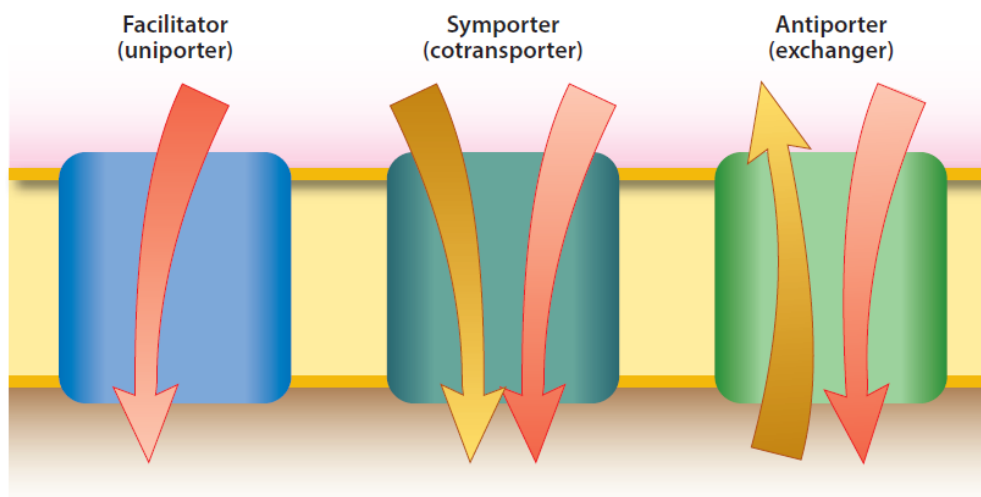
Legenda – **A:** Domínios N- e C- terminal observados em uma proteína MFS. **B:** Motivos (A, B, C e D) presentes na estrutura de uma proteína MFS. Cada tripleto de α -hélices é conhecido como dobradura MFS. Fontes: Kakarla *et al.* (2017), Quistgaard *et al.* (2016)

Tais motivos são conservados entre os transportadores MFS de diferentes famílias, sendo a sequência consenso $GX_3[D/E][R/K]XGX[R/K][R/K]$ encontrada no motivo A e $GX_8GX_3GPX_2GG$ no motivo C (KAKARLA *et al.*, 2017). No sítio de ligação do soluto, também é observada uma conservação de resíduos de arginina e glicina, que seriam essenciais para o transporte de íons e para a flexibilidade da estrutura da proteína, respectivamente (VISHWAKARMA *et al.*, 2018).

Já o mecanismo de transporte dos transportadores MFS pode ser dividido em três classes: uniporte, ou facilitadores, quando apenas um soluto é transportado; simporte, ou cotransporte, quando são transportados dois solutos na mesma direção;

e antiporte, ou “bombas”, quando são transportados dois solutos em direções opostas (Figura 2) (YAN, 2015).

Figura 2 – Tipos de transportes realizados por transportadores MFS.



Legenda – Os facilitadores auxiliam pequenos solutos a atravessarem a membrana a favor da sua concentração de gradiente. Simportes ou antiportes utilizam a energia para transportar dois diferentes solutos na mesma direção ou em direções opostas, respectivamente. Fonte: Yan, 2015.

A primeira proteína da família MFS identificada e estudada em fungos do gênero *Trichoderma* foi a Thmfs1 de *T. harzianum*, que transporta o metabólito secundário trichodermina, bastante importante para a atividade antifúngica deste organismo (LIU; LIU; WANG, 2012). Neste estudo, a proteína apresentou alta similaridade com outras sequências MFS, além dos quatro motivos conservados nesses transportadores e 14 hélices transmembrana, enquanto seu gene apresentou um tamanho de 2,165 pares de bases (bp) e três regiões intrônicas. Foi observado também que a trichodermina promove a indução da expressão de genes Thmfs1, o que indica a sua participação na proteção contra antibióticos produzidos pelo próprio fungo.

Além disso, os mutantes de *T. harzianum* superexpressando o gene Thmfs1 apresentaram uma maior inibição do crescimento de fitopatógenos e uma maior resistência a compostos químicos do que os mutantes com deleção do gene. Assim, os resultados indicam uma importância do transportador Thmfs1 para a atividade de biocontrole do fungo e para a sua defesa, através do efluxo de trichodermina.

No entanto, a estrutura tridimensional desse transportador só foi resolvida, *in silico*, em 2016 por Chaudhary e colaboradores. Os autores evidenciaram que a estrutura deste transportador, assim como outros transportadores MFS, apresentam dois domínios, N- e C- terminal, cada um contendo 7 hélices transmembrana, que se estruturam para formar um canal de passagem dos solutos. Esse canal é rico em resíduos de aminoácidos polares, tornando-o hidrofílico e facilitando a passagem da molécula de trichodermina, a qual também apresenta caráter polar.

Foram observados dois sítios de ligação ao substrato, um localizado na porção citoplasmática da proteína e outro na porção extracelular, sendo compostos pelas hélices H2 e H6 do domínio N-terminal, e H10 e H13 do domínio C-terminal. Sobre a dinâmica molecular da proteína durante a passagem do soluto, os autores demonstram que a modificação da proteína durante a passagem da trichodermina é compatível com o mecanismo de acesso alternado (*alternating access*) e que a interação da molécula com o sítio de ligação citoplasmático é mais forte do que com o sítio de ligação extracelular, demonstrando que a trichodermina é transportada da região citoplasmática para a região extracelular, atuando, então, na sua extrusão da célula.

Assim, foi proposto que a trichodermina se liga ao sítio de ligação citoplasmático, promovendo a aproximação dos domínios N- e C- terminais, que leva a diminuição do diâmetro do canal e o fechamento da proteína na região intracelular. Enquanto isso, os dois domínios se afastam na região extracelular, aumentando o diâmetro do canal nesta região, o que facilita a saída da molécula para o meio extracelular.

Também em 2016, o mesmo grupo realizou a identificação global dos transportadores MFS em *T. reesei*, utilizando o proteoma de referência da espécie (CHAUDHARY *et al.*, 2016). Os autores identificaram 148 sequências putativamente relacionadas a transportadores MFS, que foram divididas em 10 famílias, baseadas no TCDB. As famílias de transportadores de açúcar (SP), antiporte de drogas 1 (DHA1) e transportadores de monocarboxilato (MCP), foram as que apresentaram mais membros (51, 35 e 17, respectivamente). A família SP é identificada em todos os reinos e é responsável pelo influxo de diferentes tipos de açúcar. Já a família MCP, presente em animais e fungos, promove o transporte de monocarboxilatos, como lactato, piruvato β -hidroxibutirato e acetoacetato. As outras famílias identificadas, foram: anion: cation symporter (ACS), drug: H⁺ antiporter-2 (DHA-2), organic cation

transporter (OCT), phosphate: H⁺ symporter (PHS), acriflavin - sensitivity (YnfM), sialate: H⁺ symporter (SHS) e vacuolar basic amino acid transporter (V-BAAT). Além disso, a estrutura terciária de membros das famílias SP, PHS e MCP foram moduladas por homologia pelos autores, e foram identificados os mesmos achados presentes em outros trabalhos.

Por último, a fim de avaliar a evolução do genoma de 12 espécies de *Trichoderma* (*T. reesei*, *T. longibrachiatum*, *T. citrinoviride*, *T. parareesei*, *T. harzianum*, *T. afroharzianum*, *T. guizhouense*, *T. virens*, *T. atroviride*, *T. gamsii*, *T. asperellum* e *T. hamatum*), Kubicek e colaboradores (2019) identificaram uma média de 215 transportadores MFS, um número maior que o encontrado em fungos entomopatogênicos (média de 154) e menor que o de fungos fitopatogênicos (média de 331).

1.2. O gênero *Trichoderma*

O Reino Fungi, categorizado em 1969 por Whittaker, compreende microrganismos eucariotos, com presença de parede celular, ubíquos, heterotróficos, saprófitos ou biotróficos, uni (leveduras) ou multicelulares (filamentosos), de vida livre ou parasitas, e possui, até o momento, aproximadamente 120 mil representantes conhecidos, número este que pode ser de 2,2 a 3,8 milhões no total (HAWKSWORTH, LÜCKING, 2017; WHITTAKER, 1996). A data de surgimento desses seres vivos ainda gera dúvida entre a comunidade científica, porém fósseis recentemente encontrados indicam que eles habitam a Terra há pelo menos 890 milhões de anos (LORON *et al.*, 2019). Contudo, as primeiras espécies do gênero *Trichoderma* surgiram há apenas 66,5 milhões de anos, próximo à grande extinção em massa ocorrida ao final do período Cretáceo (KUBICEK *et al.*, 2019).

Trichoderma é classificado no reino Fungi, sub-reino Dikarya, filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família Hypocreaceae. Ainda, podem ser divididos em seções, de acordo com análises filogenéticas (Tabela 1), e suas taxonomias vêm sendo atualizadas constantemente (DRUZHININA; KUBICEK, 2005; CAI; DRUZHININA, 2021). São fungos filamentosos comumente encontrados no solo e que possuem uma grande importância biotecnológica (KREDICS *et al.*, 2014; VERMA *et al.*, 2007). Eles foram primeiramente descritos por Persoon, em 1794 e, até o ano de 2015, 254 espécies do gênero eram reconhecidas (BISSETT; GAMS; JAKLITSCH; SAMUELS, 2015). No entanto, novas espécies continuam a ser

identificadas, sendo as descobertas de *T. azevedoi* e *T. peberdyi*, no Brasil, as mais recentes até o momento (CHEN; ZHUANG, 2017; DU PLESSIS *et al.*, 2018; INGLIS *et al.*, 2020; MONTOYA; MEIRELLES; CHAVERRI; RODRIGUES, 2016; QIAO *et al.*, 2018; QIN; ZHUANG, 2016; QIN; ZHUANG, 2016).

Tabela 1 – Divisão das espécies de *Trichoderma* em seções.

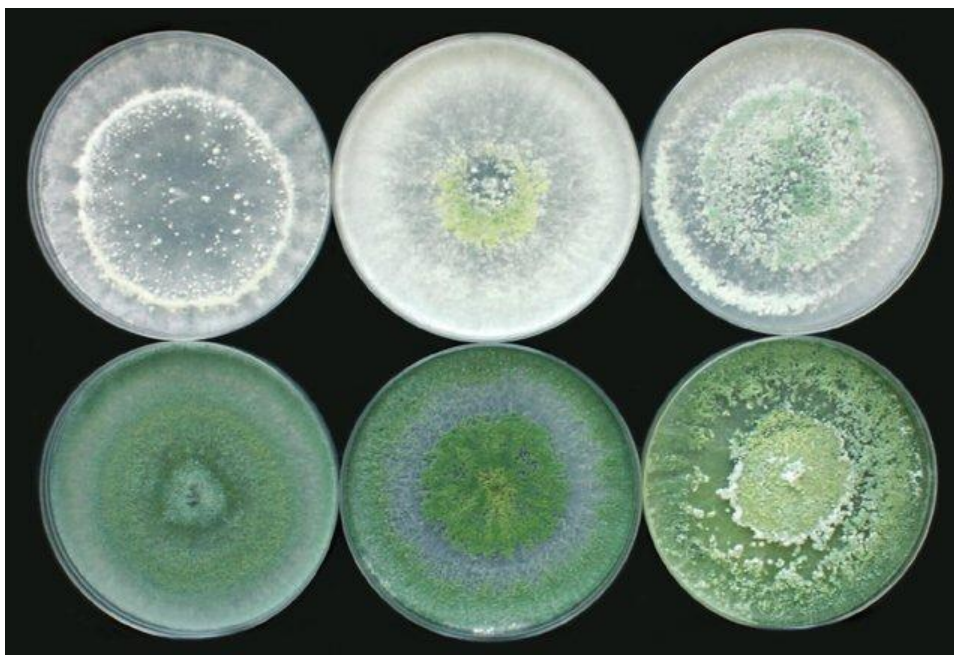
Seção	Espécie
<i>Longibrachiatum</i>	<i>T. longibrachiatum</i>
	<i>T. citrinoviride</i>
	<i>T. reesei</i>
	<i>T. ghanense</i>
	<i>T. pseudokoningii</i>
	<i>T. saturnisporum</i>
	<i>T. konilangbra</i>
	<i>T. effusum</i>
	<i>T. sinensis</i>
	<i>T. sp. MA</i>
<i>Trichoderma</i>	<i>T. viride</i>
	<i>T. atroviride</i>
	<i>T. koningii</i>
	<i>T. strigosum</i>
	<i>T. ovalisporum</i>
	<i>T. erinaceum</i>
	<i>T. hamatum</i>
	<i>T. pubescens</i>
	<i>T. asperellum</i>
<i>Pachybasium B</i>	<i>T. polysporum</i>
	<i>T. minutisporum</i>
	<i>T. piluliferum</i>
	<i>T. harzianum</i>
	<i>T. aggressivum</i>
	<i>T. tomentosum</i>
	<i>T. cerinum</i>
	<i>T. velutinum</i>
	<i>T. sp. DAOM 175928</i>

<i>T. virens</i>
<i>T. crassum</i>
<i>T. fertile</i>
<i>T. oblongisporum</i>
<i>T. strictipilis</i>
<i>T. longipile</i>
<i>T. stromaticum</i>
<i>T. rossicum</i>
<i>T. sp. PPRI 3559</i>
<i>T. brevicompactum</i>
<i>T. spirale</i>
<i>T. helicum</i>

Fonte: Adaptado de Druzhinina; Kubicek (2005).

A morfologia comumente encontrada em colônias de *Trichoderma* spp. foi inicialmente detalhada por Rifai (1969) e Bissett (1984), no entanto, ambos autores considerem a classificação morfológica destas espécies complexa. Ainda assim, é possível observar características inerentes às suas culturas (Figura 3), que consistem, principalmente, em: crescimento rápido (5-7 dias); coloração variando de branca à amarela e verde; algumas espécies apresentando odor característico de coco; e conidióforos com um eixo principal ramificado em ramos apicais divergentes mais curtos e mais estreitos, organizados em estrutura piramidal e apresentando fiálides e conídios em sua extremidade (RIFAI, 1969; BISSETT, 1984).

Figura 3 – Morfologia de *Trichoderma* spp. em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA).



Legenda: De cima para baixo, da esquerda para a direita, estão: *T. cremeum*, *T. longipile*, *T. viride*, *T. harzianum*, *T. atroviride* e *T. citrinoviride*. Fonte: Błaszczuk et al. (2014).

Quando crescidas *in vitro*, *Trichoderma* spp. se reproduzem pela liberação de clamidósporos, e na natureza através de ascósporos. A formação de conídios se dá pela alteração do ambiente, como privação de nutrientes, baixo pH, incidência de luz UV azul ou dano ao micélio (MUKHERJEE et al., 2013).

Entretanto, a identificação de isolados de *Trichoderma* através da morfologia não é suficiente. Após o advento e aprimoramento das tecnologias de sequenciamento de DNA, o sequenciamento das regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) foi, e ainda é, extremamente útil para a identificação de fungos, sendo considerados o DNA *barcode* universal para estes organismos (GARDES; BRUNS, 1993). Porém, atualmente, apenas a utilização destes genes não é mais adequada para se determinar a taxonomia de fungos do gênero *Trichoderma*, requerendo o emprego de uma abordagem multigênica. Inglis e colaboradores (2020) utilizaram o sequenciamento dos espaçadores ITS1 e ITS2, actina (*act*), calmodulina (*cal*), *translation elongation factor 1-α* (*tef1-α*) e RNA Polimerase II (*rpb2*) para caracterizar as novas espécies de *Trichoderma* identificadas em seu trabalho. Além desta abordagem, a fenotipagem utilizando o método de *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) e a

genotipagem por *amplification fragment length polymorphism* (AFLP) consistem em duas novas importantes técnicas para este fim.

Com relação a patogenicidade em humanos, *Trichoderma* é considerado não-patogênico, com raros casos de infecções oportunistas ocorridas em pacientes imunocomprometidos. Até 2005, 22 pacientes apresentaram quadros infecciosos representados por micetomas pulmonares, peritonite, hematomas peri-hepáticos, abscesso cerebral ou infecção disseminada, com uma taxa de sobrevivência de 52,4% e novos casos foram descritos em 2009, 2010, 2017 e 2018 (AKAGI *et al.*, 2017; KANTARCIOGLU *et al.*, 2009; MIGUEL *et al.*, 2005; SAUTOUR *et al.*, 2018; TRABELSI; HARIGA; KHALED, 2010). As espécies mais frequentemente associadas a infecções oportunistas em humanos são *T. citrinoviride* e *T. longibrachiatum* (MUKHERJEE *et al.*, 2013).

A bem sucedida associação simbiótica entre fungos e plantas que começou há, no mínimo, 407 milhões de anos, e que foi essencial para a conquista terrestre pelas plantas, se estende até os dias atuais e é outra importante característica das espécies de *Trichoderma*. Mesmo espécies aero aquáticas deste gênero são identificadas em associação com madeira ou folhas e algumas também compõem líquens. No entanto, a maior parte se associa mais comumente à região da rizosfera das plantas, porém podem estar presentes em qualquer parte da estrutura vegetal (CONTRERAS-CORNEJO *et al.*, 2016; STRULLU-DERRIEN *et al.*, 2018; YAMAGUCHI *et al.*, 2012; ZHU; ZHUANG, 2015).

Os vários fatores que favorecem essa boa relação incluem a troca de nutrientes entre os dois organismos, a secreção de hormônios de crescimento vegetal pelo *Trichoderma*, a indução, na planta, de resistência a estresses abióticos e a ação contra fungos fitopatogênicos.

A solubilização de nutrientes minerais, primeiramente sugerida por Harman e colaboradores (2004) como um dos mecanismos utilizados por *Trichoderma* para induzir o crescimento vegetal, é de extrema importância para plantas que crescem em solos pouco férteis. Brotman e colaboradores (2012) observaram um aumento na quantidade de aminoácidos em plantas crescidas em associação com *T. asperelloides* e, uma vez que a principal fonte de armazenamento e transporte de nitrogênio nos organismos são os aminoácidos, e que *Trichoderma* mostra alta eficiência na retirada deste mineral do solo, o estudo indica fortemente a ocorrência da permuta de nutrientes entre os dois organismos (FIORENTINO *et al.*, 2018).

Trichoderma também promove o crescimento de plantas através da secreção de hormônios vegetais, como os compostos da classe auxina, que são fito-hormônios envolvidos na morfogênese da planta. Contreras-Cornejo e colaboradores (2009) identificaram a produção das auxinas ácido-3-indolacético, indol-3-acetaldeído e indol-3-etanol por *T. virens* e *T. atroviride*, que promoveram o desenvolvimento lateral das raízes e aumento da biomassa da planta. No entanto, outros metabólitos específicos de fungos, produzidos por *Trichoderma*, também parecem promover este crescimento, e é sugerido que tais compostos sejam interpretados pelas plantas como sinais trans-reinos, que acabam modulando sua morfogênese. Dentre esses, o composto 6-pentil-pirona (6-PP), também produzido por *T. atroviride*, promoveu crescimento vegetal de forma dose-dependente (GARNICA-VERGARA *et al.*, 2015).

Além disso, fungos do gênero *Trichoderma* são capazes de aprimorar a resposta imune da planta, fortalecendo-a contra estresses bióticos e abióticos. Contreras-Cornejo e colaboradores (2011) concluíram que *Arabidopsis thaliana* crescida na presença destes fungos apresentou aumento na secreção dos hormônios de defesa ácido salicílico e ácido jasmônico, e do metabólito secundário camalexina, também envolvido na defesa vegetal. Além destes hormônios, outros genes de defesa, como peroxidases, glutathione S-transferase, quinases, polifenol oxidase, miraculina e quitinase, também foram induzidos na presença de *Trichoderma* e defenderam a planta do ataque de insetos (COPPOLA *et al.*, 2019).

Por outro lado, alguns fungos desenvolveram o potencial fitopatogênico e hoje se tornaram os maiores causadores de doenças em lavouras, atingindo majoritariamente a produção de frutas, vegetais e cereais e resultando em grandes perdas econômicas. Dentre eles, pode-se citar: *Botrytis cinerea*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Ustilago maydis*, *Cladosporium fulvum*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina* (SILVA *et al.*, 2019).

Uma das principais estratégias utilizadas para o combate desses organismos é a aplicação de defensivos agrícolas, que consistem em compostos químicos que podem causar prejuízos ao meio ambiente, à saúde humana, a outros microrganismos presentes no solo e, por fim, podem contribuir para a seleção de patógenos resistentes (SILVA *et al.*, 2019). Contudo, a utilização de *Trichoderma* spp. como agentes de controle biológico já ocorre e é uma das principais alternativas sustentáveis empregadas na produção agrícola, diminuindo o uso dos agentes químicos (KUMAR;

ASHRAF, 2017). Este uso é possível graças à agressividade do fungo no enfrentamento a fitopatógenos através da competição, antibiose e, principalmente, da sua capacidade de micoparasitismo.

A competição entre organismos se dá quando estes crescem num mesmo ambiente e, por isso, precisam disputar por espaço, nutrientes, água e luz. *Trichoderma* spp. se mostram agressivos competidores na natureza por conseguirem utilizar diferentes fontes de carbono e absorverem grande quantidade de nutrientes à sua volta, o que facilita a sua rápida multiplicação e colonização nas raízes (HARMAN *et al.*, 2004).

Já a antibiose, consiste na inibição do crescimento de outro organismo através da secreção de compostos químicos, e foi observada primeiramente em *Trichoderma* spp. por Weindling (1934). Estes compostos são produzidos através do metabolismo secundário do fungo e agem, além do combate a outros organismos, em funções de sobrevivência, simbiose, e na sua diferenciação (CONTRERAS-CORNEJO *et al.*, 2016). Dentre eles, pode-se destacar: as trichoderminas, a classe das alquilpironas, as isonitrilas, o antibiótico gliotoxina, as trichorzianinas, as harzianopiridonas, T22-azaphilona, harzianolide e T39 butenolide (SILVA *et al.*, 2019).

Ainda assim, o parasitismo de outros fungos é, de longe, a característica mais interessante de *Trichoderma* spp. no combate a fitopatógenos. O micoparasitismo não é uma característica exclusiva deste gênero, porém apenas fungos da ordem Hypocreales parecem ser exclusivamente *fungicolous* (KUBICEK, *et al.* 2019). Este mecanismo é utilizado para invadir as células de outros fungos, parasitando-os, e pode ser dividido em quatro etapas: atração do hospedeiro através de estímulos químicos; reconhecimento específico, através de lectinas presentes na superfície celular de ambos os fungos; ataque do *Trichoderma*, com enrolamento de suas hifas nas hifas do hospedeiro; e degradação da parede celular e acesso ao material intracelular do hospedeiro (VINALE *et al.*, 2008).

O reconhecimento da parede celular de outro fungo, induz em *Trichoderma* spp. a secreção de enzimas degradadoras de parede celular, e como as paredes celulares de fungos são compostas por quitina, glucanas e matriz proteica, as principais enzimas secretadas são quitinases, glucanases e proteases (BARTNICKI-GARCIA, 1968).

As quitinases são divididas em endo e exoquitinases, onde as endoquitinases clivam as quitinas internamente em quitotetraose, e as exoquitinases, por sua vez

divididas em quitobiosidases e N-acetil-D-glucosaminidases, resultam na liberação de diacetilquitobiose, posteriormente hidrolisada em monômeros de N-acetil-glucosamina. Já as principais glucanases envolvidas no processo de micoparasitismo são as exo- β -1,3-glucanases e endo- β -1,3-glucanases, ambas liberando glicose como produto final. Por fim, as proteases, incluindo algumas serino-endopeptidases e proteases aspárticas, possuem papel importante tanto na desestabilização da parede celular do fitopatógeno, quanto na inativação de suas enzimas (GRUBER *et al.*, 2010; MARCO; FELIX, 2002; MONTEIRO *et al.*, 2010; SUÁREZ *et al.*, 2007).

Além do uso na agricultura como biofertilizantes e agentes de biocontrole, *Trichoderma* spp. e seus produtos também possuem grande importância para a indústria e para a medicina. *T. reesei* e *T. harzianum* são grandes produtores de celulasas e hemicelulasas e, portanto, podem ser utilizados na produção de biocombustíveis (DELABONA *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2019). Os diversos metabólitos secundários produzidos por *Trichoderma* spp. também possuem potencial farmacológico, apresentando atividades antifúngicas, bactericidas, antitumorais e contra aterosclerose (KESWANI *et al.*, 2013). Ainda, recentemente, foi demonstrado que *T. harzianum* produz o composto Huperzine A (HupA), um promissor agente no tratamento da doença de Alzheimer (WEN-XIA *et al.*, 2020).

Por fim, outra importante característica de *Trichoderma* é a sua capacidade de tolerância a diferentes estresses abióticos. Estudos mostram que *Trichoderma* é capaz de crescer em altas concentrações de sal, altas temperaturas, e, principalmente, em altas concentrações de metais (HIRPARA *et al.*, 2017; MOTA *et al.*, 2019, OSHIQUIRI *et al.*, 2020).

1.3. Os metais

Os metais se tornam, cada vez mais, importantes contaminantes de solos e águas através de ações antropogênicas. São exemplos desta problemática os recentes desastres ambientais envolvendo indústrias de mineração nas cidades de Mariana e Brumadinho, no Brasil, que trouxeram grande prejuízo para ecossistemas completos (FREITAS *et al.*, 2019).

Esses elementos químicos podem ser classificados, de acordo com a Tabela Periódica, em semimetais, metais de transição, metais alcalinos e metais alcalino terrosos, e são caracterizados pela tendência de doação de elétrons, formação de ligações específicas – denominadas ligações metálicas –, boa condutividade térmica

e elétrica e, mais importante, pela alta estabilidade no ambiente, que dificulta a sua remoção da natureza (HALKA *et al.*, 2010).

Apesar de serem essenciais para a manutenção fisiológica dos organismos, atuando, principalmente, como cofatores enzimáticos, uma alta quantidade de íons metálicos pode causar danos à saúde de plantas, animais e microrganismos. Assim, para evitar uma grande deposição de metais no solo e em águas, a resolução nº 420 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) foi publicada em 2009, no Brasil e dispõe

(...) sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas.

No Anexo II desta resolução são estabelecidos valores de prevenção, que indicam a concentração limite permitida da substância no solo, e valores de investigação, para solo e água subterrânea, que indicam concentrações nas quais valores superiores aos estipulados podem representar potenciais riscos para a saúde humana (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentrações orientadas de metais para solos e águas subterrâneas, de acordo com a resolução nº420 do CONAMA, 2009.

Metais	Solo (mg/kg de peso seco)				Água subterrânea (µg/L)
	Prevenção	Investigação			Investigação
		Agrícola	Residencial	Industrial	
Alumínio	-	-	-	-	3.500
Antimônio	2	5	10	25	5
Arsênio	15	35	55	150	10
Bário	150	300	500	750	700
Boro	-	-	-	-	500
Cádmio	1,3	3	8	20	5
Chumbo	72	180	300	900	10
Cobalto	25	35	65	90	70
Cobre	60	200	400	600	2.000
Cromo	75	150	300	400	50
Ferro	-	-	-	-	2.450
Manganês	-	-	-	-	400
Mercúrio	0,5	12	36	70	1
Molibdênio	30	50	100	120	70
Níquel	30	70	100	130	20
Nitrato	-	-	-	-	10.000
Prata	2	25	50	100	50

Selênio	5	-	-	-	10
Vanádio	-	-	-	1.000	-
Zinco	300	450	1.000	2.000	1.050

Fonte: Adaptado de CONAMA, 2009.

Dentre os metais citados é possível destacar o metal cádmio, que se mostra um dos mais ofensivos à saúde humana, por apresentar os menores valores toleráveis no solo e o segundo menor em água, e o metal alumínio, que é encontrado abundantemente em solos ácidos, como o solo do bioma brasileiro Cerrado, bioma este em que é possível encontrar frequentemente espécies de *Trichoderma* (SANTOS; FONSECA; BELÉM, 2015; LOPES *et al.*, 2012). Além disso, estudos demonstram que *Trichoderma* spp. apresentam boa tolerância a ambos os metais, sendo aptos a crescer em altas concentrações de cádmio e de alumínio (OSHIQUIRI *et al.*, 2020; SANTOS, 2017).

1.3.1. Cádmio

O Cádmio (Cd) é um metal pesado de número atômico 48 e massa atômica 112,4 u, altamente tóxico para seres vivos, pouco presente no solo, mas abundante em rochas sedimentares. A sua concentração no solo do bioma Cerrado varia de 0,001 mg/mL a 0,002 mg/mL nos estados de Goiás e Minas Gerais no Brasil, no entanto, este metal pode se acumular na natureza através da sua utilização em baterias, atividades de mineração e pela utilização de fertilizantes fosfatados que possuem Cd em sua composição (CAMPOS *et al.*, 2013; HALKA; NORDSTROM, 2010; WUANA; OKIEMEN, 2011).

No solo, a concentração de 5 mg/kg de Cd se mostrou tóxica para plantas não acumuladoras de metais, afetando negativamente o seu crescimento (VAN-SLYCKEN *et al.*, 2013). Plantas crescidas em altas concentrações de Cd apresentam uma diminuição no tamanho das raízes, que afeta a captação de água e nutrientes, e suas folhas podem apresentar clorose, nanismo, dessecação e necrose (GRATÃO *et al.*, 2009; SOLIS-DOMINGUEZ *et al.*, 2007). Esses efeitos são causados pela interferência do Cd nos sistemas bioquímicos e fisiológicos das plantas.

O Cd pode substituir os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} nos sistemas fotossintéticos da planta, afetando a estrutura dos cloroplastos, os fotossistemas e o ciclo de Calvin-Benson, diminuindo, assim, as taxas de fotossíntese (KÜPPER *et al.*, 2007; YING *et al.*, 2010). A deficiência nutritiva na planta também pode ser causada devido a competição pelos

canais iônicos entre o Cd e outros cátions, como zinco (Zn), ferro (Fe), cálcio (Ca), manganês (Mn), magnésio (Mg), cobre (Cu), silício (Si), potássio (K), fósforo (P), enxofre (S) e nitrogênio (N) (ISMAEL *et al.*, 2019). Por fim, metais pesados, como o Cd, podem se acumular em grãos de pólen, alterando características físico-químicas da sua superfície e diminuindo sua viabilidade e taxa de fertilização e, assim, interferir na reprodução dos vegetais (SÉNÉCHAL *et al.*, 2015).

Em humanos, o Cd consegue adentrar no organismo através da inalação, alimentação ou ingestão de água contaminados e, uma vez dentro do organismo, este metal pode atingir a corrente sanguínea, sendo transportado por eritrócitos e albumina a diferentes órgãos, se acumulando, principalmente, nos rins, fígado e intestino (PACINI; BRANCA; MORUCCI, 2018). De acordo com a classificação da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, o Cd é considerado carcinogênico para humanos (IARC, 1997).

Os efeitos adversos deste metal podem ser observados através de danos nos rins, fígado, ossos, sistema cardiovascular, sistema nervoso e sistema reprodutivo. Tais efeitos são ocasionados por alterações celulares causados pelo Cd, que culminam em apoptose ou necrose tecidual. Um dos principais mecanismos de toxicidade do Cd é a sua interferência na cadeia transportadora de elétrons na membrana mitocondrial, bloqueando o fluxo de elétrons, que acaba aumentando a permeabilidade da membrana mitocondrial interna e culmina no aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essa maior quantidade de ROS na célula pode levar a danos no DNA e ativar, desta forma, a via de apoptose intrínseca, além de também poder levar à carcinogênese (GENCHI *et al.*, 2020).

Além disso, em gestantes, a presença do metal pode levar a eventos epigenéticos aberrantes, como metilações alteradas de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário, afetando a expressão desses genes e podendo causar má-formação fetal (KUMAR; SHARMA, 2019).

Recentemente, estudos vêm evidenciando também a participação dos microRNAs (miRNAs) nos mecanismos de toxicidade de metais pesados, já que eles também parecem estar envolvidos no processo de carcinogênese. Uma vez que miRNAs regulam negativamente a expressão gênica ao diminuir ou impedir a tradução de RNAs mensageiros (mRNA) na célula, e que alguns miRNAs são reguladores epigenéticos, pesquisadores observaram que a alteração na expressão de certos miRNAs devido à presença do Cd, levaram a alterações no perfil de expressão gênica

da célula e alterações epigenéticas, influenciando, desta forma, a proliferação, diferenciação, desenvolvimento e morte celular. Também foi observada a alteração na expressão de oncogenes e genes supressores de tumor devido à alteração na atividade de miRNAs, que culminaram no desenvolvimento de câncer (GU; DAI; QU; HE, 2019).

Apesar de serem frequentemente isolados em regiões contaminadas e apresentarem boa tolerância à presença de Cd, alterações celulares e metabólicas causadas pelo metal também já foram identificadas em fungos. Jacobson e colaboradores (2017) mostraram que em *Saccharomyces cerevisiae* o Cd provoca agregação proteica durante sua síntese ou enovelamento ao se ligar a resíduos de cisteína nos domínios de ligação ao zinco das proteínas nascentes e também de proteínas chaperonas, dificultando o seu re-enovelamento. Oshiquiri, Gomes e Georg (2020) evidenciaram que Cd promove uma maior inibição do *splicing* em *Blastocladiella emersonii* do que outros íons bivalentes, como cobalto e manganês. E através de dados de transcriptoma, Oshiquiri e colaboradores (2020) observaram a inibição de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos em *T. harzianum* crescido na presença de Cd, indicando uma possível interferência do metal na atividade de micoparasitismo do fungo.

1.3.2. Alumínio

Já o Alumínio (Al) é um metal de número atômico 13, massa atômica 27 u e, devido ao seu baixo custo e fácil manipulação, este metal é extremamente utilizado na produção de bens de uso e construção civil, sendo de extrema importância para o ser humano (HALKA; NORDSTROM, 2011).

Além disso, Al é o terceiro elemento químico mais abundante na crosta terrestre, o que leva a acidificação de alguns solos que contenham grande quantidade deste metal, como no caso do solo do Cerrado brasileiro, uma vez que a sua reação com a água libera íons H^+ . O bioma Cerrado compreende os estados brasileiros do Centro-Oeste, Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Tocantins, Rondônia, Bahia, Maranhão e Piauí, e é composto, principalmente, por solos denominados Latossolos. Este tipo de solo apresenta coloração que varia de vermelho a amarelo, com poucos nutrientes, mas alta concentração de alumínio (aproximadamente 0,08 mg/mL na superfície) que, por sua vez, contribuem para os

valores de pH encontrados nesses solos, que variam de 4,2 a 5,2 (SANTOS; FONSECA; BELÉM, 2015).

Apesar de não ser considerado um metal pesado, altas concentrações de alumínio – diferentemente de cádmio – também podem afetar a saúde de plantas, animais e microrganismos. Nas plantas, e por ser um íon de carga positiva, Al pode interagir com a membrana plasmática (que apresenta carga negativa) das células vegetais, modificando essa membrana e também substituindo outros cátions, como Ca^{2+} , que se ligam aos lipídeos da bicamada. Dessa forma, a absorção de íons pelas raízes é dificultada (BOSE; BABOURINA; RENGEL, 2011). Além disso, Al pode substituir cofatores enzimáticos, como o Mg^{2+} , afetando assim a duplicação do DNA e proliferação celular, uma vez que o íon Mg^{2+} é utilizado pelas DNA polimerases durante este processo. Al pode também se ligar diretamente a molécula de DNA, mais fortemente, inclusive, que proteínas histonas e não histonas (SADE *et al.*, 2016).

Já em humanos, a toxicidade por alumínio ainda não é totalmente elucidada, no entanto, seus efeitos advêm, também, da sua atividade pró-oxidativa. Recentemente, vêm-se aumentando o número de evidências que relacionam a intoxicação por Al à doença de Alzheimer, sendo esta, talvez, a maior preocupação da intoxicação por alumínio em humanos. Estudos mostram que Al potencializa a agregação e deposição dos peptídeos β -amiloides nos tecidos neuronais, levando à formação de placas senis e morte neuronal, que parecem estar relacionados com a gênese da doença (IGBOKWE; IGWENAGU; IGBOKWE, 2019).

Em *T. harzianum*, Santos e colaboradores (2017) mostraram que em altas concentrações de Al ocorre diminuição da secreção de proteínas pelo fungo e regulação negativa de processos biológicos, como síntese de nucleotídeos, síntese de aminoácidos, metabolismo de carboidratos, replicação de DNA e divisão celular, efeitos semelhantes aos encontrados em outros organismos intoxicados com o metal.

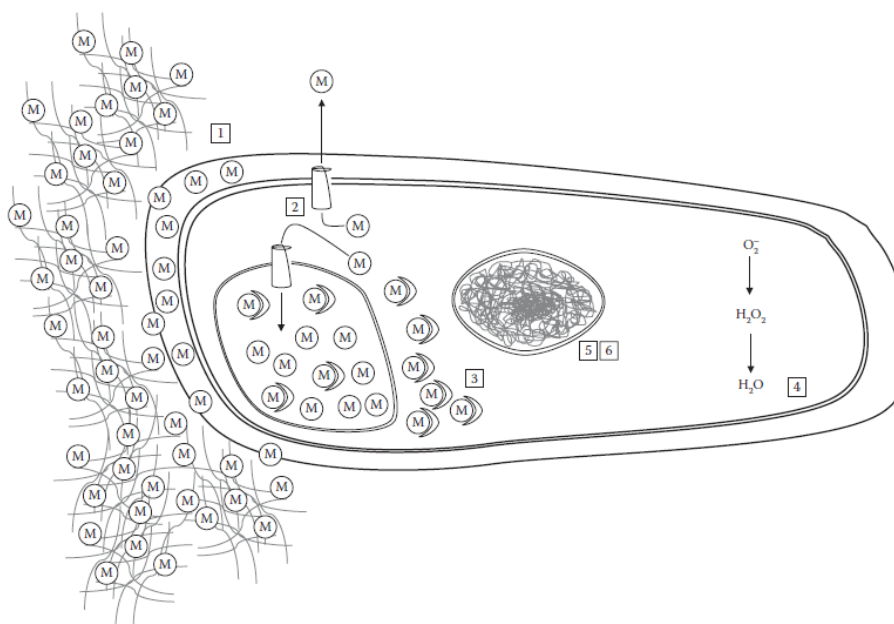
1.3.3. Tolerância aos metais

Apesar dos efeitos tóxicos de Cd e Al, espécies de *Trichoderma* conseguem crescer bem em concentrações muito maiores destes metais do que as encontradas normalmente na natureza, se mostrando tolerantes à sua presença. *In vitro*, Cacciola e colaboradores (2015) mostraram que *T. harzianum* foi capaz de crescer nas concentrações de 1, 2,5, 5 e 10 ppm de CdSO_4 , sendo a concentração máxima (10 ppm) superior àquela encontrada no solo do Cerrado e, ainda assim, 10 vezes menor

que a menor concentração utilizada no trabalho de Oshiquiri e colaboradores (2020), onde o fungo foi capaz de crescer nas concentrações de 0,1, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL de cádmio. Já no trabalho de Santos e colaboradores (2017), o mesmo fungo conseguiu crescer nas concentrações de 0,1, 0,2, 1,0 e 2,0 mg/mL de alumínio.

Para conseguir crescer em tais condições, os fungos utilizam diferentes mecanismos de tolerância (Figura 4). Íons metálicos positivos podem se complexar à parede celular fúngica, através da atração de cargas, mas o fungo também pode secretar ácidos orgânicos, proteínas, polissacarídeos e/ou melanina, que vão provocar a precipitação e cristalização extracelular dos metais. Intracelularmente, a célula fúngica pode diminuir o influxo e aumentar o efluxo dos íons metálicos, além de aprisioná-los em vacúolos ou sequestrá-los através da ação das metalotioneínas. Já os efeitos oxidativos causados pelos metais podem provocar uma resposta antioxidativa, caracterizada, principalmente, pelo aumento de proteínas glutatônicas (HENDERSON *et al.*, 2017).

Figura 4 – Esquema dos mecanismos de tolerância a metais utilizados por fungos.



Legenda: **1** – Complexação à parede celular do fungo e precipitação dos metais; **2** – Extrusão e compartimentalização dos metais em vacúolos; **3** – Quelação intracelular dos íons metálicos; **4** – Controle do estresse oxidativo; **5 e 6** – Regulação transcricional e reparo do DNA. Fonte: Henderson *et al.*, 2017.

Então, para uma resposta coesa e efetiva à presença dos metais, proteínas transportadoras são essenciais para promover o carregamento dos íons e de proteínas

através das membranas plasmáticas e vacuolares. Além disso, essas proteínas também são importantes durante o micoparasitismo, para que ocorra a secreção de enzimas e metabólitos secundários e absorção de nutrientes (KUBICEK *et al.*, 2019). Dentre esses transportadores, um dos mais frequentemente associados a essas atividades estão os transportadores MFS (OSHIQUIRI *et al.*, 2020; STEINDORFF *et al.*, 2014).

Apesar da importância dos transportadores MFS para a manutenção da vida dos organismos, a literatura científica ainda carece de mais estudos aprofundados acerca da quantidade, caracterização, filogenia e perfil de expressão em condições de estresse destes transportadores em espécies do gênero *Trichoderma*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho objetiva realizar uma análise global dos transportadores MFS no gênero *Trichoderma* e identificar quais deles podem estar associados a resposta a estresses bióticos e abióticos, como micoparasitismo e tolerância a metais.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Levantamento de todos os transportadores MFS de *Trichoderma* spp.;
- 2) Classificação dos transportadores MFS de *Trichoderma* spp. em suas respectivas famílias e subfamílias;
- 3) Estudo filogenético dos transportadores MFS;
- 4) Análise da expressão diferencial de genes MFS a partir de dados de RNASeq públicos, em condições de micoparasitismo e presença de metais.

3. METODOLOGIA

3.1. Levantamento dos transportadores MFS

3.1.1. Busca por sequências anotadas

Foram utilizados os bancos de dados de anotação funcional (INTERPRO) das 32 espécies de *Trichoderma* disponíveis para acesso no portal de genomas *Mycocosm* do *Joint Genome Institute* (JGI), para se obter os códigos de identificação (ID) das sequências de aminoácidos anotadas como MFS. Para isso, foram pesquisadas as palavras-chave “MFS” e “Major Facilitator Superfamily”, empregando-se comandos no software R, e para obter as sequências de aminoácidos correspondentes aos IDs obtidos, foi utilizada a biblioteca Bio.SeqIO do Python3 (disponível em: bityli.com/XBDxj) e os proteomas de referência de cada espécie (Tabela 4), também obtidos no JGI. As sequências foram nomeadas como “nome_da_esécie_ID” (NORDBERG *et al.*, 2014; R Core Team, 2013; RStudio Team, 2020).

Recentemente, Cai e Druzhinina (2021) realizaram uma conferência taxonômica das espécies do gênero *Trichoderma* e, após este estudo, o isolado *T. asperellum* TR356 foi reclassificado como *T. asperelloides* TR356. Uma vez que o presente estudo foi realizado anteriormente à essa reclassificação, deve-se considerar, desta forma, que as menções ao isolado *T. asperellum* TR356 ao longo do trabalho, na verdade se referem à *T. asperelloides* TR356.

Para confirmar a presença de domínios MFS, as sequências obtidas foram submetidas à análise contra o banco de dados Pfam 31.0 (disponível em: <ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/Pfam/releases/>) (EL-GEBALI *et al.*, 2019), utilizando a função “hmmsearch”, com valor de *evaluate* igual a 1.0 e *scores* maiores que 20. Foram consideradas as sequências que apresentavam os domínios “MFS-1”, “MFS-2”, “MFS-3”, “MFS-4”, “MFS-5”, ou os domínios correlatos “MFS-1-like”, “Sugar_Trans”, “TRI12” e “PTR2”. Sequências que não apresentavam nenhum dos domínios citados não foram consideradas para as análises posteriores.

3.1.2. BlastP

Para identificar sequências MFS que por ventura não houvessem sido obtidas na primeira análise, foi realizada uma nova busca utilizando-se a ferramenta BlastP (ALTSCHUL, 1990). Os proteomas de referência de cada espécie foram utilizados como *query* e a análise foi feita contra um banco de dados local construído com o

conjunto de MFS obtidas na etapa anterior, utilizando um valor de *evaluate* menor que $1e^{-20}$.

Foram selecionadas as sequências *query* que apresentaram qualquer número de *hits* na análise do BlastP e que ainda não faziam parte do conjunto inicial de MFS. Estas sequências também foram submetidas à análise para verificar a presença de domínios MFS, utilizando-se os mesmos parâmetros e critérios utilizados anteriormente.

3.1.3. Regiões Transmembrana

Uma vez que os transportadores MFS são proteínas transmembrana, apresentando em sua maioria 12 hélices transmembrana (TMH), a quantidade de TMHs foi predita para as sequências obtidas utilizando as versões *online* dos *softwares* TMHMM, Phobius e TOPCONS-Single (HENNERDAL; ELOFSSON, 2011; KÄLL; KROGH; SONNHAMMER, 2004; KROGH *et al.*, 2001). Foram utilizados os parâmetros *default* para os três *softwares* e, utilizando o mesmo critério que Chaudhary e colaboradores (2016), só foram consideradas para prosseguir nas análises as sequências apresentando mais de 9 TMHs em todos os três *softwares*.

3.1.4. Peso molecular e quantidade de resíduos de aminoácidos

Segundo o *Transporter Classification Database* (TCDB), a maioria das proteínas MFS possuem um tamanho de 400 a 600 resíduos de aminoácidos (aproximadamente de 44 a 66 kDa). A quantidade de resíduos de aminoácidos e o peso molecular (kDa) de cada sequência foram calculados utilizando a ferramenta “*Protein Molecular Weight*” do *Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms* (BCCM) (disponível em: https://www.genecorner.ugent.be/protein_mw.html). Foram consideradas apenas as sequências com peso molecular entre 40 e 100 kDa.

3.2. Classificação das sequências em famílias

Para categorizar as proteínas MFS putativas em suas respectivas famílias, foi empregada a ferramenta BlastP, utilizando as próprias sequências como *query* contra o banco de dados completo do TCDB. Utilizou-se o *best hit* do resultado para classificar a sequência em determinada família e todos os resultados apresentaram valor de *evaluate* menor que $1e^{-05}$. Para saber se houve enriquecimento de alguma família em determinada espécie, foi realizado o teste exato de Fisher, a partir de uma

tabela de contingência 2x2 com a quantidade de MFS da família encontrada na espécie, o total de MFS da espécie, o total de MFS da família e o total de MFS encontrado em todas as espécies. Foram consideradas enriquecidas as famílias que apresentaram valor de $p < 0,05$ em um intervalo de confiança de 95%.

3.3. Análises filogenéticas

Para estudar as relações evolutivas entre as sequências foi construída uma árvore filogenética para cada família, com exceção das famílias 2.A.1.32 e 2.A.1.49, que apresentaram apenas três e dois membros, respectivamente. Além destas árvores, também foi produzida uma árvore com todas as MFS putativas encontradas em *T. harzianum*.

Os alinhamentos múltiplos foram realizados na versão *online* do *software* MAFFT v.7, editados manualmente no *software* JalView e sequências mal alinhadas foram retiradas das análises para tentar melhorar a qualidade das árvores. As árvores foram construídas no *software* IQ-TREE, que utiliza o método de máxima verossimilhança. A análise foi feita utilizando-se o modo automático de detecção de modelos de substituição, que testa os seguintes modelos originais, bem como suas variações: Blosum62, cpREV, Dayhoff, DCMut, FLU, HIVb, HIVw, JTT, JTTDCMut, LG, mtART, mtMAM, mtREV, mtZOA, mtMet, mtVer, mtInv, Poisson, PMB, rtREV, VT, WAG, GTR20, C10 à C60, EX2, EX3, EHO, UL2, UL3, EX_EHO, LG4M, LG4X e CF4. Os modelos selecionados para cada árvore se encontram na Tabela 3. Além disso, a análise de bootstrap *ultrafast* foi feita com 1000 repetições e o restante dos parâmetros *default*. A visualização das árvores foi feita utilizando o *software* iTOL, com as folhas sendo organizadas pelos nós, utilizando a função “*leaf sorting – default*” (LETUNIC; BORK, 2019; ROZEWICKI *et al.*, 2019; TRIFINOPOULOS *et al.*, 2016; WATERHOUSE *et al.*, 2009).

Tabela 3 – Modelos de substituição selecionados para as árvores filogenéticas das famílias MFS.

Árvores	Modelo de substituição
2.A.1.1	LG+F+G4
2.A.1.2	LG+F+G4
2.A.1.3	mtInv+F+G4

2.A.1.7	mtInv+F+G4
2.A.1.8	JTT+G4
2.A.1.9	LG+F+G4
2.A.1.11	JTT+G4
2.A.1.12	LG+G4
2.A.1.13	LG+F+G4
2.A.1.14	LG+F+G4
2.A.1.16	LG+F+G4
2.A.1.19	LG+F+G4
2.A.1.28	JTT+I+G4
2.A.1.36	JTT+I+G4
2.A.1.40	JTT+I+G4
2.A.1.48	mtInv+F+I+G4
2.A.1.53	cpREV+G4
2.A.1.58	LG+F+G4
2.A.1.63	JTT+G4
2.A.1.75	JTT+F+G4
2.A.2	JTT+F+G4
2.A.17	LG+F+G4
<i>T. harzianum</i>	LG+F+G4

3.4. Análise de MFSs em transcriptomas de *T. harzianum*

A fim de conhecer o perfil de expressão dos genes codificadores de proteínas MFS de *T. harzianum* em condições de estresse, foram analisados os dados de três trabalhos de sequenciamento de RNA (RNA-Seq) desta espécie, realizados em três diferentes condições de crescimento: presença do metal alumínio, presença do metal cádmio e presença da parede celular do fitopatógeno *S. sclerotiorum*.

No trabalho de Oshiquira e colaboradores (2020), após 47 h de crescimento do *T. harzianum* TR274 em meio batata-dextrose (BD) líquido e mais 1 hora em contato com 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL de CdCl₂, o RNA total do fungo foi extraído e enviado para a empresa BPI – Biotecnologia Pesquisa e Inovação (Botucatu, SP, Brasil), onde foi sequenciado utilizando a plataforma Illumina HiSeq 2500. Para o controle, foi

utilizado o RNA total do fungo crescido 48 h sem adição de metais no meio de cultura. Todos os crescimentos foram feitos em triplicatas técnicas e triplicatas biológicas.

O *software* FastQC v 0.11.5 (ANDREWS, 2010) foi utilizado para verificar a qualidade das sequências resultantes e o Trimmomatic v 0.36 para a remoção de sequências e regiões de baixa qualidade, utilizando a função single-end HEADCROP: 10 TRAILING: 15 SLIDINGWINDOW: 4:15 MINLEN: 50 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). As sequências resultantes foram mapeadas no genoma de referência de *T. harzianum* TR274 v 1.0 utilizando Bowtie2 v 2.2.9 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012). Por fim, a expressão gênica foi calculada utilizando o pacote R DESeq2 v 1.6.3 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014).

De modo semelhante, o grupo também analisou o transcriptoma do fungo em 0,08 mg/mL, 1,5 mg/mL e 3,0 mg/mL de AlCl_3 , sendo 0,08 mg/mL a concentração de alumínio presente no solo do bioma Cerrado e, por essa razão, o fungo foi crescido durante as 48 h em contato com o metal nesta concentração para simular as condições naturais de seu crescimento (SANTOS *et al.*, 2017 e dados não publicados).

Para ambas análises foram considerados apenas os genes que apresentaram valor de padj (p valor ajustado) menor ou igual a 0,1 e foram considerados induzidos os genes que apresentaram valor de $\log_2$ fold change ($\log_2\text{FC}$) maior ou igual a 1,0, reprimidos os genes com $\log_2\text{FC}$ menor ou igual a -1,0 e não diferencialmente expressos os genes com $\log_2\text{FC}$ entre -1,0 e 1,0.

Já no trabalho de Steindorff *et al.* (2014), que avaliou o perfil de expressão gênica em condições de micoparasitismo, o RNA total de *T. harzianum* TR274 foi extraído após 12, 24 e 36 horas de crescimento em meio TLE (0,1% bactopeptona, 0,03% ureia, 0,2% KH_2PO_4 , 1,4% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,03% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03% glicose, e solução contendo os elementos traços Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} e Cu^{2+}) em contato com a parede celular do fitopatógeno *S. sclerotiorum*. O controle utilizado foi *T. harzianum* crescido no meio de cultura sem a presença da parede celular do fitopatógeno, e os crescimentos também foram realizados em triplicatas técnicas e triplicatas biológicas. Para o presente estudo, foram consideradas apenas as condições de 24 e 36 horas.

As amostras foram sequenciadas utilizando a plataforma Illumina HiSeq2000, a qualidade das sequências foi avaliada pelo *software* FastQC, a remoção de sequências de baixa qualidade e adaptadores foi feita utilizando o *software* Trimmomatic v 0.30 e o mapeamento das sequências foi feito, utilizando o genoma de

referência *Trichoderma harzianum* v1.0, com TopHat 2.0.8 (KIM *et al.*, 2013). A expressão diferencial dos genes foi calculada utilizando o algoritmo Cuffdiff e foram considerados diferencialmente expressos os genes com valor FDR de 5% ($p < 0,05$), sendo os induzidos com $\log_2FC$ maior ou igual a 1,0 e reprimidos com $\log_2FC$ menor ou igual a -1,0.

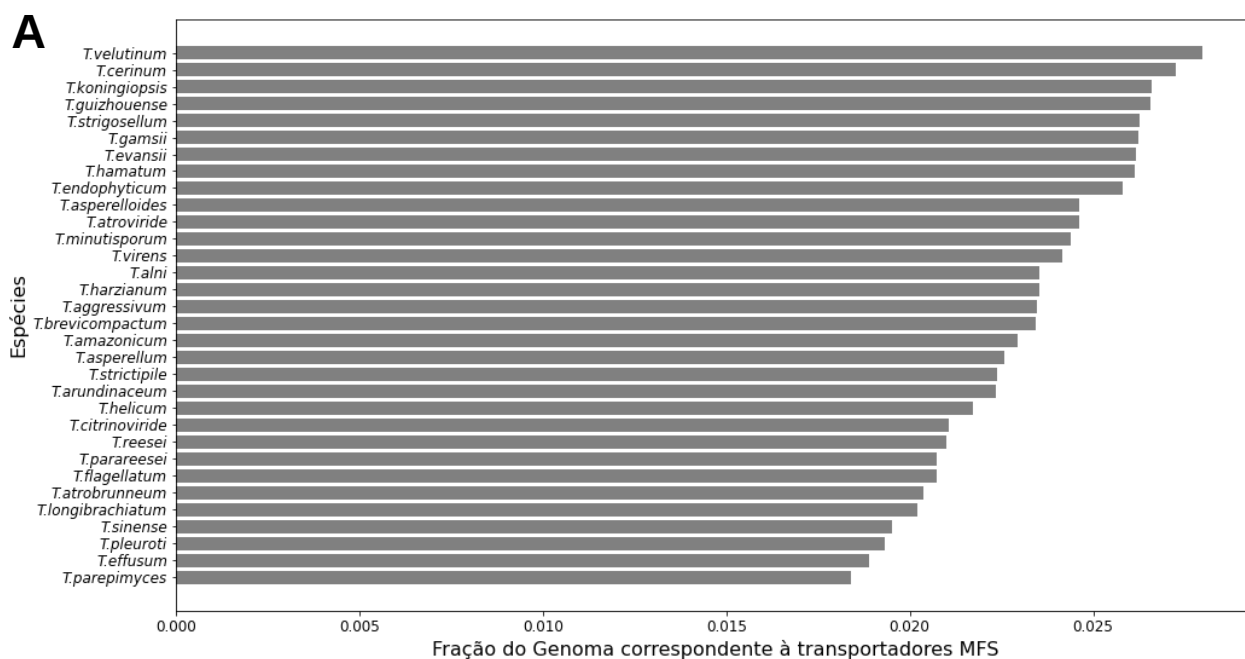
Para identificar quais famílias foram mais induzidas ou mais reprimidas nas condições analisadas, também foi utilizado o teste exato de Fisher, a partir de uma tabela de contingência 2x2 com a quantidade de genes diferencialmente expressos e genes não diferencialmente expressos, pertencentes à família e não pertencentes à família. Foram consideradas as famílias que apresentaram valor de $p < 0,05$ em um intervalo de confiança de 95%.

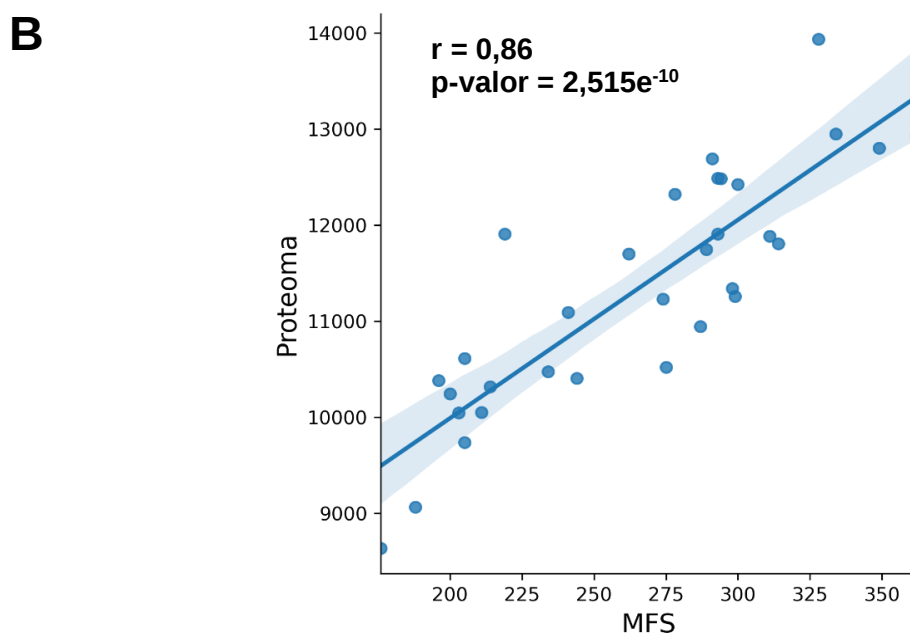
4. RESULTADOS

4.1. Levantamento dos transportadores MFS em *Trichoderma* spp.

Ao todo, 19.100 sequências foram obtidas, das quais 10.127 apresentaram domínios MFS a partir das análises no Pfam. Após a retirada de sequências com menos de 10 TMHs e peso molecular menor que 40 e maior que 100 kDa, chegou-se a um total de 8,467 sequências MFS preditas em *Trichoderma* spp. (Tabela 4 e Material S1, disponível em – DOI: 10.6084/m9.figshare.14642430), com uma média de 264 ± 51 sequências e uma amplitude de 186 sequências, o que demonstra uma heterogenia entre as quantidades encontradas em cada espécie. *T. velutinum* apresentou a maior quantidade de proteínas putativas (362) e *T. atrobrunneum* a menor (176). Na Figura 5A, a quantidade de MFSs foi normalizada pelo tamanho do proteoma de referência da espécie e é possível observar que as espécies da seção *Longibrachiatum* apresentaram a menor taxa de MFSs em relação às outras seções. Também, foi observada uma alta correlação ($r = 0,86$ e $p\text{-valor} = 2,515e-10$) entre o tamanho do proteoma de referência da espécie e a quantidade de MFS putativas encontradas (Figura 5B).

Figura 5 – Distribuição de proteínas MFS em *Trichoderma* spp.





Legenda: Em **A**, é mostrado a quantidade de proteínas MFS encontradas em cada espécie de *Trichoderma*, dividido pelo tamanho do seu proteoma de referência. Já em **B**, é possível observar uma alta correlação entre o tamanho do proteoma de referência e a quantidade de proteínas MFS encontrada por espécie.

Tabela 4 – Distribuição de proteínas MFS em *Trichoderma* spp.

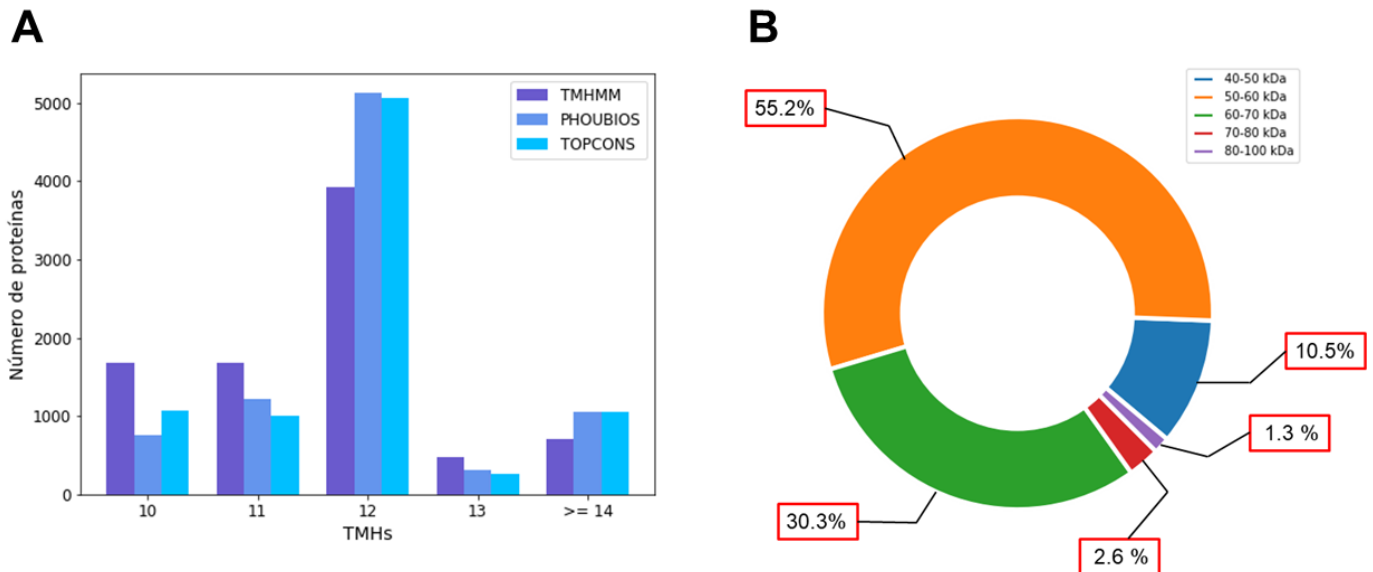
Espécie	Banco de Dados	Total de MFSs	Tamanho do proteoma de referência
<i>T. aggressivum</i>	<i>Trichoderma aggressivum</i> TUCIM 2129	293	12.489
<i>T. alni</i>	<i>Trichoderma alni</i> TUCIM 2657	294	12.485
<i>T. amazonicum</i>	<i>Trichoderma amazonicum</i> TUCIM 4902	291	12.689
<i>T. arundinaceum</i>	<i>Trichoderma arundinaceum</i> IBT 40837	234	10.473
<i>T. asperelloides</i>	<i>Trichoderma asperelloides</i> TUCIM 1893	289	11.746
<i>T. asperellum</i>	<i>Trichoderma asperellum</i> TR356	278	12.320
<i>T. atrobrunneum</i>	<i>Trichoderma atrobrunneum</i> ITEM 908	176	8.637
<i>T. atroviride</i>	<i>Trichoderma atroviride</i> B10 v1.0	293	11.909
<i>T. brevicompactum</i>	<i>Trichoderma brevicompactum</i> IBT 40841	244	10.406
<i>T. cerinum</i>	<i>Trichoderma cerinum</i> TUCIM 2977	349	12.801
<i>T. citrinoviride</i>	<i>Trichoderma citrinoviride</i> TUCIM 6016	205	9.737
<i>T. effusum</i>	<i>Trichoderma effusum</i> TUCIM 254	196	10.381
<i>T. endophyticum</i>	<i>Trichoderma endophyticum</i> TUCIM 4904	334	12.947
<i>T. evansii</i>	<i>Trichoderma evansii</i> TUCIM 4885	311	11.885
<i>T. flagellatum</i>	<i>Trichoderma flagellatum</i> TUCIM 3334	214	10.318
<i>T. gamsii</i>	<i>Trichoderma gamsii</i> T6085	287	10.944

<i>T. guizhouense</i>	<i>Trichoderma guizhouense</i> NJAU 4742	299	11.255
<i>T. hamatum</i>	<i>Trichoderma hamatum</i> GD12	275	10.520
<i>T. harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i> TR274 v1.0	328	13.932
<i>T. helicum</i>	<i>Trichoderma helicum</i> TUCIM 430	241	11.091
<i>T. koningiopsis</i>	<i>Trichoderma koningiopsis</i> TUCIM 4882	314	11.805
<i>T. longibrachiatum</i>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> MK1 v1.0	203	10.046
<i>T. minutisporum</i>	<i>Trichoderma minutisporum</i> TUCIM 495	274	11.228
<i>T. parareesei</i>	<i>Trichoderma parareesei</i> CBS 125925	188	9.062
<i>T. parepimyces</i>	<i>Trichoderma parepimyces</i> TUCIM 2421	219	11.909
<i>T. pleuroti</i>	<i>Trichoderma pleuroti</i> TPhu1	205	10.610
<i>T. reesei</i>	<i>Trichoderma reesei</i> QM6a	211	10.052
<i>T. sinense</i>	<i>Trichoderma sinense</i> TUCIM 527	200	10.243
<i>T. strictipile</i>	<i>Trichoderma strictipile</i> TUCIM 383	262	11.698
<i>T. strigosellum</i>	<i>Trichoderma strigosellum</i> TUCIM 4886	298	11.341
<i>T. velutinum</i>	<i>Trichoderma velutinum</i> TUCIM 298	362	12.935
<i>T. virens</i>	<i>Trichoderma virens</i> GV29_8 v2.0	300	12.423
TOTAL		8.467	

Legenda: As colunas apresentam, respectivamente, as espécies de *Trichoderma* estudadas no presente trabalho, o banco de dados do JGI utilizado para cada uma, a quantidade total de proteínas MFS putativas encontradas por espécie e o tamanho do seu proteoma de referência.

Segundo os dados de predição de hélices transmembrana (TMHs), a maioria das proteínas preditas, cerca de 55,5%, apresentou 12 TMHs e o restante apresentou 10 (13,8%), 11 (15,4%), 13 (4,14%) e 14 ou mais (11,1%) hélices (Figura 6A). O tamanho das sequências variou de 375 resíduos de aminoácidos (40,3 kDa) a 914 resíduos (99,3 kDa), com uma média de 531 resíduos e 58 kDa de peso molecular e, além disso, a maioria apresentou peso molecular entre 50 a 60 kDa (55,2%) e 60 a 70 kDa (30,3%) (Figura 6B).

Figura 6 – Hélices transmembrana e tamanho das MFSs de *Trichoderma* spp.

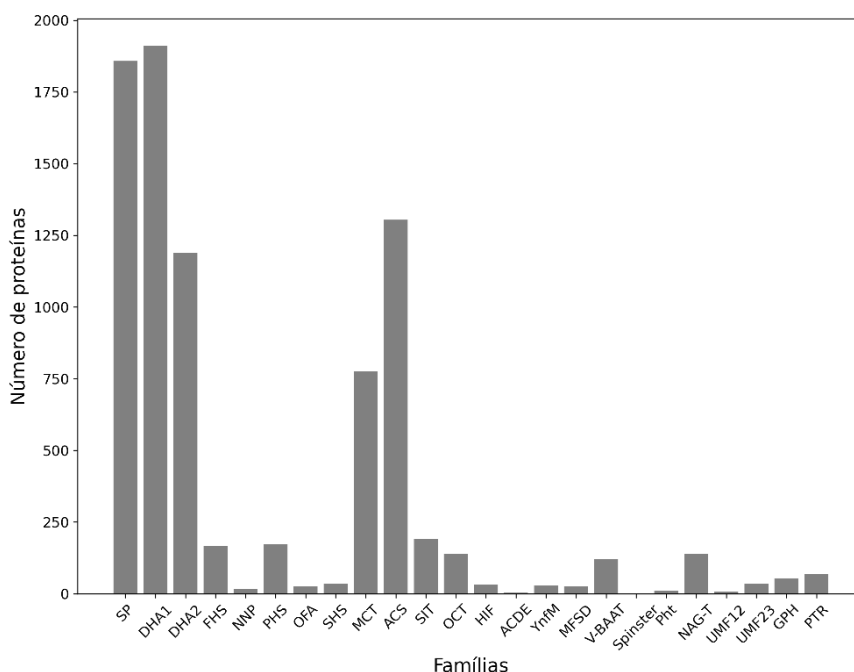


Legenda: **A:** quantidade de proteínas que apresentaram 10, 11, 12, 13 ou ≥ 14 hélices transmembrana (TMHs) em *Trichoderma* spp. **B:** quantidade de proteínas por peso molecular, em kDa, no gênero.

4.2. Classificação das sequências em famílias

Ao todo, foram identificadas 24 famílias de MFS nas 32 espécies de *Trichoderma* analisadas, sendo que, as famílias Sugar Porter – SP (1.858 sequências), Drug:H⁺ Antiporter-1 – DHA1 (1.910 sequências), Drug:H⁺ Antiporter-2 – DHA2 (1.190 sequências), Monocarboxylate Transporter – MCT (777 sequências) e Anion:Cation Symporter – ACS (1.304 sequências) foram encontradas em todas as espécies e apresentaram a maior quantidade de membros, enquanto que The Endosomal Spinster Family (Spinster) e The Putative Aromatic Compound/Drug Exporter Family (ACDE) apresentaram apenas 2 e 3 membros, respectivamente (Figura 7). As famílias e subfamílias encontradas em *Trichoderma* spp. são mostradas no Anexo 1.

Figura 7 – Distribuição das MFS putativas de *Trichoderma* spp. em suas respectivas famílias.

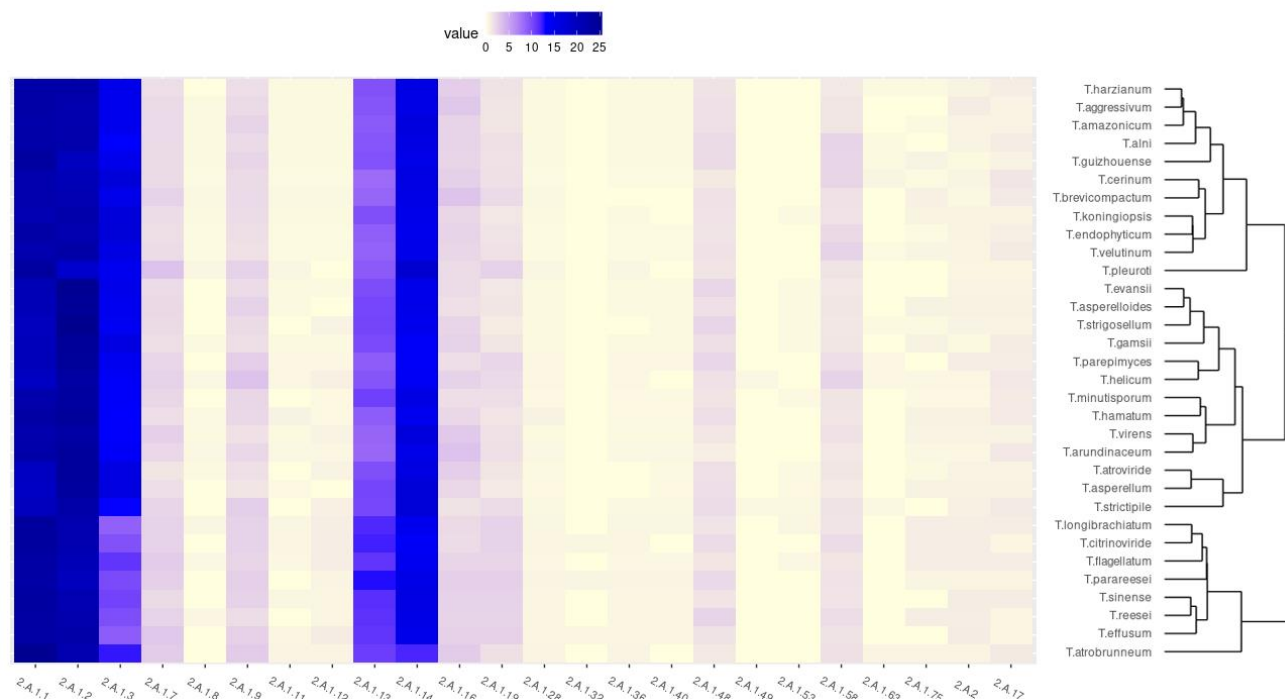


Legenda: As siglas indicam: SP – Sugar Porter; DHA1 – Drug:H⁺ Antiporter-1; DHA2 – Drug:H⁺ Antiporter-2; FHS – Fucose: H⁺ Symporter; NNP – Nitrate/Nitrite Porter; PHS – Phosphate: H⁺ Symporter; OFA – Oxalate:Formate Antiporter; SHS – Sialate:H⁺ Symporter; MCT – Monocarboxylate Transporter; ACS – Anion:Cation Symporter; SIT – Siderophore-Iron Transporter; OCT – Organic Cation Transporter; HIF – Heme Importer Family; ACDE – Putative Aromatic Compound/Drug Exporter; YnfM – Acriflavin-sensitivity; MFSD – Major Facilitator Superfamily Domain-containing Protein; V-BAAT – Vacuolar Basic Amino Acid Transporter; Spinster – Endosomal Spinster Family; Pht – Proteobacterial Intraphagosomal Amino Acid Transporter; NAG-T – N-Acetylglucosamine Transporter; UMF12 – Unidentified Major Facilitator-12; GPH – Glycoside-Pentoside-Hexuronide:Cation Symporter; PTR – Proton-dependent Oligopeptide Transporter.

A maioria das famílias foram identificadas em todas as espécies, com exceção das famílias NNP (2.A.1.8), OFA (2.A.1.11), SHS (2.A.1.12), ACDE (2.A.1.32), YnfM (2.A.1.36), MFSD (2.A.1.40), Spinster (2.A.1.49), Pht (2.A.1.53), UMF12 (2.A.1.63) e UMF23 (2.A.1.75) (Figura 8). Na Figura 8, é possível observar uma distribuição homogênea da porcentagem de membros das famílias, com relação ao total de MFS identificado na espécie, contudo, houve uma diminuição dessa taxa na família DHA2 (2.A.1.3) em *T. longibrachiatum*, *T. citrinoviride*, *T. flagelatum*, *T. parareesei*, *T. sinense*, *T. reesei* e *T. effusum*. Por outro lado, *T. parareesei*, *T. citrinoviride* e *T. longibrachiatum* apresentaram uma proporção maior de transportadores da família MCT (2.A.1.13) (Material S2, disponível em – DOI: 10.6084/m9.figshare.14642436).

No entanto, de acordo com o teste exato de Fisher aplicado, não houve enriquecimento significativo de nenhuma família nas espécies analisadas.

Figura 8 – Quantidade de membros de cada família MFS encontrados por espécie de *Trichoderma*.



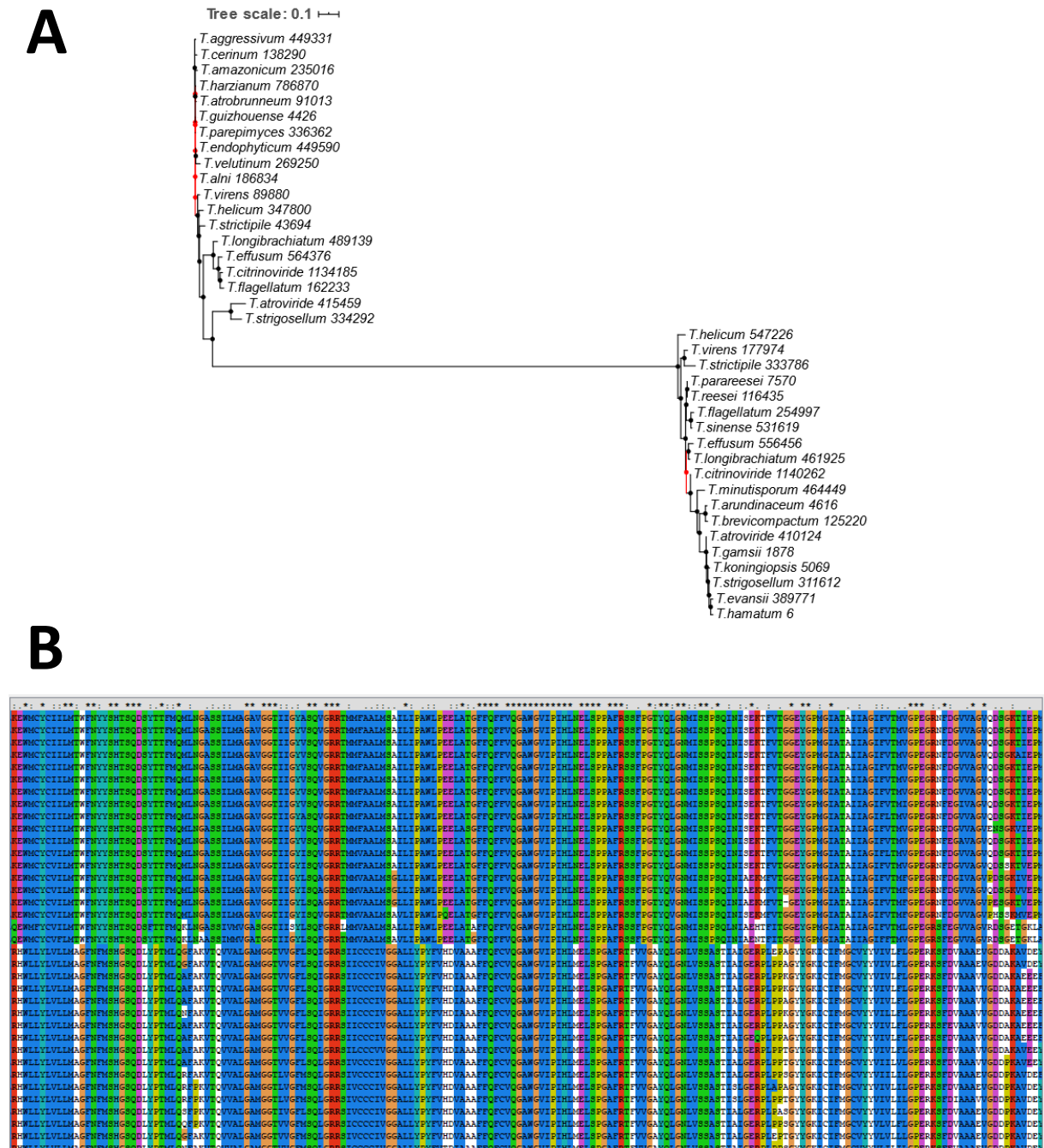
Legenda – Os valores das células representam a porcentagem da quantidade de membros da família com relação ao total de MFS identificado na espécie, e estão disponíveis, em DOI: 10.6084/m9.figshare.14642436.

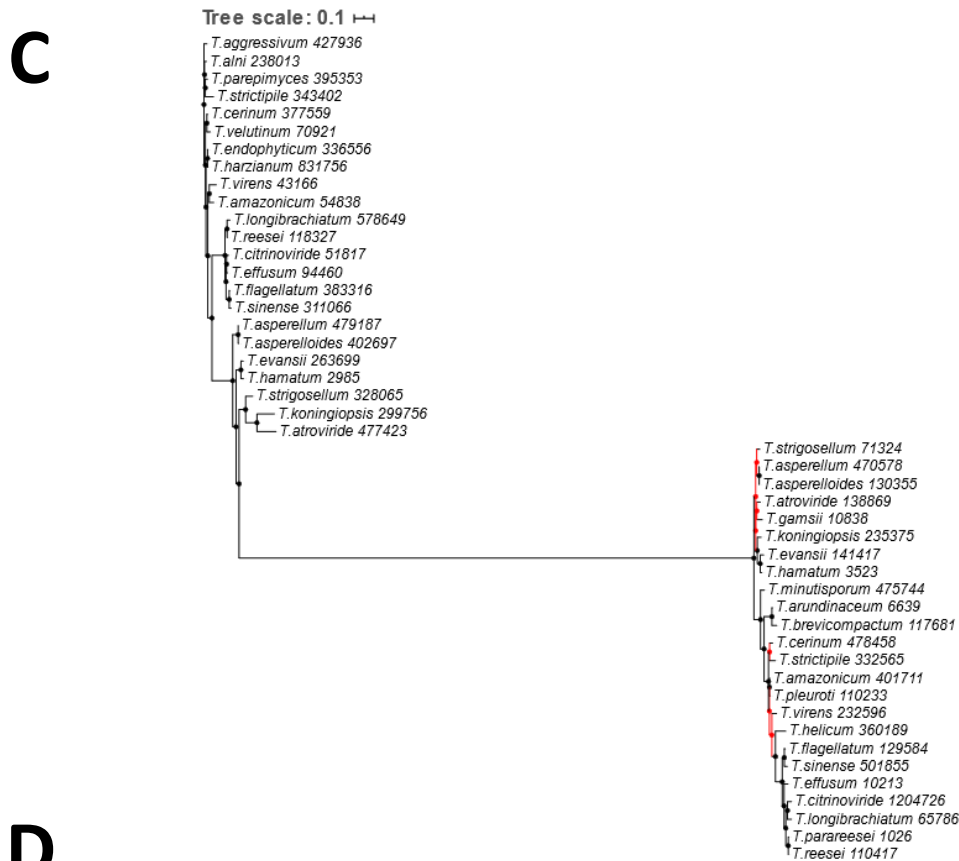
4.3. Análises filogenéticas

Nas análises filogenéticas, foi possível observar que as sequências se agruparam nas árvores de acordo com suas funções, e não de acordo com as linhagens dos fungos, evidenciando, desta forma, os genes ortólogos entre as espécies (S3, disponível em – DOI: 10.6084/m9.figshare.14642457). As famílias representadas nas imagens, são: A: 2.A.1.8., B: 2.A.1.11., C: 2.A.1.36., D: 2.A.1.40., E: 2.A.1.53., F: 2.A.1.63., G: 2.A.1.7., H: 2.A.1.9., I: 2.A.1.16., J: 2.A.1.19., K: 2.A.1.48., L: 2.A.1.58., M: 2.A.1.75., N: 2.A.17., O: 2.A.1.1., P: 2.A.1.2., Q: 2.A.1.3., R: 2.A.1.13., S: 2.A.1.14. As linhas vermelhas representam valores de bootstrap menores que 50/100). Além disso, nas árvores de famílias com grande quantidade de membros (árvores I, K, O a S) foi possível observar subfamílias monofiléticas e polifiléticas, no entanto, a maioria se apresentou parafilética. Já as sequências das famílias SHS (2.A.1.12.) e GPH (2.A.2.), mesmo apresentando apenas uma única subfamília,

formaram dois clados distintos, sugerindo uma possível nova divisão dentro destas subfamílias (Figura 9).

Figura 9 – Árvores filogenéticas dos transportadores MFS das famílias SHS e GPH.



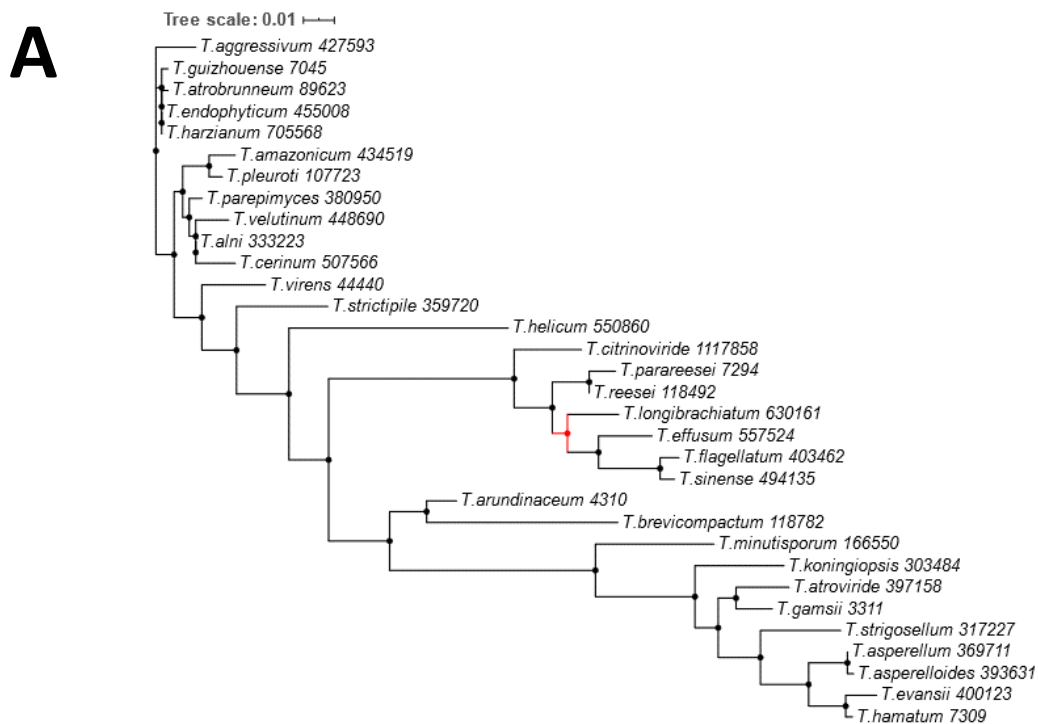


Legenda: As imagens **A** e **B** mostram a árvore filogenética da família SHS (2.A.1.12.) e o alinhamento das sequências, respectivamente, evidenciando dois grupos distintos dentro desta mesma subfamília. De modo semelhante, as imagens **C** e **D** representam a árvore e o alinhamento da família GPH (2.A.2.). As linhas vermelhas representam valores de bootstrap menores que 50/100.

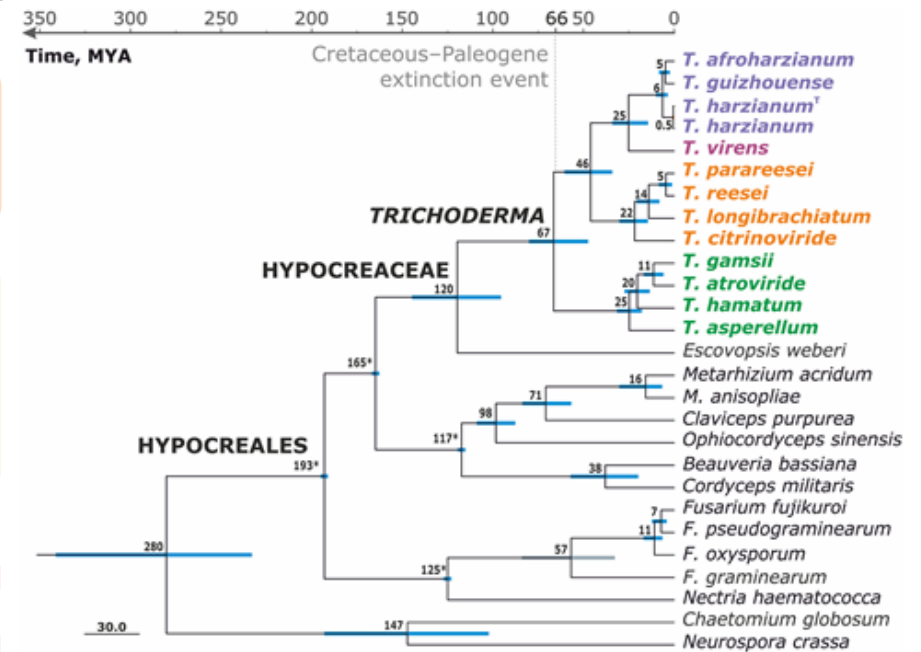
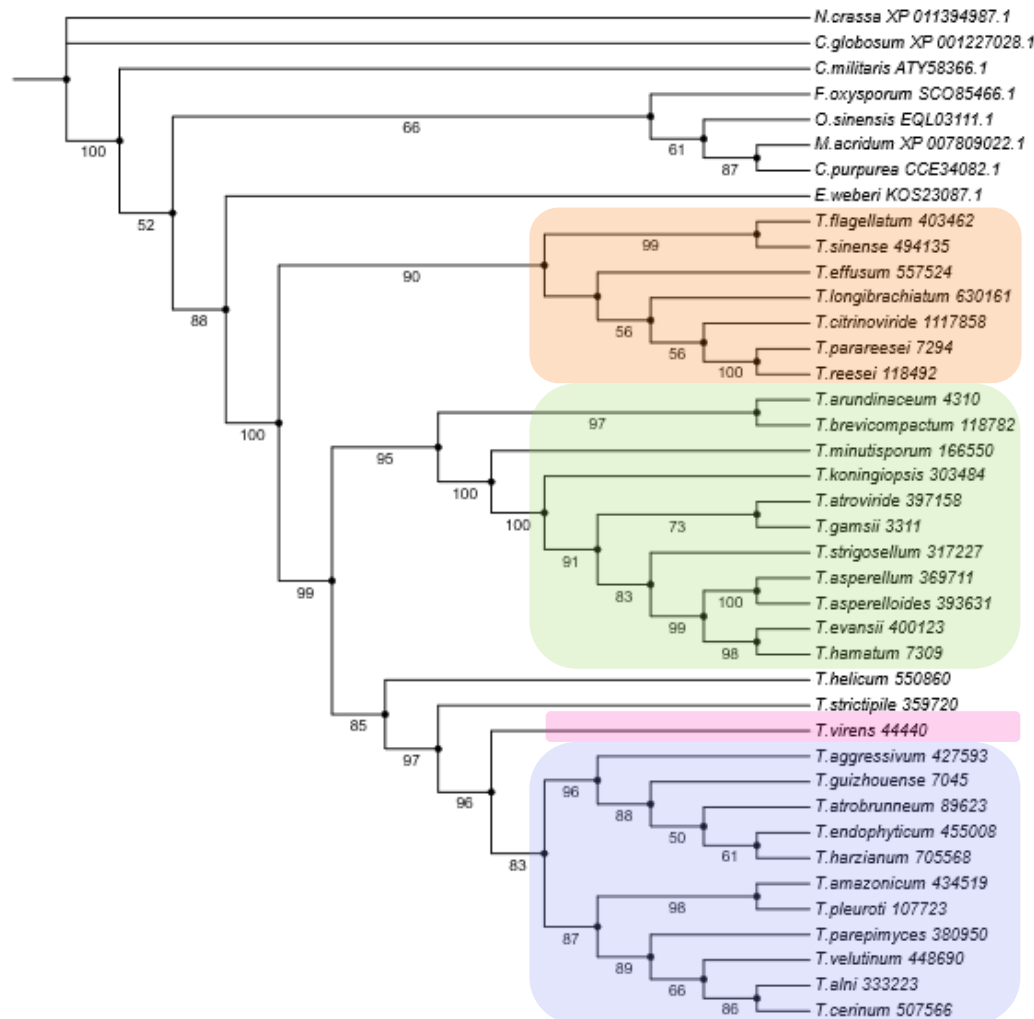
De todas as famílias identificadas no presente trabalho, a família HIF (2.A.1.28.) foi a única que apresentou apenas um representante em cada espécie – com exceção de *T. hamatum*, que apresentou duas sequências. No entanto, a sequência *T.hamatum_3391* foi descartada da análise, já que apresentou-se mal alinhada no alinhamento múltiplo. Uma vez que genes de cópia única são considerados os melhores alvos para análises filogenéticas (AGUILETA *et al.*, 2008), este potencial foi testado para os genes HIF.

Para isso, foi utilizada como referência a árvore construída por Kubicek e colaboradores (2019), que utilizaram sequências de aminoácidos de 638 proteínas codificadas por genes de cópia única em fungos das classes Sordariomycetes e Hypocreaceae, a qual foi comparada à árvore construída com as sequências das proteínas MFS putativas da família HIF (Figura 10B).

Figura 10 – Análise filogenética da família HIF (2.A.1.28.) de *Trichoderma* spp.



B



Legenda: **A:** Árvore filogenética dos transportadores MFS de *Trichoderma* spp. da família HIF (2.A.1.28.); **B:** Comparação entre a árvore construída utilizando sequências de aminoácidos das proteínas da família HIF, à esquerda, e a árvore obtida da concatenação de 638 proteínas ortólogas codificadas por genes de cópia única, à direita (fonte: Kubicek et al, 2019). As linhas vermelhas representam valores de bootstrap menores que 50/100. As sequências de aminoácidos dos fungos externos ao gênero *Trichoderma* podem ser obtidas pela busca de seus respectivos códigos de identificação no banco de dados do NCBI. As cores indicam: Laranja: Seção *Longibrachiatum*; Verde: Seção *Trichoderma*; Rosa: Clado *Virens*; Azul: Seção *Pachybasium* B.

A árvore filogenética construída com as sequências de aminoácidos das proteínas MFS putativas da família HIF mostrou similaridade entre as relações filogenéticas apresentadas pelas espécies, com relação ao estudo de Kubicek e colaboradores (2019), com exceção de *C. militares*, que se agrupou de forma diferente nas árvores. No entanto, a relação entre as seções *Trichoderma* e *Pachybasium* B sofreu uma significativa alteração.

Por fim, também foi realizada a análise filogenética exclusiva para as sequências MFS de *T. harzianum* a fim de conhecer melhor as relações filogenéticas entre as diferentes famílias de MFS (S3, disponível em – DOI: 10.6084/m9.figshare.14642457). De acordo com esses resultados, pode-se destacar a proximidade filogenética entre as famílias DHA1 (2.A.1.2) e DHA2 (2.A.1.3), no entanto, houve o agrupamento das famílias V-BAAT (2.A.1.48) e SIT (2.A.1.16) dentro do cluster da família DHA1. Também é possível visualizar uma proximidade entre a família SP (2.A.1.1) e a família GPH (2.A.2), o que é explicado pela semelhança entre os solutos transportados por essas proteínas.

4.4. Análise de MFSs em transcriptomas de *T. harzianum*

Dos 328 transportadores MFS identificados em *T. harzianum* no presente trabalho, 83,5% (274) foram diferencialmente expressos na presença de metais e durante o micoparasitismo. Nas condições em que o fungo cresceu em contato com o metal alumínio, foram 114 genes diferencialmente expressos (DEGs) em 0,08 mg/mL, 79 em 1,5 mg/mL e 77 em 3,0 mg/mL. Quando crescidos em contato com cádmio, foram 126 DEGs em 1,0 mg/mL e 97 em 2,0 mg/mL. Já nas condições de micoparasitismo, foram 189 DEGs em 24 horas e 168 em 36 horas de crescimento (Anexo II).

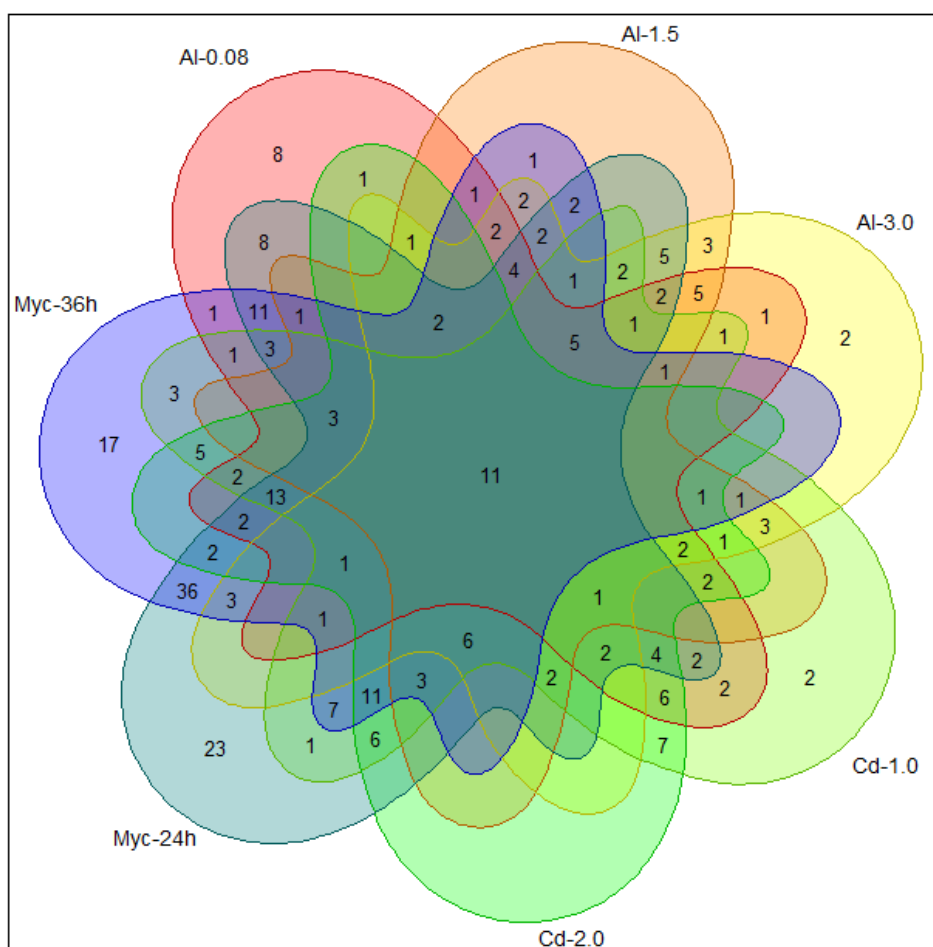
Em relação à presença de DEGs exclusivos para cada tipo de estresse, foram observados 5 genes exclusivos à todas as concentrações de alumínio, 3 exclusivos

de AlCl_3 1,5 mg/mL e 3,0 mg/mL, 7 de CdCl_2 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL e 36 exclusivos de micoparasitismo 24 h e 36 h. Informações sobre a função desses genes são mostradas na Tabela 5. Apenas 11 genes foram comuns a todas as condições (Figura 11A).

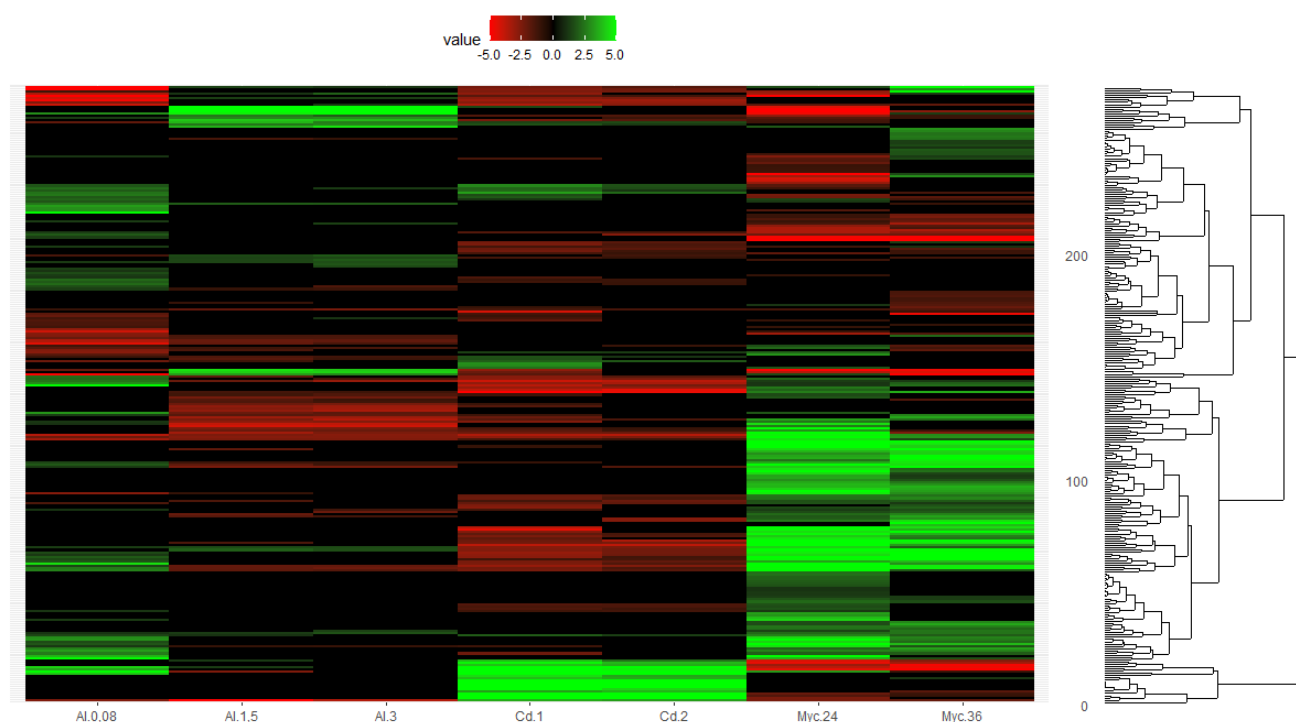
Além disso, é possível observar uma maior indução de genes durante o micoparasitismo em relação às outras condições, e uma repressão maior de genes durante o crescimento do fungo em contato com o metal cádmio. Em relação ao crescimento em contato com o metal alumínio, foi observado um perfil diferente de expressão gênica das MFS na menor concentração do metal em relação às outras duas concentrações, as quais se mostraram semelhantes (Figura 11B).

Figura 11 – Expressão diferencial de transportadores MFS de *T. harzianum* em condições de estresses biótico e abiótico.

A



B



Legenda: **A:** Diagrama de Venn mostrando as relações entre os genes MFS diferencialmente expressos nas condições de AlCl_3 0.08, 1.5 e 3.0 mg/mL, CdCl_2 1.0 e 2.0 mg/mL, e micoparistismo (Myc) 24 e 36 horas. **B:** Heatmap mostrando os genes MFS induzidos, reprimidos e não diferencialmente expressos nas mesmas condições.

Tabela 5 – Genes MFS de *T. harzianum* diferencialmente expressos exclusivamente em cada tipo de estresse.

Família	Gene	Al 0,08	Al 1,5	Al 3,0	Cd 1,0	Cd 2,0	Mic 24	Mic 36
SP	554315	1	1	1	0	0	0	0
SP	812058	1	1	1	0	0	0	0
DHA1	323920	1	1	1	0	0	0	0
DHA2	746092	1	1	1	0	0	0	0
MCT	820470	1	1	1	0	0	0	0
DHA1	821701	0	1	1	0	0	0	0
DHA2	827317	0	1	1	0	0	0	0
MCT	719396	0	1	1	0	0	0	0
SP	753757	0	0	0	1	1	0	0
DHA1	703918	0	0	0	1	1	0	0
DHA1	846731	0	0	0	1	1	0	0
DHA2	701994	0	0	0	1	1	0	0
DHA2	848791	0	0	0	1	1	0	0
DHA2	850117	0	0	0	1	1	0	0
DHA2	859294	0	0	0	1	1	0	0
SP	37358	0	0	0	0	0	1	1
SP	63486	0	0	0	0	0	1	1
SP	483557	0	0	0	0	0	1	1
SP	698375	0	0	0	0	0	1	1
SP	706960	0	0	0	0	0	1	1
SP	724216	0	0	0	0	0	1	1

SP	812150	0	0	0	0	0	1	1
SP	813081	0	0	0	0	0	1	1
SP	813937	0	0	0	0	0	1	1
SP	861236	0	0	0	0	0	1	1
DHA1	2622	0	0	0	0	0	1	1
DHA1	225818	0	0	0	0	0	1	1
DHA1	230680	0	0	0	0	0	1	1
DHA1	705321	0	0	0	0	0	1	1
DHA1	709277	0	0	0	0	0	1	1
DHA1	780122	0	0	0	0	0	1	1
DHA1	780640	0	0	0	0	0	1	1
DHA1	820209	0	0	0	0	0	1	1
DHA1	847285	0	0	0	0	0	1	1
DHA2	537900	0	0	0	0	0	1	1
DHA2	712360	0	0	0	0	0	1	1
DHA2	752480	0	0	0	0	0	1	1
DHA2	811778	0	0	0	0	0	1	1
DHA2	824558	0	0	0	0	0	1	1
MCT	63238	0	0	0	0	0	1	1
MCT	601158	0	0	0	0	0	1	1
MCT	821824	0	0	0	0	0	1	1
MCT	833476	0	0	0	0	0	1	1
ACS	145669	0	0	0	0	0	1	1
ACS	221419	0	0	0	0	0	1	1
ACS	367293	0	0	0	0	0	1	1
ACS	690104	0	0	0	0	0	1	1
ACS	697648	0	0	0	0	0	1	1
ACS	699362	0	0	0	0	0	1	1
SIT	850683	0	0	0	0	0	1	1
V-BAAT	756304	0	0	0	0	0	1	1

Legenda: Números 1 indicam que houve expressão diferencial do gene na condição, enquanto que números 0 indicam que não houve expressão diferencial.

Também foi realizado o teste exato de Fisher para identificar se houve o enriquecimento de alguma família na resposta aos estresses em *T.harzianum*. Desta forma, as famílias mais diferencialmente expressas, respectivamente, foram: ACS (p-valor = 0,001335) e DHA2 (p-valor = 0,002986) durante micoparasitismo 24 h, FHS na presença de alumínio 3,0 (p-valor = 0,007424) e 1,5 mg/mL (p-valor = 0,008401), MCT na presença de cádmio 2,0 mg/mL (p-valor = 0,04667) e PHS na presença de alumínio 3,0 (p-valor = 0,05) e 1,5 mg/mL (p-valor = 0,05).

5. DISCUSSÃO

Os fungos do gênero *Trichoderma* apresentam grande valor biotecnológico, uma vez que inibem o crescimento de fitopatógenos através do micoparasitismo e por serem altamente tolerantes a estresses abióticos, tornando-se uma opção sustentável para o controle de pragas na agricultura e na retirada de metais de solos e águas contaminadas. Durante essas atividades, proteínas transportadoras presentes nas membranas biológicas são necessárias, seja para a absorção de nutrientes durante o micoparasitismo ou para a extrusão de íons metálicos durante o processo de biorremediação. Dentre esses transportadores, a superfamília MFS compreende a maior família de transportadores secundários presentes nos organismos.

Sendo assim, para elucidar a função dos transportadores MFS de *Trichoderma* spp. durante o micoparasitismo e também na presença de metais, foi realizado o levantamento e caracterização de todos os transportadores pertencentes à superfamília MFS em 32 espécies de *Trichoderma*, bem como a categorização em suas respectivas famílias e subfamílias. Além disso, foi feito o estudo filogenético destas proteínas putativas e a análise da expressão diferencial dos seus genes codificadores durante o crescimento do fungo em contato com diferentes concentrações dos metais alumínio e cádmio, e na presença da parede celular do fitopatógeno *S. sclerotiorum*.

Utilizando o proteoma de referência das 32 espécies de *Trichoderma* disponíveis no banco de dados Mycocosm do JGI, foram identificadas 8,467 sequências de aminoácidos preditas como MFS, com uma média de 264 ± 51 sequências por espécie. Esse número foi maior do que o encontrado em *Arabidopsis thaliana* (218), *Sorghum bicolor* (257), *Candida albicans* (95), *Saccharomyces cerevisiae* (186), *T. reesei* (148) e *Trichoderma* spp. (estudo feito com 12 espécies de *Trichoderma*, apresentando média = 215) (CHAUDHARY *et al.*, 2016; GAUR *et al.*, 2008; KUBICEK *et al.*, 2019; NELISSEN; WACHTER; GOFFEAU, 2006; NIÑO-GONZÁLEZ *et al.*, 2019; SEKHWAL; SHARMA; SARIN, 2013).

Essa diferença pode ter se dado pelas diferentes metodologias empregadas, bem como o tamanho dos bancos de dados utilizados. Além disso, foi observada uma grande variação entre a quantidade de sequências MFS obtidas em cada espécie, com uma amplitude igual a 186. Kubicek e colaboradores (2019) mostraram que ao longo da evolução, o genoma das espécies *T. harzianum*, *T. virens*, *T. guizhouense*, *T. atroviride*, *T. gamsii*, *T. asperellum* e *T. hamatum* adquiriram genes MFS, enquanto

que em espécies da seção *Longibrachiatum* (*T. reesei*, *T. citrinoviride*, *T. longibrachiatum* e *T. parareesei*) houve perda destes genes, o que é corroborado pelos resultados observados no presente trabalho. Já a baixa quantidade de genes MFS em *T. atrobrunneum* pode ter se dado pela anotação gênica, uma vez que esta foi feita de forma automática.

Neste trabalho, foi observado que o surgimento dos clados *Harzianum/Virens* e da seção *Trichoderma* se deu com a expansão do genoma do fungo, enquanto que a seção *Longibrachiatum*, que se desenvolveu posteriormente, surgiu a partir da contração do genoma. Os autores explicam este resultado pela hipótese da simplificação (DUFRESNE; GARCZAREK; PARTENSKY, 2005), que considera que a performance de um organismo é pouco afetada pela presença ou ausência de múltiplos genes de mesma função e, portanto, seria mais vantajoso para a célula possuir menos genes de uma mesma classe, economizando energia.

Interessantemente, *T. harzianum*, *T. virens*, *T. atroviride* e *T. asperellum*, que são espécies com maior potencial para o biocontrole, apresentaram maior quantidade de transportadores MFS que as espécies *T. reesei*, mais utilizada na indústria para degradação de celulose, e *T. citrinoviride* e *T. longibrachiatum*, mais frequentemente associadas à patogenicidade em humanos (LIU *et al.*, 2019; MUKHERJEE *et al.*, 2013). Esses resultados indicam fortemente que transportadores MFS podem ser fatores de patogenicidade para o fungo durante o micoparasitismo, juntamente com outros genes envolvidos neste processo, possivelmente devido a uma maior necessidade de secreção de metabólitos e enzimas, e absorção de nutrientes, comparado às outras condições.

Segundo Reddy *et al.* (2012) e Yan (2013), proteínas MFS apresentam de 12 a 14 hélices transmembrana, com poucas apresentando 16, 18 ou 24 e a grande maioria apresentando 12 hélices. Os dados obtidos corroboram essa informação, uma vez que a maioria dos transportadores MFS identificados também apresentou 12 TMHs. Quanto ao tamanho destas proteínas, a maioria apresentou de 50 a 70 kDa, resultado também corroborado pelo TCDB.

Após a categorização das sequências em famílias, aquelas que apresentaram mais membros foram SP, DHA1, DHA2, MCT e ACS. Essas famílias estão relacionadas à nutrição do fungo (SP, MCT), manutenção da homeostase celular (ACS) e defesa, principalmente, contra xenobióticos (DHA1 e DHA2). Por estarem relacionados ao funcionamento basal do fungo, é esperado uma maior quantidade

desses genes no genoma do organismo. Além disso, não foi observado enriquecimento de nenhuma família nas espécies analisadas, indicando que esses transportadores estão distribuídos proporcionalmente dentro das famílias no fungo.

Com relação às análises filogenéticas, sequências MFS de mesma família mostraram um alto grau de conservação e, além disso, foi observado nas árvores que tais sequências se agruparam de acordo com suas funções (subfamília) e não de acordo com as linhagens, fato também observado por Vishwakarma e colaboradores (2018). Assim, as árvores apresentam as sequências ortólogas entre os fungos, indicando funções semelhantes destes transportadores entre as espécies.

Todas as sequências das famílias SHS (2.A.1.12) e GPH (2.A.2) foram identificadas como pertencentes às mesmas subfamílias (2.A.1.12.2 e 2.A.2.6.1, respectivamente), no entanto, ambas famílias apresentaram dois grupos diferentes nas análises filogenéticas (Figura 10). Esse resultado pode indicar uma especialização de algum dos grupos, sendo necessárias mais análises, tanto *in silico* como *in vitro*, para confirmar essa observação.

Além disso, a família HIF (ou FLVCR), que ainda não tem função bem definida pela literatura, apresentou apenas uma sequência para cada espécie, indicando assim, que esses genes estão presentes em cópia única no genoma dos organismos. De fato, as análises realizadas indicaram apenas um gene, homólogo a representantes desta família em *Trichoderma* spp., nos fungos *Neurospora crassa*, *Chaetomium globosum*, *Cordyceps militaris*, *Fusarium oxysporum*, *Ophiocordyceps sinensis*, *Metarhizium acridum*, *Claviceps purpurea* e *Escovopsis weberi*. No entanto, não foram encontrados genes para esses transportadores em *Blastocladiella emersonii*, *Nectria haematococca* e *Beauveria bassiana*.

Para testar a hipótese do uso destas sequências como marcadores filogenéticos, um teste inicial foi feito construindo uma árvore filogenética destas espécies de ascomicetos, utilizando a sequência de aminoácidos desses transportadores e comparando o resultado com a árvore construída por Kubicek e colaboradores (2019). Com exceção de *C. militares*, as relações filogenéticas das espécies analisadas foram similares, quando comparado com a árvore de referência. No entanto, a relação entre as seções *Trichoderma* e *Pachybasium B* sofreu alterações e como essa relação é bem estabelecida pela literatura (DRUZHININA; KUBICEK, 2005), foi descartado o uso das sequências HIF como marcadores filogenéticos.

Por fim, foram utilizados dados públicos de RNA-Seq para conhecer o perfil de expressão dos genes MFS de *T. harzianum* durante o crescimento em contato com o metal e em condições simulando o micoparasitismo (presença da parede celular de *S. sclerotiorum*). Dos 328 genes, 274 foram diferencialmente expressos em todas as condições, enquanto que apenas 54 genes não foram diferencialmente expressos ou não apresentaram valores de padj significativos, mostrando que os transportadores MFS são importantes para o enfrentamento e/ou manutenção da homeostasia durante esses estresses.

Além disso, foi observado que condições mais extremas, como maiores concentrações de metais e tempo prolongado de micoparasitismo, apresentaram uma menor quantidade de genes diferencialmente expressos do que tempos mais curtos de micoparasitismo e menores concentrações de metais. Este resultado pode indicar que tais condições extremas afetam negativamente a expressão gênica do fungo e, assim, a partir de um determinado momento, a tolerância do fungo ao estresse diminui e seu metabolismo é significativamente prejudicado, afetando, no caso dos transportadores MFS, o transporte de substratos e metabólitos.

Com relação ao metal alumínio, a menor concentração utilizada (0,08 mg/mL), que é semelhante à encontrada nos solos onde *T. harzianum* cresce naturalmente, mostrou um perfil de expressão desses genes diferente das concentrações maiores (1,5 e 3,0 mg/mL). Esse resultado também é observado na análise global dos genes diferencialmente expressos em *T. harzianum* (SANTOS, 2017 e dados não publicados), no entanto, deve-se levar em consideração que os tempos em que o fungo cresceu em contato com o metal foram diferentes.

Já o metal pesado cádmio, provocou uma maior repressão dos transportadores MFS, comparado com todas as condições, diferentemente das condições de micoparasitismo, onde houve uma alta indução desses transportadores. Sabendo-se que o cádmio é um metal altamente danoso à saúde de seres vivos, o efeito de repressão observado na análise de RNA-Seq sugere que a atividade destes transportadores pode ser afeta pelo metal. Além disso, o micoparasitismo promoveu uma modulação maior dos genes MFS em *T. harzianum*, comparado com as outras condições analisadas.

Por fim, as famílias ACS e DHA2, FHS e PHS, e MCT mostraram enriquecimento significativo, respectivamente, durante o micoparasitismo e na

resposta à presença de alumínio e cádmio, indicando uma possível atuação durante esses estresses em *T. harzianum*.

6. CONCLUSÕES

- *Trichoderma* spp. apresenta uma média de sequências MFS putativas maior que de outros organismos e uma grande variação de quantidade entre as espécies. Espécies de *Trichoderma* utilizadas como agente de biocontrole apresentam mais transportadores MFS que espécies utilizadas na indústria e patógenos humanos, sugerindo uma maior necessidade desses transportadores durante o micoparasitismo.
- Ao todo, as análises sugerem que há 24 famílias MFS nas 32 espécies analisadas, estando a maioria presente em todas as espécies e com boa distribuição. As famílias que apresentam maior quantidade de membros são aquelas associadas a nutrição, defesa e manutenção da homeostase do fungo.
- As famílias SHS (2.A.1.12) e GPH (2.A.2) apresentam dois grupos diferentes nas árvores, de acordo com as análises filogenéticas sugerindo uma especialização de um dos grupos ainda não descrita. Já os transportadores da família HIF (2.A.1.28) estão codificados em genes de cópia única no genoma de *Trichoderma* spp.
- Em *T. harzianum*, durante o micoparasitismo é observada uma maior indução na quantidade de genes MFS do que o crescimento na presença de metais, enquanto que o metal cádmio reprime uma quantidade maior de genes. Já na presença do alumínio, a menor concentração do metal apresenta um perfil de expressão diferente das concentrações maiores. As famílias ACS e DHA2 foram as mais diferencialmente expressas durante micoparasitismo 24 h, enquanto que FHS e PHS foram as mais diferencialmente expressas na presença de alumínio 1,5 e 3,0 mg/mL e MCT na presença de cádmio 2,0 mg/mL.

Referências Bibliográficas

AGUILETA, G.; MARTHEY, S.; CHIAPELLO, H.; LEBRUN, M.-H.; RODOLPHE, F.; FOURNIER, E.; GENDRAULT-JACQUEMARD, A.; GIRAUD, T. Assessing the Performance of Single-Copy Genes for Recovering Robust Phylogenies. **Systematic Biology**, [S.L.], v. 57, n. 4, p. 613-627, 1 ago. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1080/10635150802306527>.

AKAGI, Tomoaki; KAWAMURA, Chizuko; TERASAWA, Norio; YAMAGUCHI, Kohei; KUBO, Kohmei. Suspected Pulmonary Infection with *Trichoderma longibrachiatum* after Allogeneic Stem Cell Transplantation. **Internal Medicine**, [S.L.], v. 56, n. 2, p. 215-219, 2017. Japanese Society of Internal Medicine. <http://dx.doi.org/10.2169/internalmedicine.56.5316>.

ANDREWS, S., 2010. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

ALTSCHUL, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." **J. Mol. Biol.** 215:403-410.

BANG O., ORSKOV S.L. Variations in the permeability of the red blood cells in man, with particular reference to the conditions obtaining in pernicious anemia. **Clin. Investig.** 1937. 16:279-88.

BARTNICKI-GARCIA, S. Cell Wall Chemistry, Morphogenesis, and Taxonomy of Fungi. **Annual Review Of Microbiology**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 87-108, out. 1968. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.22.100168.000511>.

BIASZCZYK, Lidia; SIWULSKI, Marek; SOBIERALSKI, Krzysztof; LISIECKA, Jolanta; JęDRYCZKA, Małgorzata. *Trichoderma* spp. – application and prospects for use in organic farming and industry. **Journal Of Plant Protection Research**, [S.L.], v. 54, n. 4, p. 309-317, 30 dez. 2014. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.2478/jppr-2014-0047>.

BISSETT, J.. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. **Canadian Journal Of Botany**, [S.L.], v. 62, n. 5, p. 924-931, 1 maio 1984. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/b84-131>.

BISSETT, John; GAMS, Walter; JAKLITSCH, Walter; SAMUELS, Gary J.. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. **Ima Fungus**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 263-295, 29 set 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.5598/imafungus.2015.06.02.02>.

BOLGER, Anthony M.; LOHSE, Marc; USADEL, Bjoern. Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data. **Bioinformatics**, [S.L.], v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 1 abr. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.

BROTMAN, Yariv; LISEC, Jan; MÉRET, Michaël; CHET, Ilan; WILLMITZER, Lothar; VITERBO, Ada. Transcript and metabolite analysis of the *Trichoderma*-induced

systemic resistance response to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*. **Microbiology**, [S.L.], v. 158, n. 1, p. 139-146, 1 jan. 2012. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.052621-0>.

BOSE, J.; BABOURINA, O.; RENGEL, Z.. Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants. **Journal Of Experimental Botany**, [S.L.], v. 62, n. 7, p. 2251-2264, 27 jan. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erq456>.

CACCIOLA, Santa O.; PUGLISI, Ivana; FAEDDA, Roberto; SANZARO, Vincenzo; PANE, Antonella; LOPIERO, Angela R.; EVOLI, Maria; PETRONE, Goffredo. Cadmium induces cadmium-tolerant gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. **Molecular Biology Reports**, [S.L.], v. 42, n. 11, p. 1559-1570, 9 set 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-015-3924-4>.

CAI, Feng; DRUZHININA, Irina S.. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of trichoderma. **Fungal Diversity**, [S.L.], v. 107, n. 1, p. 1-69, 5 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-020-00464-4>.

CAMPOS, M. L. et al. (2013) 'Teores de arsênio e cádmio em solos do bioma cerrado', **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 37.

CHAUDHARY, Nitika; KUMARI, Indu; SANDHU, Padmani; AHMED, Mushtaq; AKHTER, Yusuf. Proteome scale census of major facilitator superfamily transporters in *Trichoderma reesei* using protein sequence and structure based classification enhanced ranking. **Gene**, [S.L.], v. 585, n. 1, p. 166-176, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2016.03.043>.

CHAUDHARY, Nitika; SANDHU, Padmani; AHMED, Mushtaq; AKHTER, Yusuf. Structural basis of transport function in major facilitator superfamily protein from *Trichoderma harzianum*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 95, p. 1091-1100, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.099>.

CHEN, Kai; ZHUANG, Wen-Ying. Three New Soil-inhabiting Species of *Trichoderma* in the Stromaticum Clade with Test of Their Antagonism to Pathogens. **Current Microbiology**, [S.L.], v. 74, n. 9, p. 1049-1060, 19 jun. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-017-1282-2>.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas, Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, nº 249, de 30/12/2009, págs. 81-84. Disponível em: <http://www.mma.gov.br>.

CONTRERAS-CORNEJO, Hexon Angel; MACÍAS-RODRÍGUEZ, Lourdes; DEL-VAL, Ek; LARSEN, John. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. **Fems Microbiology Ecology**, [S.L.], v. 92, n. 4, p. 036-45, 22 fev. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femsec/fiw036>.

CONTRERAS-CORNEJO, Hexon Angel; MACÍAS-RODRÍGUEZ, Lourdes; CORTÉS-PENAGOS, Carlos; LÓPEZ-BUCIO, José. *Trichoderma virens*, a Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent Mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, [S.L.], v. 149, n. 3, p. 1579-1592, 28 jan. 2009. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.108.130369>.

CONTRERAS-CORNEJO, Hexon Angel; MACÍAS-RODRÍGUEZ, Lourdes; BELTRÁN-PEÑA, Elda; HERRERA-ESTRELLA, Alfredo; LÓPEZ-BUCIO, José. *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal- and camalexin-dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea*. **Plant Signaling & Behavior**, [S.L.], v. 6, n. 10, p. 1554-1563, out. 2011. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/psb.6.10.17443>.

COPPOLA, Mariangela; DIRETTO, Gianfranco; DIGILIO, Maria Cristina; WOO, Sheridan Lois; GIULIANO, Giovanni; MOLISSO, Donata; PENNACCHIO, Francesco; LORITO, Matteo; RAO, Rosa. Transcriptome and Metabolome Reprogramming in Tomato Plants by *Trichoderma harzianum* strain T22 Primes and Enhances Defense Responses Against Aphids. **Frontiers In Physiology**, [S.L.], v. 10, p. 1-15, 21 jun. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2019.00745>.

DELABONA, Priscila da Silva; CODIMA, Carla Aloia; RAMONI, Jonas; ZUBIETA, Mariane Paludetti; ARAËJO, Bruna Martins de; FARINAS, Cristiane Sanchez; PRADELLA, José Geraldo da Cruz; SEIBOTH, Bernhard. The impact of putative methyltransferase overexpression on the *Trichoderma harzianum* cellulolytic system for biomass conversion. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 313, p. 123616-123630, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123616>.

DUPLESSIS, Ihan L.; DRUZHININA, Irina S.; ATANASOVA, Lea; YARDEN, Oded; JACOBS, Karin. The diversity of *Trichoderma* species from soil in South Africa, with five new additions. **Mycologia**, [S.L.], v. 110, n. 3, p. 559-583, 4 maio 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00275514.2018.1463059>.

DUFRESNE, Alexis; GARCZAREK, Laurence; PARTENSKY, Frédéric. Accelerated evolution associated with genome reduction in a free-living prokaryote. **Genome Biology**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 14-20, 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2005-6-2-r14>.

DRUZHININA, Irina; KUBICEK, Christian P.. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters?. **Journal Of Zhejiang University Science**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 100-112, fev. 2005. Zhejiang University Press. <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.2005.b0100>.

FIORENTINO, Nunzio; VENTORINO, Valeria; WOO, Sheridan L.; PEPE, Olimpia; ROSA, Armando de; GIOIA, Laura; ROMANO, Ida; LOMBARDI, Nadia; NAPOLITANO, Mauro; COLLA, Giuseppe. Trichoderma-Based Biostimulants Modulate Rhizosphere Microbial Populations and Improve N Uptake Efficiency, Yield, and Nutritional Quality of Leafy Vegetables. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 9, p. 1-15, 5 jun. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2018.00743>.

FONSECA, Paula L. C.; BADOTTI, Fernanda; DE-PAULA, Ruth B.; ARAÚJO, Daniel S.; BORTOLINI, Dener E.; DEL-BEM, Luiz-Eduardo; AZEVEDO, Vasco A.; BRENIG, Bertram; AGUIAR, Eric R. G. R.; GÓES-NETO, Aristóteles. Exploring the Relationship Among Divergence Time and Coding and Non-coding Elements in the Shaping of Fungal Mitochondrial Genomes. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 11, p. 1-17, 29 abr. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00765>.

FREITAS, Carlos Machado de; BARCELLOS, Christovam; ASMUS, Carmen Ildes Rodrigues Fróes; SILVA, Mariano Andrade da; XAVIER, Diego Ricardo. Da Samarco em Mariana à Vale em Brumadinho: desastres em barragens de mineração e saúde coletiva. **Cadernos de Saúde Pública**, [S.L.], v. 35, n. 5, p. 1-15, 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311x00052519>.

GADSBY, D.C.. Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 2009. 10:344-52.

GARDES, M.; BRUNS, T. D.. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 113-118, abr. 1993. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x>.

GARNICA-VERGARA, Amira; BARRERA-ORTIZ, Salvador; MUÑOZ-PARRA, Edith; RAYA-GONZÁLEZ, Javier; MÉNDEZ-BRAVO, Alejandro; MACÍAS-RODRÍGUEZ, Lourdes; RUIZ-HERRERA, León Francisco; LÓPEZ-BUCIO, José. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. **New Phytologist**, [S.L.], v. 209, n. 4, p. 1496-1512, 16 nov. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.13725>.

GAUR, Manisha; PURI, Nidhi; MANOHARLAL, Raman; RAI, Versha; MUKHOPADHAYAY, Gauranga; CHOUDHURY, Devapriya; PRASAD, Rajendra. MFS transportome of the human pathogenic yeast *Candida albicans*. **Bmc Genomics**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 579-585, 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-579>.

GENCHI, Giuseppe; SINICROPI, Maria Stefania; LAURIA, Graziantonio; CAROCCI, Alessia; CATALANO, Alessia. The Effects of Cadmium Toxicity. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.L.], v. 17, n. 11, p. 3782-3790, 26 maio 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph17113782>.

GRATÃO, Priscila L.; MONTEIRO, Carolina C.; ROSSI, Mônica L.; MARTINELLI, Adriana P.; PERES, Lázaro E.P.; MEDICI, Leonardo O.; LEA, Peter J.; AZEVEDO, Ricardo A.. Differential ultrastructural changes in tomato hormonal mutants exposed

to cadmium. **Environmental And Experimental Botany**, [S.L.], v. 67, n. 2, p. 387-394, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.06.017>.

GRUBER, Sabine; VAAJE-KOLSTAD, Gustav; MATARESE, Fabiola; LÓPEZ-MONDEJAR, Rubén; KUBICEK, Christian P.; SEIDL-SEIBOTH, Verena. Analysis of subgroup C of fungal chitinases containing chitin-binding and LysM modules in the mycoparasite *Trichoderma atroviride*. **Glycobiology**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 122-133, 14 set 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwq142>.

GU, Shiyang; DAI, Jiao; QU, Tengjiao; HE, Zuoshun. Emerging Roles of MicroRNAs and Long Noncoding RNAs in Cadmium Toxicity. **Biological Trace Element Research**, [S.L.], v. 195, n. 2, p. 481-490, 17 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-019-01859-4>.

HALKA, M.; NORDSTROM, B. (2010) Alkali and Alkaline-Earth Metals (Periodic Table of the Elements). Facts on File.

HALKA, M. & NORDSTROM, B., Metals and Metalloids (Periodic Table of the Elements). [s.l.];Facts on File, 2011.

HARMAN, Gary E.; HOWELL, Charles R.; VITERBO, Ada; CHET, Ilan; LORITO, Matteo. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 43-56, jan. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro797>.

HASSAN, Karl A.; BRZOSKA, Anthony J.; WILSON, Neil L.; EIJKELKAMP, Bart A.; BROWN, Melissa H.; PAULSEN, Ian T.. Roles of DHA2 Family Transporters in Drug Resistance and Iron Homeostasis in *Acinetobacter* spp. **Journal Of Molecular Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 20, n. 2, p. 116-124, 2011. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000325367>.

HAWKSWORTH, David L; LÜCKING, Robert. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 million species. **The Fungal Kingdom**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 79-95, 28 jul. 2017. American Society of Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0052-2016>.

HENDERSON, Linda; LILJE, Erna; ROBINSON, Katie; GLEASON, Frank H.; LILJE, Osu. Chapter 30 Effects of Toxic Metals on Chytrids, Fungal-Like Organisms, and Higher Fungi. **Mycology**, [S.L.], p. 433-458, 29 mar. 2017. CRC Press. <http://dx.doi.org/10.1201/9781315119496-31>.

HENNERDAL, Aron; ELOFSSON, Arne. Rapid membrane protein topology prediction. **Bioinformatics**, [S.L.], v. 27, n. 9, p. 1322-1323, 13 abr. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btr119>.

HIRPARA, Darshna G.; GAJERA, H.P.; HIRAPARA, Jaydeep G.; GOLAKIYA, B.A.. Inhibition coefficient and molecular diversity of multi stress tolerant *Trichoderma* as potential biocontrol agent against *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Infection, Genetics And Evolution**, [S.L.], v. 55, p. 75-92, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.08.029>.

IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans-Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the Glass Manufacturing Industry. In Summary of Data Reported and Evaluation; International Agency for Cancer Research-World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1997; Volume 58.

IGBOKWE, Ikechukwu Onyebuchi; IGWENAGU, Ephraim; IGBOKWE, Nanacha Afifi. Aluminium toxicosis: a review of toxic actions and effects. **Interdisciplinary Toxicology**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 45-70, 1 out. 2019. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.2478/intox-2019-0007>.

INGLIS, Peter W.; MELLO, Sueli C. M.; MARTINS, Irene; SILVA, João B. T.; MACÊDO, Kamilla; SIFUENTES, Daniel N.; VALADARES-INGLIS, M. Cleria. Trichoderma from Brazilian garlic and onion crop soils and description of two new species: trichoderma azevedoi and trichoderma peberdyi. **Plos One**, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 4-15, 4 mar. 2020. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0228485>.

ISMAEL, Marwa A.; ELYAMINE, Ali Mohamed; MOUSSA, Mohamed G.; CAI, Miaomiao; ZHAO, Xiaohu; HU, Chengxiao. Cadmium in plants: uptake, toxicity, and its interactions with selenium fertilizers. **Metallomics**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 255-277, 2019. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c8mt00247a>.

JACOBSON, Therese; PRIYA, Smriti; SHARMA, Sandeep K.; ANDERSSON, Stefanie; JAKOBSSON, Sofia; TANGHE, Robbe; ASHOURI, Arghavan; RAUCH, Sebastien; GOLOUBINOFF, Pierre; CHRISTEN, Philipp. Cadmium Causes Misfolding and Aggregation of Cytosolic Proteins in Yeast. **Molecular And Cellular Biology**, [S.L.], v. 37, n. 17, p. 1-15, 12 jun. 2017. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.00490-16>.

KAKARLA, Prathusha; KC, Ranjana; SHRESTHA, Ugina; RANAWEERA, Indrika; MUKHERJEE, Mun Mun; WILLMON, T. Mark; HERNANDEZ, Alberto J.; BARR, Sharla R.; VARELA, Manuel F.. Functional Roles of Highly Conserved Amino Acid Sequence Motifs A and C in Solute Transporters of the Major Facilitator Superfamily. **Drug Resistance In Bacteria, Fungi, Malaria, And Cancer**, [S.L.], p. 111-140, 2017. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-48683-3_4.

KÄLL, Lukas; KROGH, Anders; SONNHAMMER, Erik L.L. A Combined Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Method. **Journal Of Molecular Biology**, [S.L.], v. 338, n. 5, p. 1027-1036, maio 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.016>.

KANTARCIOGLU, A. Serda; CELKAN, Tiraje; YÜCEL, Ayhan; MIKAMI, Yuzuru; KURUGOGLU, Sebu; MITANI, Hiroki; ALTAS, Kemal. Fatal Trichoderma harzianum infection in a leukemic pediatric patient. **Medical Mycology**, [S.L.], v. 47, n. 2, p. 207-215, jan. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1080/13693780802406225>.

KESWANI, Chetan; MISHRA, Sandhya; SARMA, Birinchi Kumar; SINGH, Surya Pratap; SINGH, Harikesh Bahadur. Unraveling the efficient applications of secondary

metabolites of various *Trichoderma* spp. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 98, n. 2, p. 533-544, 27 nov. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-5344-5>.

KIM, Daehwan; PERTEA, Geo; TRAPNELL, Cole; PIMENTEL, Harold; KELLEY, Ryan; SALZBERG, Steven L. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. **Genome Biology**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 36-40, 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2013-14-4-r36>.

KREDICS, László; HATVANI, Lóránt; NAEIMI, Shahram; KÖRMÖCZI, Péter; MANCZINGER, László; VÁGVÖLGYI, Csaba; DRUZHININA, Irina. Biodiversity of the Genus *Hypocrea/Trichoderma* in Different Habitats. **Biotechnology And Biology Of Trichoderma**, [S.L.], p. 3-24, 2014. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-59576-8.00001-1>.

KUBICEK, Christian P; HERRERA-ESTRELLA, Alfredo; SEIDL-SEIBOTH, Verena; A MARTINEZ, Diego; DRUZHININA, Irina s; THON, Michael; ZEILINGER, Susanne; CASAS-FLORES, Sergio; A HORWITZ, Benjamin; MUKHERJEE, Prasun K. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. **Genome Biology**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 1-15, abr. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-r40>.

KUBICEK, Christian P.; STEINDORFF, Andrei S.; CHENTHAMARA, Komal; MANGANIELLO, Gelsomina; HENRISSAT, Bernard; ZHANG, Jian; CAI, Feng; KOPCHINSKIY, Alexey G.; KUBICEK, Eva M.; KUO, Alan. Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. **Bmc Genomics**, [S.L.], v. 20, n. 485, p. 1-24, 12 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-019-5680-7>.

KUMAR, Manish; ASHRAF, Shabbir. Role of *Trichoderma* spp. as a Biocontrol Agent of Fungal Plant Pathogens. **Probiotics And Plant Health**, [S.L.], p. 497-506, 2017. Springer Singapore. http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-3473-2_23.

KUMAR, Sunil; SHARMA, Anupama. Cadmium toxicity: effects on human reproduction and fertility. **Reviews On Environmental Health**, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 327-338, 18 dez. 2019. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/reveh-2019-0016>.

KÜPPER, Hendrik; PARAMESWARAN, Aravind; LEITENMAIER, Barbara; TRTÍLEK, Martin; IETLÍK, Ivan. Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **New Phytologist**, [S.L.], v. 175, n. 4, p. 655-674, set 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02139.x>.

KROGH, Anders; LARSSON, Björn; VON HEIJNE, Gunnar; SONNHAMMER, Erik L.L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes¹edited by f. cohen. **Journal Of Molecular Biology**, [S.L.], v. 305, n. 3, p. 567-580, jan. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>.

LANGMEAD, Ben; SALZBERG, Steven L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 357-359, 4 mar. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1923>.

LEFEVRE, P.G. Evidence of active transfer of certain non-electrolytes across the human red cell membrane. **Gen.Physiol.** 1948. 31:505-27.

LETUNIC, Ivica; BORK, Peer. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 256-259, 1 abr. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkz239>.

LORON, Corentin C.; FRANÇOIS, Camille; RAINBIRD, Robert H.; TURNER, Elizabeth C.; BORENSZTAJN, Stephan; JAVAUX, Emmanuelle J.. Early fungi from the Proterozoic era in Arctic Canada. **Nature**, [S.L.], v. 570, n. 7760, p. 232-235, 22 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1217-0>.

LOVE, Michael I; HUBER, Wolfgang; ANDERS, Simon. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, [S.L.], v. 15, n. 12, p. 1-10, dez. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.

LIU, Pei; LIN, Aibo; ZHANG, Guoxiu; ZHANG, Jiajia; CHEN, Yumeng; SHEN, Tao; ZHAO, Jian; WEI, Dongzhi; WANG, Wei. Enhancement of cellulase production in *Trichoderma reesei* RUT-C30 by comparative genomic screening. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 1-15, 10 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-019-1131-z>.

LIU, Mu; LIU, Jun; WANG, Wei Min. Isolation and functional analysis of Thmfs1, the first major facilitator superfamily transporter from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. **Biotechnology Letters**, [S.L.], v. 34, n. 10, p. 1857-1862, 4 jun. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-012-0972-x>.

LOPES, Fabyano Alvares Cardoso; STEINDORFF, Andrei Stecca; GERALDINE, Alaerson Maia; BRANDÃO, Renata Silva; MONTEIRO, Valdirene Neves; LOBO JÚNIOR, Murillo; COELHO, Alexandre Siqueira Guedes; ULHOA, Cirano José; SILVA, Roberto Nascimento. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology**, [S.L.], v. 116, n. 7, p. 815-824, jul. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2012.04.015>.

MARCO, Janice L de; FELIX, Carlos. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. **Bmc Biochemistry**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 3-10, 2002. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2091-3-3>.

MARTINEZ, Diego; BERKA, Randy M; HENRISSAT, Bernard; SALOHEIMO, Markku; ARVAS, Mikko; BAKER, Scott e; CHAPMAN, Jarod; CHERTKOV, Olga; COUTINHO, Pedro M; CULLEN, Dan. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading

fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 26, n. 5, p. 553-560, maio 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1403>.

MATHENY, P. Brandon; WANG, Zheng; BINDER, Manfred; CURTIS, Judd M.; LIM, Young Woon; NILSSON, R. Henrik; HUGHES, Karen W.; HOFSTETTER, Valérie; AMMIRATI, Joseph F.; SCHOCH, Conrad L.. Contributions of *rpb2* and *tef1* to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). **Molecular Phylogenetics And Evolution**, [S.L.], v. 43, n. 2, p. 430-451, maio 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2006.08.024>.

MIGUEL, Dunia de; GÓMEZ, Peña; GONZÁLEZ, Rosa; GARCÍA-SUÁREZ, Julio; CUADROS, Juan Antonio; BAÑAS, Maria Helena; ROMANYK, Juan; BURGALETA, Carmen. Nonfatal pulmonary *Trichoderma viride* infection in an adult patient with acute myeloid leukemia: report of one case and review of the literature. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, [S.L.], v. 53, n. 1, p. 33-37, set 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2005.04.009>.

MONTEIRO, Valdirene Neves; SILVA, Roberto do Nascimento; STEINDORFF, Andrei Stecca; COSTA, Fabio Teles; NORONHA, Eliane Ferreira; RICART, Carlos André Ornelas; SOUSA, Marcelo Valle de; VAINSTEIN, Marilene Henning; ULHOA, Cirano José. New Insights in *Trichoderma harzianum* Antagonism of Fungal Plant Pathogens by Secreted Protein Analysis. **Current Microbiology**, [S.L.], v. 61, n. 4, p. 298-305, 7 mar. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-010-9611-8>.

MONTOYA, Quimi Vidaurre; MEIRELLES, Lucas Andrade; CHAVERRI, Priscila; RODRIGUES, Andre. Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S.L.], v. 109, n. 5, p. 633-651, 17 fev. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-016-0666-9>.

MOTA, Thuana Marcolino; OSHIQUIRI, Letícia Harumi; LOPES, Érica Camelo Viana; BARBOSA FILHO, Jomal Rodrigues; ULHOA, Cirano José; GEORG, Raphaela Castro. Hsp genes are differentially expressed during *Trichoderma asperellum* self-recognition, mycoparasitism and thermal stress. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 227, p. 126296-126310, out. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2019.126296>.

MUKHERJEE, Prasun K.; HORWITZ, Benjamin A.; HERRERA-ESTRELLA, Alfredo; SCHMOLL, Monika; KENERLEY, Charles M.. *Trichoderma* Research in the Genome Era. **Annual Review Of Phytopathology**, [S.L.], v. 51, n. 1, p. 105-129, 4 ago. 2013. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102353>.

NELISSEN, Bart; WACHTER, Rupert; GOFFEAU, André. Classification of all putative permeases and other membrane plurispanners of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 113-134, 17 jan. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00347.x>.

NIÑO-GONZÁLEZ, María; NOVO-UZAL, Esther; RICHARDSON, Dale N.; BARROS, Pedro M.; DUQUE, Paula. More Transporters, More Substrates: the arabidopsis major facilitator superfamily revisited. **Molecular Plant**, [S.L.], v. 12, n. 9, p. 1182-1202, set 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2019.07.003>.

NORDBERG H, CANTOR M, DUSHEYKO S, HUA S, POLIAKOV A, SHABALOV I, SMIRNOVA T, GRIGORIEV IV, DUBCHAK I. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. **Nucleic Acids Res.** 2014;42(1): D26-31.

OSHIQUIRI, Letícia Harumi; GOMES, Suely Lopes; GEORG, Raphaela Castro. Blastocladiella emersonii spliceosome is regulated in response to the splicing inhibition caused by the metals cadmium, cobalt and manganese. **Fungal Biology**, [S.L.], v. 124, n. 5, p. 468-474, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2020.03.008>.

OSHIQUIRI, Letícia Harumi; SANTOS, Karina Roterdanny Araújo dos; FERREIRA JUNIOR, Sidnei Alves; STEINDORFF, Andrei Stecca; BARBOSA FILHO, Jomal Rodrigues; MOTA, Thuana Marcolino; ULHOA, Cirano José; GEORG, Raphaela Castro. Trichoderma harzianum transcriptome in response to cadmium exposure. **Fungal Genetics And Biology**, [S.L.], v. 134, p. 103281-103290, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103281>.

PACINI, A.; BRANCA, J. V.; MORUCCI, G. Cadmium-induced neurotoxicity: still much ado. **Neural Regeneration Research**, [s.l.], v. 13, n. 11, p.1879-1882, 2018. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/1673-5374.239434>.

PERSOON, C. H. (1794) 'Disposita methodical fungorum', Romers Neues Mag Bot, 1, pp. 81–128.

POHORILLE, Andrew; SCHWEIGHOFER, Karl; WILSON, Michael A.. The Origin and Early Evolution of Membrane Channels. **Astrobiology**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-17, fev. 2005. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ast.2005.5.1>.

QIAO, Min; DU, Xing; ZHANG, Zhe; XU, Jianping; YU, Zenfen. Three new species of soil-inhabiting Trichoderma from southwest China. **Myckeys**, [S.L.], v. 44, p. 63-80, 14 dez. 2018. Pensoft Publishers. <http://dx.doi.org/10.3897/myckeys.44.30295>.

QIN, W.T.; ZHUANG, W.Y. Seven wood-inhabiting new species of the genus Trichoderma (Fungi, Ascomycota) in Viride clade. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-6, 1 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep27074>.

QIN, W.T.; ZHUANG, W.Y.. Two new hyaline-ascospored species of Trichoderma and their phylogenetic positions. **Mycologia**, [S.L.], v. 108, n. 1, p. 205-214, jan. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3852/15-144>.

QUISTGAARD, Esben M.; LÖW, Christian; GUETTOU, Fatma; NORDLUND, Pär. Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.L.], v. 17, n. 2, p. 123-132, 13 jan.

2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2015.25>.

R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>

REDDY, Vamsee S.; SHLYKOV, Maksim A.; CASTILLO, Rostislav; SUN, Eric I.; SAIER, Milton H.. The major facilitator superfamily (MFS) revisited. **Febs Journal**, [S.L.], v. 279, n. 11, p. 2022-2035, 8 maio 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08588.x>.

RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA. URL <http://www.rstudio.com/>.

RIFAI, M. A (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers** 116, 1-56.

ROZEWICKI, LI, AMADA, STANDLEY, KATOH. MAFFT-DASH: integrated protein sequence and structural alignment (describes web interface for sequence and structural alignments). 2019. **Nucleic Acids Research** 47:W5-W10.

SADE, Hemalatha; MERIGA, Balaji; SURAPU, Varalakshmi; GADI, Jogeswar; SUNITA, M. S. L.; SURAVAJHALA, Prashanth; KISHOR, P. B. Kavi. Toxicity and tolerance of aluminum in plants: tailoring plants to suit to acid soils. **Biomaterials**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 187-210, 21 jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-016-9910-z>.

SAIER MH, REDDY VS, TSU BV, AHMED MS, LI C, MORENO-HAGELSIEB G (2016). The Transporter Classification Database (TCDB): recent advances. **Nucleic Acids Res.** 44, D372–9.

SANTOS, D. C.; FONSECA, S. F.; BELÉM, R. A. Características físico-químicas do solo e aspectos fitofisionômicos de uma mata ciliar e cerrado típico em Pirapora-MG. **Rev. Geo. Ueg**, Anápolis, v. 4, n. 1, p.91-113, jun. 2015.

SANTOS, K. R. A. Análise da tolerância á resistência em *Trichoderma harzianum*. 2017. 60 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

SAUTOUR, M.; CHRÉTIEN, M.L.; VALOT, S.; LAFON, I.; BASMACIYAN, L.; LEGOUGE, C.; VERRIER, T.; GONSSAUD, B.; ABOU-HANNA, H.; DALLE, F.. First case of proven invasive pulmonary infection due to *Trichoderma longibrachiatum* in a neutropenic patient with acute leukemia. **Journal de Mycologie Médicale**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 659-662, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.10.001>.

SEKHWAL, Manoj Kumar; SHARMA, Vinay; SARIN, Renu. Identification of MFS proteins in sorghum using semantic similarity. **Theory In Biosciences**, [S.L.], v. 132, n. 2, p. 105-113, 9 jan. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12064-012-0174-z>.

SÉNÉCHAL, Hélène; VISEZ, Nicolas; CHARPIN, Denis; SHAHALI, Youcef; PELTRE, Gabriel; BIOLLEY, Jean-Philippe; LHUISSIER, Franck; COUDERC, Rémy; YAMADA, Ohri; MALRAT-DOMENGE, Audrey. A Review of the Effects of Major Atmospheric Pollutants on Pollen Grains, Pollen Content, and Allergenicity. **The Scientific World Journal**, [S.L.], v. 2015, p. 1-29, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/940243>.

EL-GEHALI, J. MISTRY, A. BATEMAN, S.R. EDDY, A. LUCIANI, S.C. POTTER, M. QURESHI, L.J. RICHARDSON, G.A. SALAZAR, A. SMART, E.L.L. SONNHAMMER, L. HIRSH, L. PALADIN, D. PIOVESAN, S.C.E. TOSATTO, R.D. FINN. The Pfam protein families database in 2019. **Nucleic Acids Research** (2019). doi: 10.1093/nar/gky995

SILVA, Roberto N.; MONTEIRO, Valdirene Neves; STEINDORFF, Andrei Stecca; GOMES, Eriston Vieira; NORONHA, Eliane Ferreira; ULHOA, Cirano J.. Trichoderma/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. **Fungal Biology**, [S.L.], v. 123, n. 8, p. 565-583, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2019.06.010>.

SOLISDOMINGUEZ, F; GONZALEZCHAVEZ, M; CARRILLOGONZALEZ, R; RODRIGUEZVAZQUEZ, R. Accumulation and localization of cadmium in Echinochloa polystachya grown within a hydroponic system. **Journal Of Hazardous Materials**, [S.L.], v. 141, n. 3, p. 630-636, 22 mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.07.014>.

SOOD, Monika; KAPOOR, Dhriti; KUMAR, Vipul; SHETIWIY, Mohamed S.; RAMAKRISHNAN, Muthusamy; LANDI, Marco; ARANITI, Fabrizio; SHARMA, Anket Trichoderma: the secrets of a multitaled biocontrol agent. **Plants**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 762-770, 18 jun. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants9060762>.

STEINDORFF, Andrei Stecca; RAMADA, Marcelo Henrique Soller; COELHO, Alexandre Siqueira Guedes; MILLER, Robert Neil Gerard; PAPPAS, Georgios Joannis; ULHOA, Cirano José; NORONHA, Eliane Ferreira. Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen Sclerotinia sclerotiorum through transcriptome and expression profile analysis in Trichoderma harzianum. **Bmc Genomics**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 1-15, 18 mar. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-204>.

STRULLU-DERRIEN, Christine; SELOSSE, Marc-André; KENRICK, Paul; MARTIN, Francis M.. The origin and evolution of mycorrhizal symbioses: from palaeomycology to phylogenomics. **New Phytologist**, [S.L.], v. 220, n. 4, p. 1012-1030, 24 mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.15076>.

SUÁREZ, M. Belén; VIZCAÍNO, J. Antonio; LLOBELL, Antonio; MONTE, Enrique. Characterization of genes encoding novel peptidases in the biocontrol fungus Trichoderma harzianum CECT 2413 using the TrichoEST functional genomics approach. **Current Genetics**, [S.L.], v. 51, n. 5, p. 331-342, 6 abr. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00294-007-0130-5>.

TEIXEIRA, Miguel C.; CABRITO, Tânia R.; HANIF, Zaitunnissa M.; VARGAS, Rita C.; TENREIRO, Sandra; SÁ-CORREIA, Isabel. Yeast response and tolerance to polyamine toxicity involving the drug: Δ h⁺ antiporter qdr3 and the transcription factors yap1 and gcn4. **Microbiology**, [S.L.], v. 157, n. 4, p. 945-956, 1 abr. 2011. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.043661-0>.

TRABELSI, Sonia; HARIGA, Dorsaf; KHALED, Samira. First case of *Trichoderma longibrachiatum* infection in a renal transplant recipient in Tunisia and review of the literature. **La Tunisie Medicale**, [s. l.], v. 88, n. 01, p. 51-56, jan. 2010.

TRIFINOPOULOS, Jana; NGUYEN, Lam-Tung; VON-HAESELER, Arndt; MINH, Bui Quang. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 232-235, 15 abr. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw256>.

VAN SLYCKEN, S.; WITTERS, N.; MEERS, E.; PEENE, A.; MICHELS, E.; ADRIAENSEN, K.; RUTTENS, A.; VANGRONSVELD, J.; DULAING, G.; WIERINCK, I.. Safe use of metal-contaminated agricultural land by cultivation of energy maize (*Zea mays*). **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 178, p. 375-380, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.03.032>.

VERMA, Mausam; BRAR, Satinder K.; TYAGI, R.D.; SURAMPALLI, R.y.; VALÉRO, J.R.. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 1-20, out. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012>.

VINALE, Francesco; SIVASITHAMPARAM, Krishnapillai; GHISALBERTI, Emilio L.; MARRA, Roberta; WOO, Sheridan L.; LORITO, Matteo. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. **Soil Biology And Biochemistry**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 1-10, jan. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>.

VISHWAKARMA, Poonam; BANERJEE, Atanu; PASRIJA, Ritu; PRASAD, Rajendra; LYNN, Andrew M.. Phylogenetic and conservation analyses of MFS transporters. **3 Biotech**, [S.L.], v. 8, n. 11, p. 1-15, 27 out. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-018-1476-8>.

WATERHOUSE, A. M.; PROCTER, J. B.; MARTIN, D. M. A.; CLAMP, M.; BARTON, G. J.. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, [S.L.], v. 25, n. 9, p. 1189-1191, 16 jan. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>.

WUANA, Raymond A.; OKIEIMEN, Felix E.. Heavy Metals in Contaminated Soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. **Isrn Ecology**, [S.L.], v. 2011, p. 1-20, 24 out. 2011. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.5402/2011/402647>.

WEINDLING, R.: Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignolum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. **Phytopath**: 24 (1934) 1153 - 1179.

WEN-XIA, Han; ZHONG-WEN, Han; MIN, Jia; HAN, Zhang; WEI-ZE, Li; LI-BIN, Yang; FEI, Liang; LU, Han; NING, Zhao; XIAO-FENG, Li. Five novel and highly efficient endophytic fungi isolated from *Huperzia serrata* expressing huperzine A for the treatment of Alzheimer's disease. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 104, n. 21, p. 9159-9177, 24 set 2020. Springer Science and Business Media LLC. [.htHITTAKER, R. H.. New Concepts020-10894-4](https://doi.org/10.1007/s00201-020-01089-4).

WHITTAKER, R. H.. New Concepts of Kingdom of Organisms. **Science**, [s. l], v. 163, n. 3863, p. 150-160, 10 jan. 1996.

YAMAGUCHI, K.; TSURUMI, Y.; SUZUKI, R.; CHUASEEHARONNACHAI, C.; SRI-INDRASUTDHI, V.; BOONYUEN, N.; OKANE, I.; SUZUKI, K.-I.; NAKAGIRI, A.. *Trichoderma matsushimae* and *T. aeroaquaticum*: two aero-aquatic species with pseudaeegerita-like propagules. **Mycologia**, [S.L.], v. 104, n. 5, p. 1109-1120, 11 abr. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3852/11-253>.

YAN, Nieng. Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. **Annual Review Of Biophysics**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 257-283, 22 jun. 2015. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biophys-060414-033901>.

YING, Rong-Rong; QIU, Rong-Liang; TANG, Ye-Tao; HU, Peng-Jie; QIU, Hao; CHEN, Hong-Ru; SHI, Tai-Hong; MOREL, Jean-Louis. Cadmium tolerance of carbon assimilation enzymes and chloroplast in Zn/Cd hyperaccumulator *Picris divaricata*. **Journal Of Plant Physiology**, [S.L.], v. 167, n. 2, p. 81-87, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2009.07.005>.

ZHANG, Xuejun C.; ZHAO, Yan; HENG, Jie; JIANG, Daohua. Energy coupling mechanisms of MFS transporters. *Protein Science*, [S.L.], v. 24, n. 10, p. 1560-1579, 18 set 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.2759>.

ZHU, Z.X.; ZHUANG, W.y.. *Trichoderma* (Hypocrea) species with green ascospores from China. **Persoonia - Molecular Phylogeny And Evolution Of Fungi**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 113-129, 29 jun. 2015. Naturalis Biodiversity Center. <http://dx.doi.org/10.3767/003158515x686732>.

ANEXO I – Famílias e subfamílias MFS identificadas em *Trichoderma* spp.

Família	Subfamílias	Função	Reino
2.A.1.1 The Sugar Porter (SP) Family	2.A.1.1.10	Maltotriose/maltose:H ⁺ symporter, Mal6T or Mal61	Fungi
	2.A.1.1.11	General α -glucoside:H ⁺ symporter, Gtr3, Mal11, Mal1T, Mtp1 or Agt1	Fungi
	2.A.1.1.20	Myoinositol:H ⁺ symporter, MIT	Kinetoplastida
	2.A.1.1.21	Hexose:H ⁺ symporter, Ght2 (Glucose > Fructose)	Fungi
	2.A.1.1.22	Hexose:H ⁺ symporter, Ght6 (Fructose > Glucose)	Fungi
	2.A.1.1.23	Gluconate:H ⁺ symporter, Ght3	Fungi
	2.A.1.1.36	The low affinity, glucose-inducible glucose transporter, MstE	Fungi
	2.A.1.1.38	The glycerol:H ⁺ symporter, Stl1p	Fungi
	2.A.1.1.39	The high affinity glucose transporter, Hgt1	Fungi
	2.A.1.1.40	The xylose facilitator, Xylhp	Fungi
	2.A.1.1.51	Glucose/xylose: H ⁺ symporter, Gsx1	Fungi
	2.A.1.1.57	High affinity glucose (monosaccharides including xylose):H ⁺ symporter, MstA	Fungi
	2.A.1.1.58	Low affinity glucose:H ⁺ symporter, MstC	Fungi
	2.A.1.1.64	The hexose sensor, Hxs1 (believed to be non-transporting)	Fungi
	2.A.1.1.68	The Glucose Transporter/Sensor Rgt2	Fungi
	2.A.1.1.69	Sugar & polyol transporter 1 (SPT1): broad specificity; takes up glucose	Bangiophyceae
	2.A.1.1.104	Myo-inositol transporter 2	Fungi
	2.A.1.1.111	High-affinity glucose transporter HXT2	Fungi
	2.A.1.1.112	High-affinity glucose transporter Ght1	Fungi
	2.A.1.1.117	Glucose transporter Rco-3 or MoST1	Fungi
	2.A.1.1.119	The galacturonic acid (galacturonate) uptake porter, GatA	Fungi
	2.A.1.1.125	Glycerol:H ⁺ symporter, GT1	Fungi
	2.A.1.1.126	Myo inositol uptake porter, Fst1; also takes up the polyketide mycotoxin Fumonisin B1 (FB1)	Fungi

	2.A.1.1.127	Hexose:proton symporter, Hxt5. Takes up D-glucose, D-fructose, D-xylose, D-mannose, D-galactose	Fungi
	2.A.1.1.131	Myo-inositol-specific uptake transporter, ITR1	Fungi
	2.A.1.1.137	Glycerol:H ⁺ symporter, WaStl1; is a concentrative glycerol-H ⁺ symporter	Fungi
	2.A.1.1.138	Maltose permease, HPMAL2	Fungi
	2.A.1.1.140	Cellodextrin transporter, CtA or CDT-1; It transports cellobiose, cellotriose, cellotetraose and cellopeptase	Fungi
	2.A.1.2.2	Cycloheximide:H ⁺ antiporter	Fungi
	2.A.1.2.6	(Benomyl, cycloheximide, methotrexate, fluconazole, etc.):H ⁺ antiporter, CaMDR1	Fungi
	2.A.1.2.16	Polyamines (spermine, spermidine, putrescine); paraquat; methylglyoxal bis(guanylhyazone):H ⁺ antiporter (in the plasma membrane)	Fungi
	2.A.1.2.17	Fluconazole:H ⁺ antiporter	Fungi
	2.A.1.2.23	The fructose-specific facilitator (uniporter), Ffz1	Fungi
2.A.1.2 The Drug:H⁺ Antiporter-1 (DHA1) Family	2.A.1.2.28	The vesicular acetylcholine transporter, VACHT (pumps acetylcholine into synaptic vesicles).	Metazoa
	2.A.1.2.29	The vesicular monoamine transporter, VMAT2 (pumps dopamine, norepinephrine, serotonin and histamine into synaptic vesicles)	Metazoa
	2.A.1.2.31	The multidrug transporter, QDR2	Fungi
	2.A.1.2.33	The Hol1 MFS transporter	Fungi
	2.A.1.2.34	The MDR efflux pump, PmrA (exports fluoroquinolone and other compounds) and other components including the antimicrobial peptide, colisti	Bacteria
	2.A.1.2.35	The caffeine resistance protein 5 (Caf5)	Fungi
	2.A.1.2.36	The multidrug resistance protein Aqr1 (YNL065w) (exports short chain monocarboxylates but not more hydrophobic acids such as	Fungi

	octonate and quinidine. Also exports ketoconazole and crystal violet	
2.A.1.2.38	Tetracycline-specific exporter, TetA39	Bacteria
2.A.1.2.39	Tetracycline-specific exporter, TetA41	Bacteria
2.A.1.2.40	The dityrosine exporter, Dtr1	Fungi
2.A.1.2.43	The multidrug efflux pump, Qdr3 (exports polyamines, quinidine, barban, cisplatin and bleomycin)	Fungi
2.A.1.2.45	The fructose-specific uniporter, Ffz1	Fungi
2.A.1.2.48	tetracycline exporter, tetR	Fungi
2.A.1.2.49	Putative tetracycline resistance protein	Archaea
2.A.1.2.58	Protein Zinc Induced Facilitator 1, ZIF1	Viridiplantae
2.A.1.2.63	Probable drug/proton antiporter YHK8	Fungi
2.A.1.2.64	Polyamine exporter 4	Fungi
2.A.1.2.68	Tetracycline resistance protein, class B (TetA(B)) (Metal-tetracycline/H ⁺ antiporter).	Bacteria
2.A.1.2.73	Major facilitator superfamily domain-containing protein 10, MFSD10 (Tetracycline transporter-like protein).	Metazoa
2.A.1.2.77	CefT, hydrophilic beta-lactam transporter	Fungi
2.A.1.2.78	The PaaT (PenT) exporter; it is involved in penicillin production	Fungi
2.A.1.2.79	The host-nonselective polyketide perylenequinone toxin, cercosporin, exporter, Ctb4	Fungi
2.A.1.2.85	Peroxisomal phenylacetate/phenoxyacetate transporter, PaaT (CefT)	Fungi
2.A.1.2.86	Peroxisomal isopenicillin N importer, PenM	Fungi
2.A.1.2.91	Putative MFS carrier	Fungi
2.A.1.2.96	ZIF2 (Zinc-Induced Facilitator 2), mediate Zn efflux from the cytoplasm	Viridiplantae
2.A.1.2.111	Zinc-induced facilitator-like protein 1, ZIFL1 or Tpo1p	Viridiplantae

2.A.1.3 The Drug:H+ Antiporter-2 (DHA2) Family	2.A.1.2.112	Uncharacterized protein, may possibly play a role in lipid transport	Fungi
	2.A.1.2.113	Uncharacterized MFS transporter	Fungi
	2.A.1.2.114	MFS1	Fungi
	2.A.1.2.115	Multidrug resistance MDR exporter	Fungi
	2.A.1.3.1	Boron exporter, Atr1; (Aminotriazole, 4-nitroquinoline-N-oxide, etc.):H+ antiporter; Also exports L-cysteine	Fungi
	2.A.1.3.16	The Me ²⁺ -tetracycline:2H ⁺ antiporter	Bacteria
	2.A.1.3.33	Multidrug (including novobiocin, streptomycin, and actinomycin D) resistance porter, MdtP (YusP)	Bacteria
	2.A.1.3.47	The trichothecene efflux pump, TRI12	Fungi
	2.A.1.3.50	Multidrug resistance protein 3 (Multidrug-efflux transporter 3) or Brm3. Resistance to puromycin, tosofloxacin, norfloxacin, acriflavin, ethidium, and tetraphenyl phosphonium	Bacteria
	2.A.1.3.52	Drug resistance protein YOR378W	Fungi
	2.A.1.3.65	ThMFS1, catalyzes export of fungicides; It also exports trichodermin	Fungi
	2.A.1.3.68	The PfMFS transporter, it is involved in the acid resistance and intracellular pH homeostasis	Fungi
	2.A.1.3.69	Drug resistance pump, YMR279c	Fungi
	2.A.1.3.71	Putative multidrug-resistance exporter, KNQ1.	Fungi
	2.A.1.3.73	Multidrug resistance Mfs1 protein; Exports natural mycotoxins and a variety of fungicides	Fungi
2.A.1.7 The Fucose: H+ Symporter (FHS) Family	2.A.1.3.79	Multidrug resistance MFS exporter, MFS54	Fungi
	2.A.1.3.80	Uncharacterized EmrB/QacA-like durg resistance transporter	Bacteria
	2.A.1.3.83	AflT efflux pump; Its gene is part of the gene cluster that mediates the biosynthesis of aflatoxins	Fungi
	2.A.1.7.13	Bypass of stop codon protein 6	Fungi
	2.A.1.7.25	Uncharacterized protein	Fungi

2.A.1.8 The Nitrate/Nitrite Porter (NNP) Family	2.A.1.8.13	High affinity nitrate/nitrite antiporter and uptake porter, NrtB	Fungi
2.A.1.9 The Phosphate: H+ Symporter (PHS) Family	2.A.1.9.2	Phosphate-repressible, high affinity Pi uptake porter	Fungi
	2.A.1.9.4	Pth1(PT2)/ a low affinity Pi uptake transporter	Viridiplantae
	2.A.1.9.7	Organic phosphate (glycerophosphoinositol and glycerophosphocholine) transport protein, GIT1	Fungi
2.A.1.11 The Oxalate:Formate Antiporter (OFA) Family	2.A.1.11.4	Uncharacterized membrane protein YJL163C	Fungi
2.A.1.12 The Sialate:H+ Symporter (SHS) Family	2.A.1.12.2	The lactate/pyruvate:H+ symporter.	Fungi
2.A.1.13 The Monocarboxylate Transporter (MCT) Family	2.A.1.13.2	The low affinity aromatic amino acid (Tyr, Trp, Phe) transporter, TAT1; Also transports N-methyl amino acids and thyroid hormones	Metazoa
	2.A.1.13.4	The high affinity facilitated diffusion, riboflavin-regulated riboflavin uptake system, Mch5	Fungi
	2.A.1.13.14	Facilitative monocarboxylate transporter, mediates creatine transport across the plasma membrane	Metazoa
	2.A.1.13.17	Monocarboxylate transporter 13 (MCT 13)	Metazoa
	2.A.1.13.18	Probable transporter MCH2	Fungi
	2.A.1.13.19	Probable transporter MCH4	Fungi
	2.A.1.13.23	Transports pro-thyroid hormone, T4, with high affinity, and T3	Metazoa
	2.A.1.13.25	Thyroid hormones (TH) transporter, MCT8	Metazoa
	2.A.1.13.26	Thyroid hormones (TH) transporter, MCT10	Metazoa
	2.A.1.13.27	MfsG, exports fungicides such as glucosinolates and isothiocyanates.	Fungi
2.A.1.14	2.A.1.14.3	Putative tartrate porter	Bacteria

The Anion:Cation Symporter (ACS) Family	2.A.1.14.4	Dipeptide (e.g., Gly-Leu), allantoate, ureidosuccinate, allantoin porter	Fungi
	2.A.1.14.11	Plasma membrane, high affinity nicotinate permease, Tna1	Fungi
	2.A.1.14.17	Pantothenate:H ⁺ symporter, Liz1	Fungi
	2.A.1.14.19	Plasma membrane, high affinity vitamin H transporter 1 (H ⁺ :biotin symporter), Vht1	Fungi
	2.A.1.14.20	Endoplasmic reticular cysteine transporter, Yct1	Fungi
	2.A.1.14.35	Inner membrane transport protein RhmT	Bacteria
	2.A.1.14.36	Thiamine pathway transporter THI73	Fungi
	2.A.1.14.37	Probable transporter SEO1	Fungi
	2.A.1.14.38	Transporter YIL166c, may transport inorganic sulfur-containing compounds such as sulfate, sulfite, thiosulfate and sulfonates.	Fungi
2.A.1.16 The Siderophore-Iron Transporter (SIT) Family	2.A.1.16.1	Siderophore-iron (ferrioxamine):H ⁺ symporter, Sit1	Fungi
	2.A.1.16.6	Siderophore iron transporter 1, Str1	Fungi
	2.A.1.16.7	Ferri-siderophore transporter, MirB.	Fungi
	2.A.1.16.8	Fusarium iron-related protein, Fir1	Fungi
2.A.1.19 The Organic Cation Transporter (OCT) Family	2.A.1.19.38	Uncharacterized MFS-type transporter PB1E7	Fungi
	2.A.1.19.48	Fungal MFS homologue	Fungi
2.A.1.28 The Feline Leukemia Virus Subgroup C Receptor (FLVCR)/Heme Importer Family(HIF)	2.A.1.28.2	MFS – Domain 7, MFS-D7	Metazoa
2.A.1.32 The Putative Aromatic Compound/Drug Exporter (ACDE) Family	2.A.1.32.3	Putative copper/multidrug efflux protein, YfmO	Bacteria

2.A.1.36 The Acriflavin-sensitivity (YnfM) Family	2.A.1.36.3	Putative uncharacterized transporter YgaY	Proteobacteria
2.A.1.40 Major Facilitator Superfamily Domain-containing Protein Family (MFSD)	2.A.1.40.2	MFS – Domain 5, MFS-D5 (probably a molybdate/anion uptake porter)	Metazoa
2.A.1.48 The Vacuolar Basic Amino Acid Transporter (V-BAAT) Family	2.A.1.48.1	The vacuolar basic amino acid (histidine, lysine and arginine) transporter, Vba1	Fungi
	2.A.1.48.2	The vacuolar basic amino acid (Arg, Lys, His) transporter, Vba2	Fungi
	2.A.1.48.3	Vacuolar G0 arrest protein, Fnx1 (involved in amino acid uptake into the vacuole)	Fungi
	2.A.1.48.4	Vacuolar amino acid uptake system, Fnx2	Fungi
2.A.1.49 The Endosomal Spinster (Spinster) Family	2.A.1.49.9	The cis, cis muconate transporter	Metazoa
2.A.1.53 The Proteobacterial Intraphagosomal Amino Acid Transporter (Pht) Family	2.A.1.53.5	Putative amino acid transporter	Metazoa
2.A.1.58 The N-Acetylglucosamine Transporter (NAG-T) Family	2.A.1.58.1	The N-acetylglucosamine:H ⁺ symporter, Ngt1	Fungi
	2.A.1.58.5	Duf895	Fungi
2.A.1.63 The Unidentified Major Facilitator-12 (UMF12) Family	2.A.1.63.4	MFS carrier	Fungi
2.A.1.75 The Unidentified Major Facilitator-23 (UMF23) Family	2.A.1.75.2	MFS putative monocarboxylic acid transporter, UMF23B	Fungi
	2.A.1.75.3	Uncharacterized major facilitator, UMF23C	Fungi
2.A.2 The Glycoside-Pentoside-	2.A.2.6.1	Maltose/sucrose H ⁺ : symporter, Sut1	Fungi

Hexuronide (GPH):Cation Symporter Family			
2.A.17 The Proton- dependent Oligopeptide Transporter (POT/PTR) Family	2.A.17.2.1	Peptide:H ⁺ symporter	Fungi
	2.A.17.2.2	Peptide:H ⁺ symporter (dipeptides and tripeptides preferred)	Fungi
	2.A.17.2.4	Di- and tripeptide uptake transporter, Ptr2	Fungi
	2.A.17.2.5	Oligopeptide transporter (transports a variety of peptides and derivatives of antifungal agents, such as chlorotetaine and lysyl-cholortetaine)	Fungi

Legenda: As colunas indicam os códigos de identificação das famílias e das subfamílias identificadas nas espécies de *Trichoderma* estudadas, de acordo com o TCDB. Além disso, são mostrados os solutos transportados por essas proteínas e em quais organismos tais transportadores foram primeiramente descritos.

ANEXO II – Genes MFS de *T. harzianum* diferencialmente expressos durante crescimento em contato com 0.08, 1.5 e 3.0 mg/mL de AlCl₃, 1.0 e 2.0 mg/mL de CdCl₂, e 24 e 36 horas em contato com parede celular de *S. sclerotiorum*. As sequências dos genes podem ser obtidas através da pesquisa de seus códigos de identificação (ID) no banco de dados Mycocosm do JGI.

ProteinID	Al 0.08		Al 1.5		Al 3.0		Cd 1.0		Cd 2.0		Mic 24h	Mic 36h
	log2FC	padj	log2FC	padj	log2FC	padj	log2FC	padj	log2FC	padj	log2FC	log2FC
2242	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-2,07233	-
2613	2,966667	0,039285	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2622	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-3,23089	2,93634
23894	1,576511	0,074867	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37358	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,33374	1,73597
63238	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,49089	5,68602
63486	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,39743	1,28116
65635	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,03206
65699	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,77029
76064	1,582491	0,039928	-	-	-	-	-	-	-	-	4,20231	2,18232
110623	3,019461	9,74E-08	-	-	-	-	-	-	-	-	5,02733	2,50653
126278	-2,65433	1,07E-17	-1,5099	9,40E-07	-	-	-	-	-	-	-	-1,89457
145669	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,16194	3,43869
176218	-	-	12,37515	1,27E-18	10,82282	2,08E-14	-	-	-	-	-7,0279	-
192111	1,725731	0,000473	-	-	-	-	-2,48117	0,000249	-1,9908	0,001584	3,26436	3,76191
211413	-	-	-	-	-	-	4,859459	0,012215	3,774905	0,072614	-4,59299	-3,23403
221130	3,253102	7,00E-05	-	-	-	-	-	-	-	-	2,749	2,72243
221419	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,09468	-1,72755
224036	-	-	-4,20577	0,093321	-4,11702	0,099718	-	-	-	-	2,54542	-
225818	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-3,44313	-1,45046
226600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,6346	-
230680	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,33352	1,17715
239264	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,34874
270132	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,04251	-
314841	1,137193	0,001474	-2,8225	3,37E-06	-2,655	1,06E-05	-2,66384	0,045401	-	-	2,41941	-
323920	-4,48765	9,96E-37	-2,05165	1,27E-12	-1,45194	6,09E-07	-	-	-	-	-	-
344482	-	-	-	-	1,522823	0,072477	-	-	-	-	-	-
367293	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,37734	2,15175
375912	1,844921	7,47E-07	-1,90028	3,44E-08	-1,20431	0,000551	-	-	-	-	6,04486	4,39725
459742	1,011042	0,004989	-3,88375	3,76E-08	-3,84475	6,88E-08	-	-	-	-	4,42239	-

483557	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,72034	3,00632
527313	-4,14651	2,72E-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,07348	-
537355	5,984879	2,14E-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,61777	1,67805
537900	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,3282	1,44661
549973	-2,52691	6,36E-09	-	-	-	-	-2,72361	4,47E-06	-3,00685	1,05E-07	-	-	-
554315	-2,11278	0,002127	-1,53118	0,034652	-1,52305	0,03652	-	-	-	-	-	-	-
598073	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,72208
601158	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,58173	-1,82618
621504	-	-	-	-	-	-	-	-	-2,68367	0,087848	-	2,53075	4,35762
631900	2,392747	0,081151	-	-	-	-	3,26729	3,15E-05	2,195487	0,010414	-	-	-1,46974
639132	-	-	-1,78172	0,005263	-1,16051	0,069931	1,648544	0,007798	-	-	-	-	-
689069	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,47687
689309	-	-	-	-	-	-	10,79781	1,82E-16	9,778971	1,93E-13	-	-1,66711	-1,04542
689853	-1,78697	0,006668	-1,19848	0,000349	-1,46754	1,31E-05	-	-	-	-	-	2,146	-1,33181
690104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,30043	4,76662
690577	3,675184	1,08E-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,47321	-
690640	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,20114	-
691477	4,457185	4,19E-09	-	-	-	-	-2,52369	0,013453	-1,59678	0,072962	-	5,24542	2,95778
692273	-4,87341	1,82E-67	-	-	-	-	-3,20758	5,19E-20	-3,22506	2,63E-20	-	-	-
692661	1,053086	0,039539	1,237202	0,009099	1,693123	0,000155	-	-	-	-	-	2,20922	2,40689
693901	-	-	-1,77339	1,14E-12	-1,32615	1,14E-07	-	-	-	-	-	1,83468	3,36822
694002	-	-	-	-	-	-	2,866121	0,001513	-	-	-	-	-
694315	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,28832
694415	-4,03265	4,68E-28	-	-	1,076413	8,31E-05	-3,5865	3,74E-06	-2,78854	1,08E-05	-	-1,73784	-1,9571
695695	-	-	-	-	-	-	-4,5613	0,046279	-	-	-	4,87575	3,5515
696296	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,30765
696543	-	-	3,608365	0,001418	4,514137	2,91E-05	-	-	-	-	-	1,84963	-
697648	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,18216	1,63499
698010	3,967205	0,030057	-	-	-	-	11,53987	9,28E-20	9,546436	1,63E-13	-	-	-
698375	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,23736	2,37407
698434	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,17305	-
699362	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,57497	3,41774
700358	1,250499	0,000394	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,0577	-2,05727
701994	-	-	-	-	-	-	5,868812	1,05E-06	6,337769	1,06E-07	-	-	-
702288	1,169725	0,040378	-	-	-	-	-2,89949	7,43E-08	-2,24189	2,88E-06	-	4,33204	6,73722
703881	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-3,11745	-
703918	-	-	-	-	-	-	8,406772	2,15E-22	7,811699	3,13E-19	-	-	-

705321	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,94974	4,13723
705568	-	-	-	-	-	-	-2,49441	3,05E-09	-1,64399	5,38E-05	-	4,02644	2,62457
705712	-1,16376	0,000443	-1,58403	1,36E-06	-1,28165	0,00011	1,708684	5,25E-08	1,097047	0,001071	-	-	-
705930	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,36285	-
706960	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,20585	3,25841
707424	-	-	-	-	-	-	3,812407	2,08E-11	3,475638	1,46E-09	-	-	1,16506
709277	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,66827	3,6021
709606	-	-	2,45562	1,52E-12	2,731031	2,50E-15	1,70771	2,20E-05	1,200251	0,005218	-	-	-
709616	1,064834	0,031474	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
712360	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,44307	2,65947
713513	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,83225	-
716092	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-4,10747	-
717187	-	-	-	-	-	-	3,22987	0,054643	3,638553	0,026308	-	-	-1,8287
717669	-	-	-	-	-	-	-3,66288	0,060805	-	-	-	7,67765	4,40088
717769	-2,99201	6,93E-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
718279	2,593017	0,083982	-	-	-	-	-2,23929	0,096643	-	-	-	1,99137	1,91089
718622	1,123724	0,039191	-	-	-	-	-1,5623	0,033286	-	-	-	-	-
718700	-	-	-	-	-	-	-2,66794	0,017596	-	-	-	4,37865	6,49744
718937	-	-	-1,42382	8,41E-06	-1,01828	0,001624	-	-	-	-	-	-	2,39189
719396	-	-	-1,56172	0,000134	-1,24619	0,002321	-	-	-	-	-	-	-
724216	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,68442	4,20025
725260	2,683286	4,52E-06	-1,94254	0,048648	-1,71569	0,079522	-2,45772	0,00174	-1,78033	0,016579	-	5,89458	1,87697
727737	2,515462	3,81E-59	-1,99846	2,19E-26	-2,25615	1,45E-32	-2,33889	5,17E-08	-1,50124	0,001074	-	4,88419	4,79508
730455	-2,74448	5,55E-26	-1,00724	0,003061	-	-	-	-	-	-	-	4,70623	2,9147
737536	-	-	-	-	-	-	-2,19942	1,74E-06	-1,40465	0,001369	-	2,39953	2,75013
741492	1,129189	0,000301	-1,01018	0,000772	-1,05932	0,000383	-1,21809	0,007045	-	-	-	4,42488	1,71855
743265	1,869	0,007034	-	-	-	-	-	-	-2,73905	0,09954	-	-2,18083	-2,20354
744395	2,21151	8,58E-12	-	-	-	-	-	-	-1,08249	0,007098	-	-	-
744769	-	-	-	-	-	-	2,375498	8,84E-07	-	-	-	1,75709	-
744792	-	-	9,093259	1,98E-30	8,93104	2,32E-29	-	-	-	-	-	-6,63225	-2,85042
746092	1,19885	0,054412	1,457655	0,082513	1,627466	0,046519	-	-	-	-	-	-	-
746260	-	-	-	-	-	-	-1,02329	0,084367	-	-	-	6,00026	4,14252
747296	1,776356	0,00613	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,17136	-
747587	-2,16955	1,10E-05	-2,7079	5,57E-11	-2,69648	1,04E-10	-2,87171	4,37E-07	-2,52546	6,23E-07	-	5,88144	3,05296
747661	-3,27478	1,03E-11	-2,52632	1,52E-07	-2,6146	1,03E-07	-1,40176	0,036755	-1,20529	0,075947	-	4,42213	1,4103
747693	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,04436	-
748044	-	-	4,15753	4,02E-27	4,229041	4,91E-28	-2,17738	0,056688	-	-	-	-3,56487	-4,27852

748052	2,908618	0,001179	-	-	-	-	-	-	-	-	4,29123	2,71257
749038	1,224251	3,96E-05	2,766807	3,83E-24	2,943611	2,86E-27	-	-	-1,12094	0,00689	-1,70543	-1,12872
749051	1,515026	4,84E-06	-	-	-	-	-1,21909	0,009595	-1,37732	0,002512	4,86881	5,20444
749177	2,467563	3,42E-21	1,934787	6,89E-13	1,90617	1,72E-12	-	-	-	-	-	-1,07275
749698	6,573366	0,003586	-	-	-	-	-3,71624	0,010201	-2,37533	0,025322	1,1244	2,30404
751078	1,893597	1,78E-09	-	-	-	-	-1,24027	0,001878	-1,1006	0,005185	-	-
751152	-	-	-	-	-	-	-1,91308	0,009805	-	-	4,5674	2,37327
752093	-	-	-	-	-	-	-2,3433	2,86E-12	-1,23543	0,000494	-	-1,16174
752480	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,78087	1,25297
753757	-	-	-	-	-	-	-2,50068	0,001869	-1,48455	0,043279	-	-
754730	-	-	1,417058	1,85E-09	1,474399	3,63E-10	-1,36686	0,000319	-1,03515	0,00957	-	-1,30952
755139	-1,17696	0,08837	-	-	-	-	-2,53052	0,083501	-2,39536	0,077301	-2,9994	5,35809
755978	-	-	-	-	-	-	-2,1787	0,003186	-1,85025	0,011604	-	-1,72341
756304	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,62919	2,76616
756568	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,04853	-
757217	2,101202	1,21E-17	-	-	-	-	1,083554	0,063302	-	-	1,41229	-1,29127
759217	-	-	-	-	-	-	-1,43612	0,00226	-	-	-1,75242	1,50851
759226	-	-	-2,48793	2,36E-12	-3,63513	3,69E-22	-1,70364	0,000111	-1,49912	0,000457	3,2904	2,33882
759984	-	-	-2,13249	1,30E-09	-2,09729	2,82E-09	-1,7929	3,08E-05	-1,16439	0,010739	2,96819	-1,10443
760653	2,884385	3,75E-06	-	-	-	-	-2,9779	0,001509	-3,4272	0,000153	1,09559	1,99399
761502	1,883646	2,51E-06	-	-	-	-	2,176499	1,51E-08	1,052867	0,014842	-	-
762235	1,246787	9,77E-06	-	-	-	-	-1,34026	0,064439	-1,57173	0,024409	-1,26012	1,01551
763971	1,319145	0,000473	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
764219	-	-	-2,39653	1,64E-17	-2,29834	3,48E-16	-	-	-	-	1,79207	-
764294	-	-	-	-	-	-	-4,29181	0,065122	-	-	-	-1,16813
778509	-	-	-	-	-	-	-1,05949	0,001288	-	-	-	-2,14352
778519	-1,2748	0,00999	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,0084	-
778705	-	-	-	-	-	-	-1,36803	0,000138	-1,05776	0,004202	-1,95425	-1,1982
779138	-	-	-	-	-2,13948	0,025111	-	-	-	-	1,58406	1,86297
779304	2,622415	0,000392	-	-	-	-	-	-	-	-	2,08228	3,29266
779430	-1,10757	0,007526	-2,01457	3,98E-05	-2,46364	1,94E-06	-1,40522	0,06466	-1,44972	0,049997	-1,429	-1,61176
779518	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,52845
779918	-	-	-	-	-	-	3,880734	1,00E-26	3,537501	4,05E-22	-3,15677	-4,82427
780122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-11,7351	-6,84249
780198	2,266038	6,27E-11	-	-	1,222236	0,000332	2,10947	2,44E-09	1,577137	1,77E-05	-1,17662	-
780232	2,176411	7,90E-13	-	-	-1,3162	0,000342	-2,80532	6,60E-11	-2,43352	6,04E-10	2,11978	-
780430	-2,02767	1,54E-10	4,475798	8,07E-88	4,024619	5,52E-71	-2,86711	0,043727	-	-	-6,49868	-4,7373

810276	-1,48548	0,000127	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,00084
811638	2,484816	0,000141	-	-	-	-	1,577902	0,080052	-	-	-	-2,4308	-
811778	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-2,87871	-1,76456
812058	1,31043	9,63E-05	-1,00155	0,011198	-1,14836	0,003004	-	-	-	-	-	-	-
812150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,49304	2,06765
813069	-6,22728	6,80E-79	-	-	-	-	-1,78081	0,000345	-1,3171	0,012999	-	-4,96211	-
813081	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,08935	-2,4485
813736	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,29094	-
813937	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,66278	4,63696
814402	-	-	-2,0811	0,057059	-	-	-	-	-	-	-	2,21113	2,71612
814780	-1,45932	8,30E-22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
814858	-	-	-	-	-	-	-2,1724	0,013024	-3,49915	9,45E-05	-	7,29421	5,9738
815606	1,389692	1,64E-07	-2,04619	6,49E-11	-2,04203	1,02E-10	-3,04243	1,29E-14	-2,63317	4,64E-13	-	7,1754	4,69188
815934	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5047
816510	-	-	2,491541	8,31E-19	1,933373	2,88E-11	-1,64011	0,032517	-1,61994	0,026766	-	-2,96353	-1,10583
816517	2,207884	1,13E-11	-	-	-	-	-1,05925	0,087189	-1,14403	0,061932	-	-	-
817301	-	-	-1,67783	5,49E-06	-1,13376	0,002508	-	-	-	-	-	-	-1,66657
817316	-4,12592	3,57E-71	1,314149	9,82E-12	1,318891	8,27E-12	-2,79633	9,84E-11	-2,55559	2,98E-09	-	-	-
817456	1,25161	0,039607	-	-	-	-	-1,67483	0,012216	-1,29838	0,044174	-	-3,45962	-2,80437
818117	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,79979
818237	-6,85424	2,31E-121	1,37455	8,28E-08	1,104603	2,32E-05	-2,36053	1,33E-07	-1,64563	0,000381	-	1,59211	5,52247
818249	1,213491	2,39E-09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,23972	-
818377	1,450817	0,000177	-1,1685	0,001183	-1,11084	0,002097	-1,07006	0,065106	-	-	-	3,38088	4,5888
818566	-	-	-1,04942	1,99E-05	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,59503
818749	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,16925	-
818922	3,08542	1,44E-13	-2,17174	0,006405	-1,82732	0,019648	-	-	-	-	-	1,83188	-
818959	1,266322	3,38E-08	1,589994	5,36E-13	1,585735	6,63E-13	-2,7219	5,45E-15	-2,47231	1,72E-12	-	4,145	1,87711
819035	-	-	-	-	-	-	-1,43574	0,000437	-1,50742	0,000236	-	1,57839	-
819223	-	-	-	-	-	-	-1,67247	1,25E-05	-1,54713	4,66E-05	-	1,71651	-
819268	1,086984	0,000759	-	-	-	-	-1,23668	0,000252	-1,33916	6,32E-05	-	1,18892	-
819694	-	-	-	-	-	-	-2,36969	7,47E-11	-1,81418	5,91E-07	-	-	1,27332
819858	3,223231	0,000643	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
820209	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,37923	4,96908
820470	-3,48953	1,00E-27	-2,11094	7,59E-12	-1,98528	1,39E-10	-	-	-	-	-	-	-
820830	-2,70725	0,021784	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-3,27368	-1,64499
821682	-	-	-	-	-	-	-2,77146	0,041151	-	-	-	1,51734	2,04338
821701	-	-	-2,94581	0,048724	-3,43658	0,034368	-	-	-	-	-	-	-

821824	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,28841	1,24275
821944	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3772
823377	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-4,24429	-
823703	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,91081	-
824335	11,14699	4,12E-21	-2,60002	0,02619	-	-	7,774628	2,02E-43	6,163647	4,77E-27	3,17139	-1,12019	-
824558	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,11076	-2,25185
824728	-1,82607	2,73E-07	-	-	-	-	-1,36233	0,012608	-	-	-	-	-4,7254
824772	-2,7844	1,29E-47	-	-	-	-	1,343507	3,54E-05	1,283285	0,000112	2,10438	-	-
824844	1,086299	0,063151	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-2,65005	1,23846
824963	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0285
826213	-	-	-3,20112	3,36E-07	-3,18678	5,13E-07	-2,16318	0,081742	-	-	-	-	3,40959
827165	-2,64252	9,17E-15	-1,44027	5,52E-06	-1,48943	2,66E-06	-	-	-	-	-	-	2,18618
827317	-	-	-2,68403	2,30E-08	-3,19905	5,86E-10	-	-	-	-	-	-	-
827881	-1,97573	1,11E-07	3,716819	1,59E-32	2,604282	2,79E-16	1,403033	0,001474	1,53102	0,000542	-1,23257	-	-
828266	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,12554	-
828364	1,44379	9,50E-07	1,025451	0,000298	-	-	1,919641	2,18E-09	1,313745	0,000103	2,70328	1,93477	-
830536	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,31356
830849	-	-	-	-	-	-	-2,56715	0,013226	-	-	-	-	1,73113
831015	-	-	-1,53816	0,000163	-	-	-1,35656	0,008658	-2,14604	1,73E-05	1,66219	1,8731	-
831130	2,292998	8,09E-07	-1,90761	0,013011	-	-	-2,76796	0,010856	-1,71974	0,063927	-	-	-
831756	-	-	-1,23183	0,002712	-1,59897	0,000108	-1,18451	0,023973	-	-	1,52972	-	-
833476	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,46279	2,48392	-
834611	-	-	-1,3588	0,001346	-1,22383	0,004051	-6,23118	0,0001	-4,5979	2,91E-06	2,59846	3,46551	-
834623	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,18305	-	-
834661	-2,20163	3,66E-14	-1,21586	1,52E-07	-	-	1,983812	3,81E-07	1,846521	3,42E-06	-	-	-
835602	1,779308	0,036705	-	-	-	-	-	-	-	-	5,34171	3,73607	-
837235	4,240068	9,28E-10	1,26977	0,000282	-	-	9,967632	4,15E-139	9,025716	1,65E-113	-3,75724	-4,64873	-
837502	1,61494	0,000177	-	-	-1,5677	0,076972	-	-	-	-	-	-	-
838671	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,71016	-	-
838853	1,227142	5,91E-05	-1,77252	1,89E-11	-1,9358	1,90E-13	-1,1976	0,004267	-	-	-	2,73299	-
838939	-3,43081	1,08E-15	1,095091	0,004476	2,07147	7,74E-09	-2,91735	0,035898	-	-	-3,24421	1,25555	-
839085	1,063475	0,002804	-	-	-1,25151	0,003255	-1,40295	0,008931	-	-	1,22823	1,59558	-
839434	1,898649	0,000683	-	-	-	-	-2,78837	5,45E-06	-1,27813	0,019692	6,00188	5,52008	-
841077	-2,61001	0,000399	-6,2168	6,29E-09	-3,58202	3,26E-07	3,47186	0,035783	3,253577	0,05628	-2,45872	-2,08617	-
841582	-	-	-	-	1,356822	0,005771	-	-	-	-	-1,39665	-3,35264	-
841946	-3,62858	1,61E-27	-2,52613	5,71E-17	-2,74986	8,67E-20	-3,52941	5,85E-22	-3,64241	1,31E-23	4,78304	2,92597	-

842530	-	-	-2,91837	2,85E-13	-3,16961	6,44E-15	-1,70648	0,000317	-	-	-	-
842804	-	-	-1,9509	0,042713	-	-	-	-	-	-	4,31425	7,62063
842912	-	-	1,230769	6,66E-06	-	-	3,794297	8,50E-29	2,399324	1,19E-11	-4,28557	-2,67184
843113	-2,05402	7,43E-18	-	-	-	-	-1,05247	0,003649	-	-	-	-
843145	-	-	-	-	-	-	-	-	-2,75982	0,060667	1,92909	2,91284
844903	2,958316	0,008822	4,740657	0,001653	5,171513	0,000455	-	-	-	-	-4,74293	1,26699
845251	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,80231	-
846731	-	-	-	-	-	-	11,35911	1,74E-39	9,984484	2,46E-30	-	-
847285	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-5,40474	1,52139
847395	-	-	-2,2017	4,26E-17	-2,44805	2,52E-20	-1,12159	0,006762	-	-	-	-
848791	-	-	-	-	-	-	5,553541	0,001051	4,245074	0,02044	-	-
850117	-	-	-	-	-	-	4,360252	1,48E-27	3,356165	3,02E-16	-	-
850683	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-3,47945	-3,46763
852621	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,26757	-
857573	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,078	-
859294	-	-	-	-	-	-	9,817417	1,60E-14	8,259211	2,82E-10	-	-
859993	5,529496	6,35E-37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
861236	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,03509	5,85346
863605	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,8642
867202	-	-	1,44595	0,025274	1,858626	0,002327	-	-	-	-	-1,19718	-
867405	-	-	-	-	-	-	7,485034	1,81E-10	7,556115	1,37E-10	-2,48939	-
867449	2,923403	0,001696	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,69578	-
868396	-	-	-	-	-	-	9,25654	6,76E-11	7,288622	8,08E-07	-2,14029	-1,13574
869544	-	-	-	-	-	-	2,964206	0,045364	-	-	-	-