



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

**ANÁLISE DA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM *Trichoderma
harzianum***

KARINA ROTERDANNY ARAÚJO DOS SANTOS

GOIÂNIA-GO

2017

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO 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 nº 9610/98, 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.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

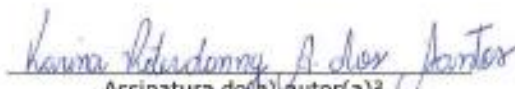
2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: *Karina Katerdenny Anais dos Santos*
Título do trabalho: *Análise da tolerância ao alumínio em *Crithidia fascicularis**

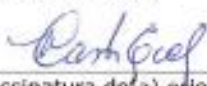
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 30 / 10 / 17

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados 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

²A assinatura deve ser escaneada.

KARINA ROTERDANNY ARAÚJO DOS SANTOS

**ANÁLISE DA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM *Trichoderma
harzianum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás por Karina Roterdanny Araújo dos Santos para obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Bioquímica e Genética Orientadora: Prof^a. Dr^a. Raphaela de Castro Georg

GOIÂNIA-GO

2017

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

Santos, Karina Roterdanny Araújo dos
Análise da tolerância ao alumínio em *Trichoderma harzianum*
[manuscrito] / Karina Roterdanny Araújo dos Santos. - 2017.
V, 60 f.: il.

Orientador: Prof. Dr^a. Raphaela de Castro Georg.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia,
Goiânia, 2017.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Biocontrole, resistência, alumínio, *Trichoderma harzianum*. I.
Georg, Dr^a. Raphaela de Castro, orient. II. Título.



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

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 463

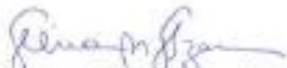
Aos trinta e um dias do mês de julho do ano de dois mil e dezessete, às catorze horas, no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas II da Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os componentes da banca examinadora: Profa. Dra. Raphaela de Castro Georg, Profa. Dra. Silvia Maria Salem Izacc e Prof. Dr. Ivan Torres Nicolau de Campos para, em sessão pública presidida pela primeira examinadora citada, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada "Análise da tolerância ao alumínio em *Trichoderma harzianum*", em nível de mestrado, área de concentração em Bioquímica e Genética, de autoria de **Karina Roterdanny Araújo dos Santos**, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela presidenta, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora da dissertação que em cerca de 40 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº1340 de 2015 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, a dissertação foi APROVADA, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da dissertação na Secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 horas e 04



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

minutos, encerrou-se a sessão de defesa de dissertação e, para constar, eu, Renato César Rodrigues, Assistente em Administração da Secretaria de Pós-graduação do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada, será assinada pelos membros da banca examinadora em três vias de igual teor.


Prof. Dr. Raphaela de Castro Georg
Presidenta da Banca
Universidade Federal de Goiás


Prof. Dra. Silvia Maria Salem Izacc
Universidade Federal de Goiás


Prof. Dr. Ivan Torres Nicolau de Campos
Universidade Federal de Goiás

KARINA ROTERDANNY ARAÚJO DOS SANTOS

**ANÁLISE DA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM *Trichoderma
harzianum***

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Raphaela de Castro Georg
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Ivan Torres Nicolau de Campos
Universidade Federal de Goiás

Prof^a. Dr^a. Sílvia Maria Salem Izacc
Universidade Federal de Goiás

DEDICATÓRIA

- ✓ Dedico este trabalho a Deus que me permitiu chegar até aqui, me fortalecendo em cada obstáculo, guiando meus passos e me abençoando.

AGRADECIMENTOS

- ✓ Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, PPGCB, pela oportunidade de realizar este trabalho.
- ✓ Ao CNPq pela provisão da bolsa durante o mestrado.
- ✓ À minha orientadora Raphaela Georg pelo apoio no decorrer do curso.
- ✓ Ao professor Cirano Ulhoa pelos ensinamentos, integridade e disposição em ajudar.
- ✓ Aos colegas do laboratório de enzimologia pelo auxílio nas tarefas desenvolvidas, principalmente ao Fabyano Alvares pela prestatividade em me instruir, sobretudo na parte de estatística.
- ✓ Agradeço também a minha família pelo apoio.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. <i>Trichoderma</i> spp	12
1.2. Controle Biológico por <i>Trichoderma</i> spp	13
1.3. Metais no solo	15
1.4. Resistência de <i>Trichoderma</i> spp. a metais.....	16
1.5. Sequenciamento de RNA.....	18
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivos gerais.....	20
3.2. Objetivos específicos.	20
4. METODOLOGIA.....	21
4.1. Manutenção dos isolados.....	21
4.2. Crescimento em meio sólido e líquido e determinação da concentração máxima de alumínio tolerada por <i>T. harzianum</i>	21
4.3. Dosagem de proteínas totais.....	22
4.4. Transcriptoma e análise da expressão.....	22
4.4.1. Extração de RNA total.....	22
4.4.2. Sequenciamento (RNAseq).....	22
4.4.3. Análise dos dados.	23
5. RESULTADOS	24
6. DISCUSSÕES.....	44
7. CONCLUSÃO.....	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA: Batata, dextrose, ágar

DEPC: Dietilpirocarbonato

GO: Ontologia genética

MEX: Extrato de malte

MYG: Extrato de malte, extrato de levedura e glicose

qRT-PCR: PCR quantitativa em Tempo Real

RNAseq: Sequenciamento de RNA

T.A: Temperatura ambiente

TE: Tris EDTA

v.: Versão

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Trichoderma harzianum</i> crescido em meio BDA.....	12
Figura 2. Gráfico de linhas representando o crescimento de <i>T. harzianum</i> (ALL-42) em diferentes concentrações de $AlCl_3$ durante 6 dias de tratamento.....	24
Figura 3. Avaliação morfológica de crescimento de <i>T. harzianum</i> submetido ao metal alumínio. <i>T. harzianum</i> crescido em meio BDA após 144 horas (6 dias).....	24
Figura 4. Crescimento de <i>T. harzianum</i> em meio líquido BDA. Massa micelial de <i>T. harzianum</i> após secagem em estufa.....	27
Figura 5. Análise do crescimento de <i>T. harzianum</i> em meio BDA. Peso seco, proteínas totais e teste Tukey.....	27
Figura 6. Crescimento de <i>T. harzianum</i> em meio líquido MYG. Massa micelial de <i>T. harzianum</i> após secagem em estufa.....	28
Figura 7. Análise do crescimento de <i>T. harzianum</i> em meio MYG. Peso seco, proteínas totais e teste estatístico Tukey.....	29
Figura 8. Crescimento de <i>T. harzianum</i> em meio líquido MEX. Massa micelial de <i>T. harzianum</i> após secagem em estufa.....	30
Figura 9. Análise do crescimento de <i>T. harzianum</i> em meio MEX. Peso seco, proteínas totais e teste estatístico Tukey.....	30
Figura 10. Gel de agarose das amostras de RNA total extraído de células de <i>T. harzianum</i> crescido em meio BDA.....	31
Figura 11. Análise de qualidade de RNA total utilizando o equipamento Bioanalyzer.....	32
Figura 12. Análise dos genes diferencialmente expressos pelo tratamento com alumínio em <i>T. harzianum</i>	34
Figura 13. Diagrama de Venn.....	35
Figuras 14. Análise de enriquecimento dos GO diferenciais da condição 1,5 mg/mL.....	39
Figura 15. Análise de enriquecimento dos GO diferenciais da condição 3,0	

mg/mL.....	40
Figura 16. Análise de enriquecimento dos GO diferenciais da condição 1,5 mg/mL.....	41
Figura 17. Análise de enriquecimento dos GO diferenciais da condição 3,0 mg/mL.....	42
Figura 18. Análise de enriquecimento dos GO diferenciais da condição 1,5 mg/mL (A) e 3,0 mg/mL (B).....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise das sequências geradas pelo sequenciamento das bibliotecas de RNAseq.....33

Tabela 2. Genes de *T. harzianum* que apresentaram maior indução em resposta ao tratamento com 1,5 e 3,0 mg/mL de cloreto de alumínio.....36

Tabela 3. Genes de *T. harzianum* que apresentaram maior expressão em resposta ao tratamento com 1,5 e 3,0 mg/mL de cloreto de alumínio.....37

RESUMO

A presença de metais pesados no solo tem sido cada vez mais frequente, aumentando dentre vários problemas, os de cunho agrícola. Espécies de *Trichoderma* estão entre os agentes de biocontrole mais conhecidos e empregados mundialmente, pois além de possuir ações como parasitismo e antibiose, possui grande resistência a metais, podendo também absorvê-los. Sendo assim, faz-se necessário, estudos mais aprofundados a cerca da resistência desse fungo a metais, envolvendo pesquisas que esclareçam melhor os processos envolvidos. Neste trabalho, objetivamos melhor compreensão a cerca da tolerância de *Trichoderma harzianum* ao alumínio, através do seu crescimento em diferentes meios de cultura com variadas concentrações do metal. Avaliamos também a secreção de proteínas quando o fungo crescia na presença de alumínio. Além disso, analisamos a resposta gênica ao estresse pelo metal através do sequenciamento de amostras de RNA obtidas quando o fungo foi crescido em meio BDA e submetido às concentrações de 1,5 e 3,0 mg/mL de cloreto de alumínio. Foi possível constatar que *T. harzianum* apresenta maior crescimento micelial quando crescido em meio BDA, comparado aos meios MEX e MYG, apresentando níveis de secreção de proteínas inversamente proporcionais às concentrações crescentes de alumínio. Foi observada alteração na expressão gênica através do aumento da quantidade de determinados fatores de transcrição de resposta a estresse, além da indução de genes envolvidos em sinalização celular mediada por proteína G e aumento em genes envolvidos com transporte vacuolar e proteínas transportadoras. A repressão de genes que codificam proteínas associadas a processos celulares importantes para o crescimento de *T. harzianum* também foi observada. No entanto, nossos resultados evidenciam que *T. harzianum* apresenta resistência significativa ao alumínio, uma vez que se mostra capaz de tolerar e absorver grandes concentrações deste metal, comumente prejudicial à agricultura.

Palavras-Chave: biocontrole, resistência, alumínio, *Trichoderma harzianum*.

ABSTRACT

The presence of heavy metals in the soil has increased, causing many problems of an agricultural nature. *Trichoderma* are a species which is among the most well known and used biocontrol agents worldwide, as well as possessing qualities such as parasitism and antibiosis, they have great resistance to metals and can also absorb them. Therefore, it is necessary for more detailed studies of the resistance of this fungus to metals and to research further the processes involved. In this work, we aimed to better understand the tolerance of *T. harzianum* to aluminum chloride, through a series of experiments performed in BDA, MEX e MYG, as well as Bradford tests for quantification of proteins. In addition, we evaluated the gene response to metal stress through the sequencing of RNA samples obtained when the fungus was grown in BDA medium and submitted to concentrations of 1.5 and 3.0 mg / mL of aluminum chloride. At 1.5 mg / mL, the fungus showed significant inhibition. It was observed that *T. harzianum* showed higher mycelial growth when grown in BDA medium compared to MEX and MYG, presenting levels of protein secretion inversely proportional to increasing concentrations of aluminum. The amount of transcription-specific factors of the stress response was increased, as well as the induction of genes involved in G-mediated cell signaling and increase in genes involved in vacuolar transport and carrier proteins. A repression of genes encoding proteins associated with cellular processes important for the growth of *T. harzianum* was also observed. These results show that *T. harzianum* is resistant to aluminum since it is able to tolerate and absorb large concentrations of this metal, which is commonly harmful to agriculture.

Key words: biocontrol, resistance, aluminum, *Trichoderma harzianum*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Trichoderma* spp.

Fungos do gênero *Trichoderma* são pertencentes ao filo *Ascomycota* (AGRIOS, 1997), classe dos Hifomicetos e ordem Hypocreales (ROIGERS *et al.*, 1991). Compreende fungos de vida livre, ubíquos, encontrados colonizando vários habitats, principalmente o solo, capazes de crescer em muitos substratos como materiais celulósicos decompondo resíduos vegetais (TOPOLOVEC-PINTARIC; ZUTIC; DERMIC, 2013) bem como outros fungos (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010).

São filamentosos e grandes produtores de esporos, seu micélio é formado de hifas hialinas ramificadas com parede lisa, medindo cerca de 5 a 10 μm de diâmetro (WEEDEN; SHELTON; HOFFMAN, 2008). Reproduzem-se assexuadamente por meio dos conidióforos, estruturas de formato cônico ou piramidal que formam zonas concêntricas pelos anéis sazonais (PAPAVIZAS, 1985; GAMS; BISSET, 1998).

As hifas dão origem aos conidióforos responsáveis pela produção de conídios, podendo estes serem lisos ou rugosos, ovóides, subglobosos, elipsoides ou elíptico-cilíndricos, com tamanho de 3 a 5 μm de diâmetro (MELO, 1996; GRIFFIN, 1994; HOFFMAN, 2008). A quantidade e tonalidade dos conídios atribuem cor esverdeada ou amarelada às colônias, que por sua vez são algodonosas e crescem rapidamente (GAMS; BISSET, 1998; MELO, 1991).

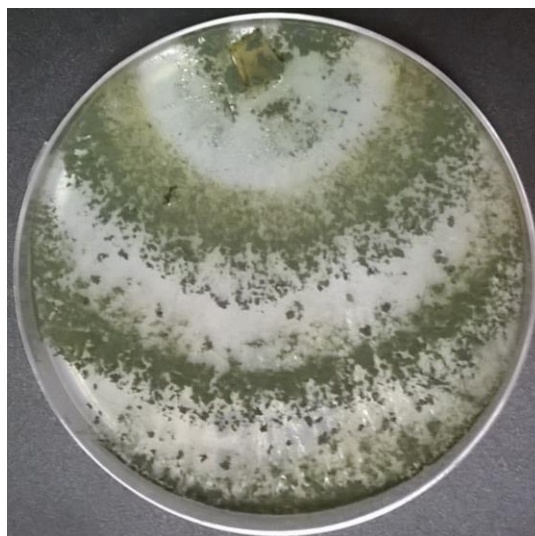


Figura 1. *Trichoderma harzianum* crescido em meio BDA.

A capacidade de *Trichoderma* de se difundir em vários ecossistemas está diretamente relacionada com sua capacidade de suportar grandes variações de temperatura (MCBEATH & ADELMA, 1991). Algumas espécies são típicas de regiões frias como por exemplo *Trichoderma minutisporum*, *Trichoderma oiride* e *Trichoderma polysporum* que conseguem se desenvolver bem a 7 °C. No entanto, grande parte adapta-se melhor em temperaturas entre 25 °C a 40 °C, como *Trichoderma hamatum* (até 35 °C), *Trichoderma harzianum* (38 °C) e *Trichoderma pseudokoningii* (40 °C) (DANIELSON & DAVEY, 1973; HJELJORD *et al.*, 2001; SAMUELS, 2006).

Além da temperatura, fatores como tipo de solo, aeração, pH, umidade e nutrientes interferem no desenvolvimento de fungos deste gênero, bem como a presença de íons metálicos em alta concentração (DANIELSON & DAVEY, 1973; KUÇUK *et al.*, 2008).

Trichoderma spp. tem sido estudado a cerca de 70 anos, é conhecido por secretar antibióticos e enzimas, antagonizar e parasitar outros fungos e não causar doenças em plantas, sendo estas características importantes para o controle biológico (MELO, 1996; DRUZHININA *et al.*, 2011; HARMAN, 2004; SCHUSTER & SCHMOLL, 2010).

Dentre as espécies deste gênero, uma das que mais se destacam é *Trichoderma harzianum*, o qual apresenta grande variabilidade genética, é difundido em diversos ambientes e encontrado em solos de diversos países (DRUZHININA *et al.*, 2005; GÓMEZ, CHET e HERRERA ESTRELLA, 1997; HARMAN *et al.*, 2004).

1.2. Controle Biológico por *Trichoderma* spp.

Controle biológico é uma estratégia natural e ecológica no qual certos microrganismos são utilizados para substituir ou amenizar os métodos químicos empregados na agricultura, a fim de diminuir os danos ocasionados por organismos patogênicos e pragas causadoras de doenças em plantas. (CHET *et al.*, 1997; BETTIOL, 1991; ALABOUVETTE, 2006).

A utilização do controle biológico tem sido necessária, uma vez que a preocupação com a saúde e meio ambiente tem aumentado nos últimos anos, levando a intensificação de estudos que contribuam para a diminuição de agroquímicos (HOWELL, 2002; VERMA *et al.*, 2007; TEMPLETON; HEINY, 1989;

WHIPPS; LUMSDEN, 2001).

Grande parte dos antagonistas inoculados em mudas e solos são hifomicetos, muitos pertencentes aos gêneros *Gliocladium*, *Penicillium* e *Trichoderma* sendo este último, reconhecido por tolerar bem os fungicidas químicos e suprimir o crescimento de patógenos em plantas (KOMMEDAHL & WINDELS, 1981; JOENIARTI *et al.*, 2013).

Desde 1930, o gênero *Trichoderma* tem sido estudado como agente de biocontrole atuando como antagonista de fungos patogênicos de plantas. Atualmente constituem 90% dos biofungicidas comerciais empregados em solos, folhas e sementes (PUNJA & UTKHEDE, 2003; GRIGORIEV *et al.*, 2012; BENÍTEZ *et al.*, 2004).

A versatilidade de mecanismos utilizados por esse gênero torna-o muito atrativo para o controle biológico, sendo um dos fungos mais pesquisados em laboratórios e testados em casas de vegetações (WIJESINGHE *et al.*, 2011; TRUSHINA *et al.*, 2013; FILHO *et al.*, 2008).

Dentre os mecanismos de ação exercidos, podem se destacar alguns como competição, parasitismo e predação, ativação de enzimas líticas como as exoglucanases, celobioase, endoglucanase, celulasas, glucanases e quitinases, além de induzir mudanças morfológicas e bioquímicas na planta hospedeira, como por exemplo, tolerância ao stress (VITERBO *et al.*, 2002; LORITO *et al.*, 2010).

Estudos moleculares com espécies de *Trichoderma* indicam que enzimas como glucanases, quitinases e proteases são mais comumente produzidas durante o micoparasitismo, tendo relação com a composição da parede celular do hospedeiro (LATGÉ, 2010).

Algumas espécies como *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum*, e *Trichoderma ghanense*, utilizam uma vasta gama de compostos como fonte de carbono e nitrogênio, apresentam tolerância a vários fungicidas e resistência a inibidores produzidos por outros microrganismos (KULLNING *et al.*, 2000; VINALE *et al.*, 2008).

Além de apresentar tolerância a vários fungicidas, *Trichoderma harzianum* utiliza mecanismos de ação complexa para parasitar outros microrganismos, envolvendo processos que vão desde o reconhecimento até o contato com o hospedeiro, expressando determinados genes fundamentais no processo de biocontrole (SHERM, *et al.*, 2008).

1.3. Metais no solo

O solo é composto de matéria viva, partes líquidas, sólidas e gasosas, materiais orgânicos e minerais. Trata-se de um dos principais ecossistemas, fornecendo condições de sobrevivência a várias espécies, tem como funções a conservação de nutrientes, proteção e manutenção do ciclo das águas subterrâneas, prospecção de microrganismos auxiliando em sua fertilidade e fornecimento de condições que favorecem a produção de alimentos (CETESB, 2015; SANTOS e BATISTA, 2015).

Dentre os vários tipos de solos, os Latossolos abrangem 46% da área do Cerrado, apresentam grande acidez, alto teor de alumínio e pH entre 4 a 5. Geralmente esses solos são profundos, apresentam coloração variando do vermelho a amarelo e são pobres em nutrientes como magnésio, potássio e cálcio contribuindo para a acidez (LINDSAY, 1979).

Apesar de o solo do cerrado ser considerado a savana mais rica do mundo no que compete a biodiversidade, contendo 10.000 espécies de plantas (4.400 endêmicas), tem sido usada de forma imprópria, sendo alvo de descarte de contaminantes (ARRUDA, 2001; CAI *et al.*, 2015). Geralmente a contaminação parte do uso de fertilizantes minerais, resíduos industriais e domésticos, bem como pelo uso de agroquímicos, prejudicando a condição do solo (COSTA *et al.*, 2010; BONO *et al.*, 2013; ENSINAS *et al.*, 2014; ANDRADE *et al.*, 2013; FERREIRA, 2001). Outros poluentes como lodo de esgoto e esterco animal favorecem a deposição de metais no solo, águas subterrâneas e superficiais, podendo interferir na qualidade dos mesmos (McBRIDE, 2003; FILIZOLA *et al.*, 2006; LIMA, 2011).

O pH, a água e a presença de ligantes orgânicos são fundamentais para a mobilidade e disponibilidade de metais, sendo também de elevada importância quando se refere a solubilização dos metais no solo podendo evitar efeitos negativos (GARG *et al.*, 2007; SANTOS e SANTOS, 2008). Destacam-se como consequências adversas causadas pela presença de metais no solo, o efeito cumulativo nos seres vivos, a intervenção nos processos enzimáticos e o impacto nos ecossistemas podendo levar a morte de organismos (SOUZA, 2014; BISINOTI *et al.* 2004; LIMA; MERÇON, 2011; SALES, 2013).

O alumínio é considerado o terceiro elemento químico mais frequente na crosta terrestre, abrangendo cerca de 7,1%, sendo responsável por graves

problemas de acidificação do solo, e provocando a limitação do desenvolvimento de plantas (LINDSAY, 1979; KOCHIAN, 1995; MYROLD & NASON 1992).

As concentrações de alumínio no solo do cerrado são variáveis e seus efeitos fitotóxicos são altamente dependentes de pH, concentrações de sais, compostos orgânicos, temperatura e espécie vegetal, fatores que podem ser alterados de acordo com a natureza da composição química do substrato ou da espécie estudada. Ainda são poucos os trabalhos que envolvem a relação de alumínio com plantas e microrganismos (CAMARGO & FURTANI, 1989).

1.4. Resistência de fungos a metais

Uma vez que altas concentrações de metais no solo podem causar uma série de danos, é interessante pensar em processos de bioassorção eficientes que empreguem baixo gasto de energia. Por exemplo, a utilização de microrganismos cujas células vivas ou mortas ou até mesmo os produtos de seu metabolismo sejam úteis como bioacumuladores (VEGLIO; BEOLCHINI, 1997; KOVACEVIC *et al.*, 2000).

Dentre os processos para diminuir a poluição por metais está a biorremediação, no qual os microrganismos obtêm energia e nutrientes através desses contaminantes, convertendo-os em substâncias solúveis e fazendo a remoção dos metais dispondo de baixo custo, quando comparado a alternativas como floculação, adsorção e troca iônica (MOHSENZADE *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2008).

Sabe-se que microrganismos possuem capacidade de armazenar grandes quantidades de íons metálicos, podendo provocar alterações nos ambientes devido aos vários processos metabólicos, resultando em modificação dos aspectos químicos, físicos e biológicos dos ecossistemas (MARUTHI *et al.*, 1983; KUMAR *et al.*, 1992; ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

A biomassa fúngica é composta por materiais de parede celular altamente ligante a metais, que confere a estes microrganismos capacidade de degradar e desintoxicar ambientes poluídos, fenômeno denominado de bioassorção. Tanto a biomassa viva quanto morta é eficiente neste processo, uma vez que possuem resistência significativa em relação a metais (KUMAR *et al.*, 2011; KRASTANOV *et al.*, 2013; GADD, 1990; ZAFAR *et al.*, 2007; KAPOOR *et al.*, 1998). Tal resistência é

favorecida pelo elevado grau de adaptação de certos microrganismos, bem como por outras características como transporte ativo, formação da ligação metal-proteínas e presença de quitina (GADD, 1990; KAPOOR *et al.*, 1999).

Algumas pesquisas mostram o sucesso na resistência e remoção de metais por certos fungos como espécies de *Fusarium*, *Penicillium Simplicissimum* e *Aspergillus niger*, no entanto, *Trichoderma* spp. tem sido frequentemente mencionado entre os bioabsorventes de metais mais eficazes (ALSHEH & DUVNJAK, 1995; BOSSHARD *et al.*, 1996; ZANG *et al.*, 1998).

Trichoderma spp. são encontrados em todos os tipos de solos e exercem mecanismos de indução a resistência codificados por genes cromossômicos que incluem: bombas de efluxo, acúmulo e complexação do metal na célula e redução química do contaminante (MOHSENZADEH *et al.*, 2010; ROMEIRO, 1999; ABDELALEY *et al.*, 2011).

Dentro do gênero *Trichoderma* spp, se encontram alguns bons agentes de bioabsorção de íons de metais como *T. harzianum* e *T. virens*, algumas dessas espécies mais tolerantes podem se tornar dominantes em alguns ambientes de acordo com a exposição do fungo ao metal, propiciando a seleção e tornando-os mais tolerantes ao estresse (NUR LIYANA *et al.*, 2011; ZAFAR *et al.*, 2007; YAZDANI *et al.*, 2010; KACPRAK & MALINA, 2005; HUTCHINSON & SYMINGTON, 1997).

A necessidade de pesquisas que explorem o uso de microrganismos para bioabsorção de metais pesados no solo, ou mesmo a busca da resistência fúngica frente a metais é de suma importância, uma vez que se trata de uma via econômica de descontaminação e promoção de benefícios para a agricultura, podendo intermediar o desenvolvimento de plantas sensíveis a estes metais (KAPOOR *et al.*, 1999).

1.5. Sequenciamento de RNA

À medida que entendemos sobre os padrões de expressão gênica, maior é a possibilidade de compreensão dos mecanismos biológicos, sendo este método de grande relevância em diversos campos da ciência como medicina e biologia (BAILÃO, 2008), agronomia (SILVA, 2014) e zootecnia (FERRAZ 2009).

No que diz respeito às análises de expressão gênica, o sequenciamento de RNA vem sendo cada vez mais utilizado, trazendo inovação em pesquisas de transcriptomas, pois além de proporcionar maior sensibilidade que métodos anteriores, como por exemplos os microarrays, não requerem informações pré-definidas dos genes que se deseja identificar, sendo considerado desde o final da década de 2000 como sendo uma tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) (Wang L *et al.*, 2010; BULLARD *et al.*, 2010).

A metodologia de RNA-Seq pode ser caracterizada por converter RNA em uma biblioteca de fragmentos de cDNA, de modo que cada molécula pode ser sequenciada gerando sequências curtas (reads) com tamanhos variados de 21 e 500 bp (WANG *et al.*, 2009).

As despesas para sequenciamentos via RNA-Seq podem ser consideradas altas principalmente quando o sequenciamento do genoma da espécie em estudo não está disponível como genoma de referência, mesmo assim estas técnicas de NGS permitam um menor custo comparado com outras tecnologias de sequenciamento (Hayden, 2009).

Uma vez que por meio do estudo do transcriptoma é possível identificar e determinar a estrutura dos genes, catalogar transcritos e quantificar mudanças nos níveis de expressão gênica sob diferentes condições (WANG *et al.*, 2009), investigações por meio de RNA-Seq sobre as alterações da expressão gênica de *T. harzianum* em resposta ao stress a alumínio, permitirá novas abordagens contribuindo para a identificação de novos genes relacionados com os mecanismos de resistência a esse metal.

2. Justificativa

Tem sido cada vez mais evidente, a necessidade de meios alternativos que substituam a utilização de agroquímicos a fim de amenizar os impactos ambientais causados pela agricultura. Dentre estes meios, se destaca a utilização de microrganismos com capacidade de controle biológico (VERMA *et al.*, 2007, VITERBO *et al.*, 2002).

No que se refere ao controle de doenças de plantas, o gênero *Trichoderma* está entre o mais utilizado devido algumas de suas características como: rápido crescimento, alta capacidade de se propagar e se adaptar em variados habitats, esporulação abundante e grande produção de metabólitos, permitindo que estes fungos favoreçam a agricultura exercendo elevado potencial como antagonistas de fitopatógenos (INCH *et al.*, 2011; BENÍTEZ *et al.*, 2004; BROTMAN *et al.*, 2012; VINALE *et al.*, 2008).

Uma das principais espécies do gênero é considerada a mais comum na utilização do biocontrole é *T. harzianum*, que representa a linhagem de distribuição mais ampla mundialmente (HARMAN, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2007; STEINDORFF *et al.*, 2012).

A utilização desse fungo para bioabsorção de metais pesados podem prover um meio alternativo para recuperação ambiental e maior produtividade agrícola. Neste sentido este trabalho busca compreender melhor os mecanismos de resistência de *T. harzianum* ao alumínio, metal frequentemente encontrado nos solos do Cerrado.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Analisar a adaptação de *T. harzianum* em solos do Cerrado, avaliando a tolerância e alteração da expressão gênica em resposta à presença de alumínio.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Determinar as concentrações máximas de alumínio tolerado por *T. harzianum* que se apresenta como bom micoparasita em ensaios de campo;
- 2) Analisar, através do sequenciamento de RNA, o perfil de expressão dos genes de *T. harzianum* em resposta à exposição ao alumínio.

4. METODOLOGIA

4.1. Manutenção dos isolados

Trichoderma harzianum (isolado ALL-42) da coleção Embrapa Arroz e Feijão-Goiás foi mantido com repiques periódicos inicialmente em meio MYG [0,5% (p/v) de extrato de malte, 0,25% (p/v) de extrato de levedura, 1% (p/v) de glicose e 2% (p/v) de ágar] e posteriormente em meio MEX (0,3% de extrato de malte, 0,2% de ágar) para melhor esporulação do fungo a ser utilizado na solução de esporos. Os repiques foram mantidos em temperatura ambiente ($\pm 28^{\circ}\text{C}$), sob condições de fotoperíodo.

4.2. Crescimento em meio sólido e líquido e determinação da concentração máxima de alumínio tolerada pelo isolado de *T. harzianum* (ALL-42)

Soluções de cloreto de alumínio (AlCl_3) (Vetec) 100 mg/mL, foram preparadas por dissolução em água destilada e esterilizadas a 120°C . O meio utilizado para crescimento do fungo em meio sólido foi o BDA (Batata 20%, glicose e ágar a 2%), sendo adicionado alumínio para concentrações finais de: 0,5 mg/mL; 1,0 mg/mL; 2,0 mg/mL; 3,0 mg/mL e 4,0 mg/mL depois de autoclavado. As placas foram mantidas a T.A. com fotoperíodo (12h luz/12h escuro) e medições do crescimento foram feitas com paquímetro durante 6 dias a cada 24 horas. Para verificar se o crescimento de *T. harzianum* na presença de alumínio era influenciado pelo meio de cultura, realizamos a análise de tolerância ao alumínio nas mesmas condições apresentadas anteriormente, apenas substituindo o meio de cultura BDA pelo MYG. Os dados coletados foram analisados pelo teste estatístico Tukey ($p > 0,5$), um dos testes de comparação de médias mais utilizados, pois permite analisar qualquer diferença entre duas médias de tratamento.

Foram utilizados para crescimento em meio líquido: BDA, MYG e MEX, com adição de alumínio nas concentrações finais de: 0,5 mg/mL; 1,0 mg/mL; 1,25 mg/mL; 1,50 mg/mL; 1,75 mg/mL; 2,0 mg/mL para BDA, 0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,3 mg/mL; 0,4 mg/mL e 0,5 mg/mL para MYG e 0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,3 mg/mL; 0,4 mg/mL e 0,5 mg/mL; 1,0 mg/mL e 1,5 mg/mL para MEX. Foram adicionados 30 mL do meio BDA em frascos de 250 mL juntamente com

solução de esporos de *T. harzianum* para uma concentração final de 1×10^7 /mL, previamente filtrada em lã de vidro e tendo seus esporos contabilizados em microscópio utilizando a câmara de Neubauer. O meio foi incubado em um agitador orbital a 28 °C a velocidade de 160 rpm. Após 48 horas foi filtrado, seco em estufa a 50 °C e sua massa pesada até o peso se tornar constante. Esta metodologia foi realizada para determinar concentrações máximas de alumínio toleradas por *T. harzianum* com base no crescimento micelial do fungo.

Dosagem de proteínas totais.

A concentração de proteínas foi definida pelo método descrito por BRADFORD (1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão. A reação foi realizada pela adição de 100 µl de amostra e 900 µl do reagente de BRADFORD, após 10 minutos em temperatura ambiente a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

4.3. Transcriptoma e análise de expressão

Para a extração de RNA foram utilizadas as condições de cultivo de *T. harzianum* incubado para crescimento em agitação por 48 horas em meio BDA, sendo que as concentrações de alumínio 1,5 mg/mL e 3,0 mg/mL (escolhidas de acordo com a inibição do crescimento) foram adicionadas 1 hora antes da filtração. Após o tratamento com alumínio, os micélios foram filtrados, centrifugados e congelados a -80 °C.

4.3.1. Extração de RNA Total

O RNA total foi isolado das células de micélio congeladas a -80 °C utilizando o reagente Trizol® e seguindo o procedimento recomendado pelo fabricante (Life Technologies). As preparações foram verificadas por espectrofotometria em comprimento de onda de 260nm/280nm e verificadas quanto à integridade utilizando eletroforese em gel de agarose-formaldeído (SAMBROOK *et al.*, 1989).

4.3.2. Sequenciamento (RNAseq)

Para realizar o sequenciamento, uma alíquota contendo 1-5 µg de RNA total (300 ng/µL), de cada condição foi mantida em gelo seco e enviada para a empresa BPI Biotecnologia, sediada em Botucatu/São Paulo.

4.3.3. Análise dos dados

Sequências de Illumina Hiseq 2500 foram utilizadas para análise de expressão diferencial, resultando em aproximadamente 450 milhões de sequências, com tamanho de 150 pb. A qualidade das sequências foram verificadas utilizando o programa fastqc v0.11.5. A retirada de sequências e regiões de baixa qualidade foram feitas utilizando o programa *Trimmomatic* v0.36 na função *single-end* (HEADCROP:10 TRAILING:15 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:50). Após trimagem (aparagem) as sequências foram mapeadas no genoma de *T. harzianum* TR274, acessível pelo portal (<http://genome.jgi.doe.gov/Trihar1>), utilizando o programa bowtie2 v2.2.9 nas suas configurações padrão. Só foram utilizados mapeamentos únicos e bibliotecas com >50% de sequências mapeadas. Os arquivos SAM gerados foram utilizados para gerar a tabela de *counts* para cada gene, utilizando o programa HTseq-count v0.6. A tabela de *counts* gerada foi utilizada como entrada para o pacote R DESeq2 v1.6.3, que faz uma análise estatística baseada na distribuição binomial negativa, indicando os genes diferencialmente expressos quando diferentes condições são comparadas, neste caso normalizado na ausência de metal. Foram considerados genes diferencialmente expressos aqueles com o p-valor ajustado < 0.05.

5. RESULTADOS

5.1. Crescimento em meio sólido

Efetuamos ensaios de crescimento de *T. harzianum*, isolado ALL42, em meio sólido BDA, juntamente com concentrações crescentes de cloreto de alumínio e na ausência de metal (controle).

As concentrações de alumínio testadas a priori foram: 0,5 mg/mL; 1,0 mg/mL; 2,0 mg/mL; 3,0 mg/mL e 4,0 mg/mL. Nas análises iniciais observamos que o fungo não apresentava crescimento nas duas últimas concentrações, sendo as mesmas retiradas dos experimentos posteriores. Além disso, a concentração de 0,1 mg/mL foi acrescida, resultando em quatro tratamentos feitos em triplicata.

Quando avaliamos o crescimento nas primeiras 24 horas (1º dia) não observamos diferença significativa entre o controle e os tratamentos com cloreto de alumínio (Figura 2).

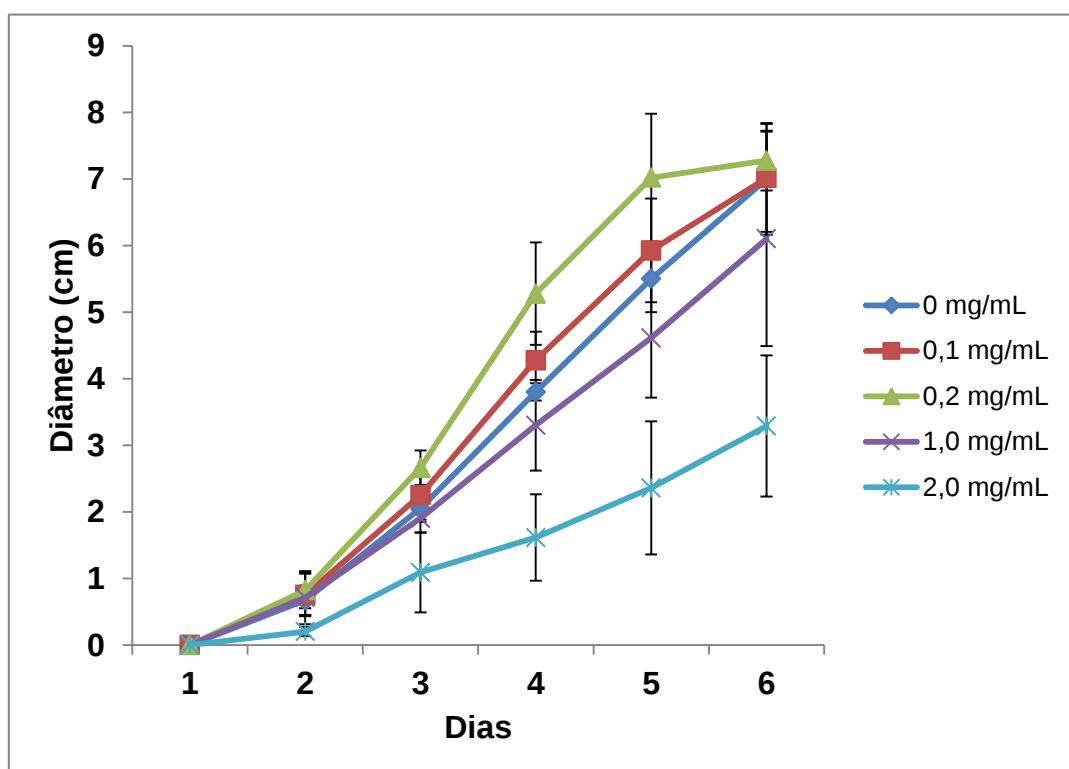


Figura 2: Gráfico de linhas representando o crescimento de *T. harzianum* (ALL-42) em diferentes concentrações de AlCl_3 durante 6 dias de tratamento.

Após 48 horas (2 dias), o crescimento micelial de *T. harzianum* começa a diminuir quando submetido à concentração de 2,0 mg/mL de cloreto de alumínio (Figura 2). Nas demais concentrações não foram observadas diferenças significativas em relação ao controle.

Podemos observamos que a concentração de 2,0 mg/mL de alumínio permanece inibindo o crescimento de *T. harzianum* em 72 e 96 horas (3 e 4 dias). Com base no crescimento das amostras, apenas a concentração de 2,0 mg/mL diferiu dos demais tratamentos e controle após 144 horas (6 dias - figura 2).

Foi possível observar macroscopicamente que a presença de alumínio altera a morfologia de *T. harzianum* quando submetido às concentrações de 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL de AlCl_3 (Figura 3). Na concentração de 0,5 mg/mL o fungo apresenta maior esporulação, enquanto nas concentrações 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL apresenta mudança na cor das colônias para tons mais claros, houve alteração também na coloração do meio de cultura para tons mais escuros. Esses resultados demonstram que embora *T. harzianum* apresente boa tolerância ao alumínio, o metal em altas concentrações prejudica o desenvolvimento do fungo.

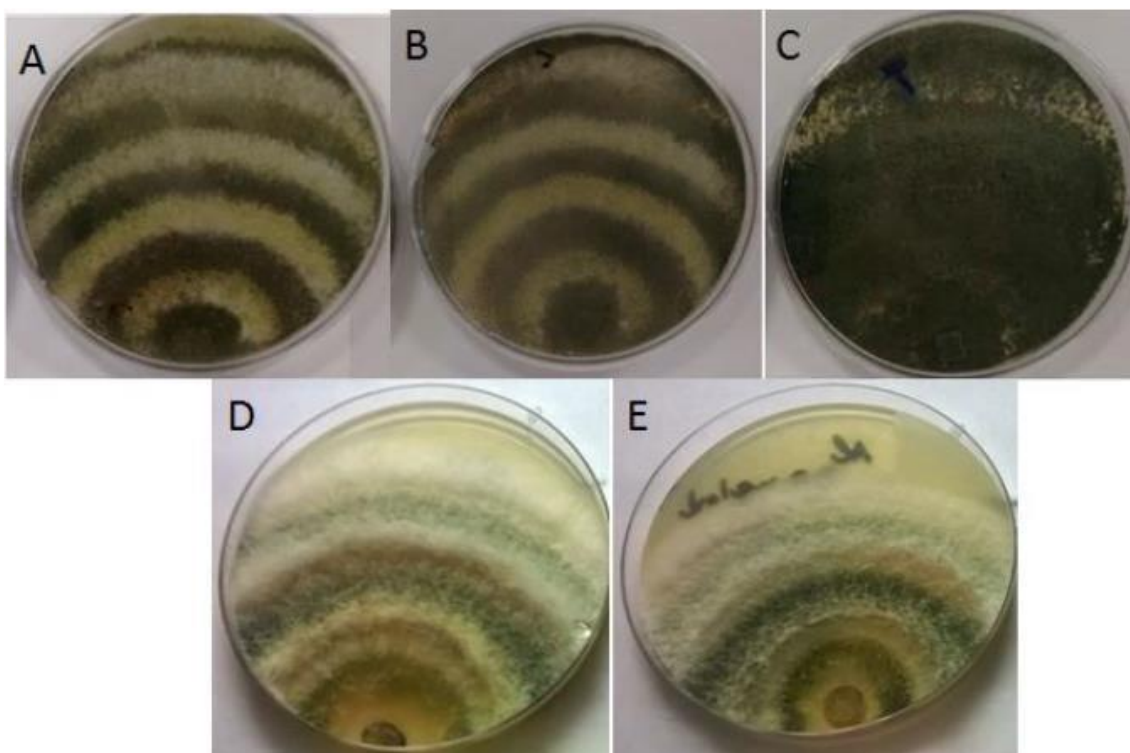


Figura 3: Avaliação morfológica de crescimento de *T. harzianum* submetido ao metal alumínio. *T. harzianum* crescido em meio BDA após 144 horas (6 dias). A - controle; B, C, D e E - 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL de AlCl_3 , respectivamente.

Este mesmo experimento foi realizado utilizando meio MYG e verificamos que mesmo nas concentrações mais baixas de metal o crescimento de *Trichoderma* é inexistente, enquanto nas placas controle, sem adição de cloreto de alumínio o crescimento ocorre de forma normal, indicando que o meio BDA propicia maior desenvolvimento a *T. harzianum*.

5.2. Crescimento em meio líquido e quantificação de proteínas por Bradford

A avaliação da tolerância de *T. harzianum* a alumínio também foi realizada em meio líquido, utilizando concentrações crescentes de metal e controle. Os experimentos foram realizados em três meios diferentes para analisar a influência de cada um no crescimento do fungo e avaliar as proteínas secretadas mediante variadas concentrações de alumínio. Os meios utilizados foram: BDA, MYG e MEX.

5.2.1 Crescimento em meio BDA

As concentrações utilizadas para crescimento do fungo em BDA foram: 0 mg/mL (sem metal); 0,5 mg/mL; 1,0 mg/mL; 1,25 mg/mL; 1,5 mg/mL; 1,75 mg/mL e 2,0 mg/mL. Os resultados apontam que nas concentrações de 0,5 a 1,25 mg/mL o metal não interfere no crescimento de *T. harzianum*, sendo estatisticamente iguais entre elas (figura 4 e 5). Esta interferência, no entanto, começa a ser notada em concentrações de alumínio acima de 1,5 mg/mL, mostrando que o fungo apresenta resistência significativa a alumínio e alto potencial de crescimento em meio BDA.

Por meio do teste de quantificação de proteínas secretadas, podemos observar (figura 5) que no controle e 0,5 mg/mL ocorre maior secreção de proteínas em relação às demais concentrações. A partir de 1,0 mg/mL observamos um decréscimo na secreção e de 1,25 a 2,0 mg/mL a secreção se torna pouca ou até mesmo inexistente, sendo estes estatisticamente iguais.

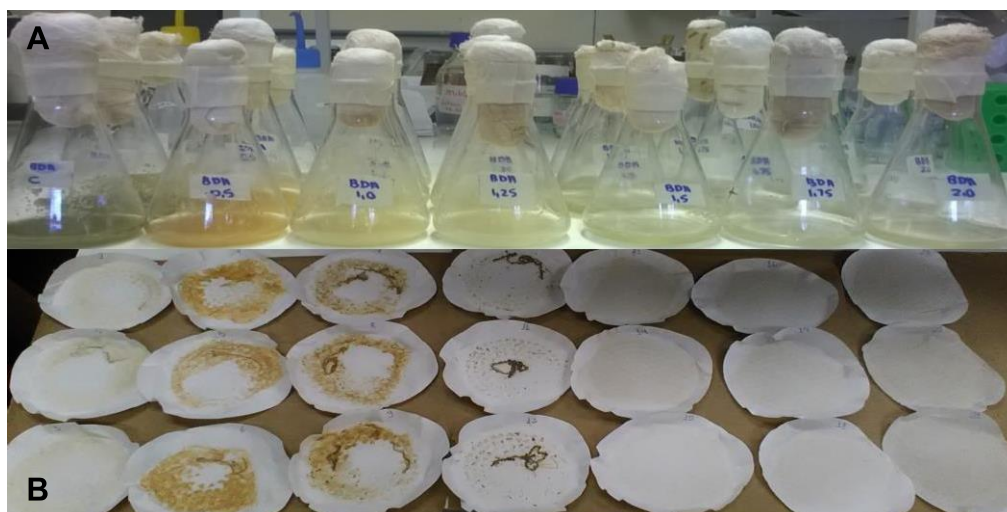


Figura 4. A. Crescimento de *T. harzianum* em meio líquido BDA. B. Massa micelial de *T. harzianum* após secagem em estufa.

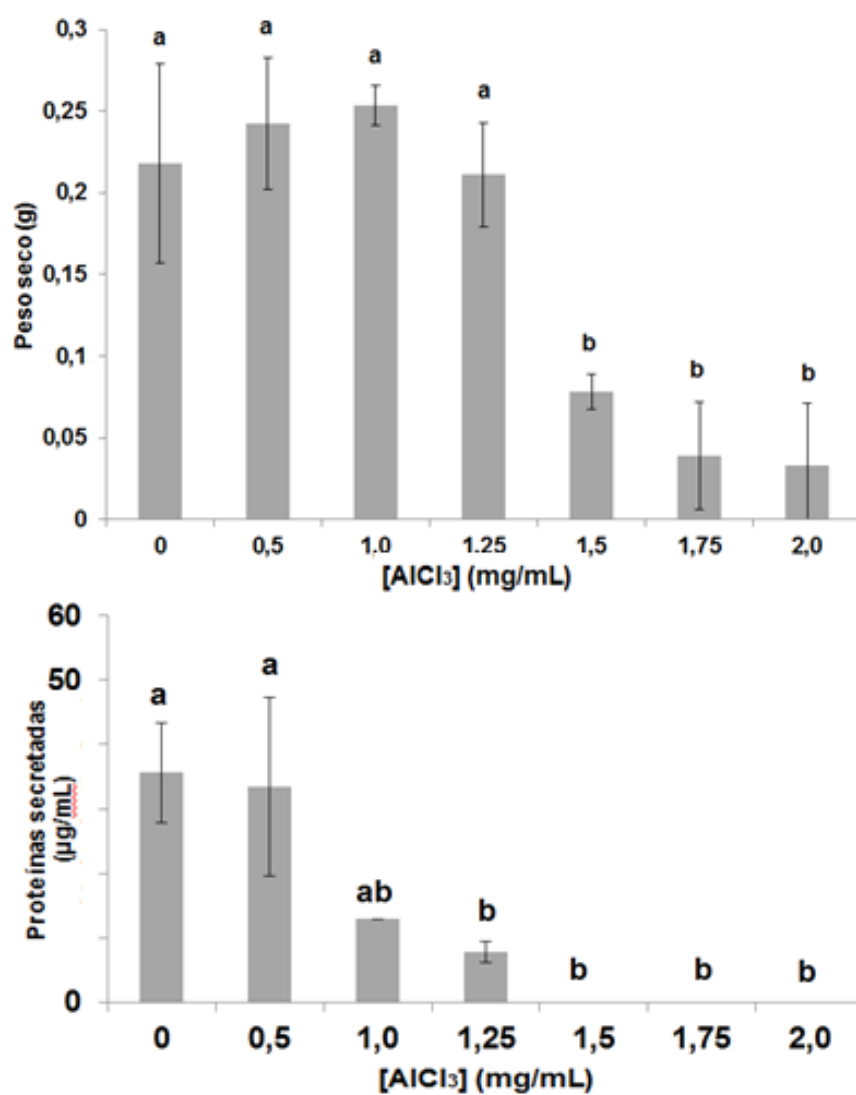


Figura 5. Análise do crescimento de *T. harzianum* em meio BDA. Peso seco, proteínas secretadas e teste estatístico Tukey.

5.2.2 Crescimento em meio MYG

Inicialmente os testes de crescimento em meio MYG (figura 6 e 7), foram realizados nas mesmas concentrações de metal utilizados para meio BDA. No entanto, não foi observado crescimento significativo, sendo necessário diminuir as concentrações de alumínio para: 0 mg/mL (sem metal); 0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,3 mg/mL; 0,4 mg/mL e 0,5mg/mL. Pôde ser demonstrado a partir do teste de Tukey, que não houve diferença significativa entre as concentrações de 0 a 0,1 mg/mL, apresentando crescimento nessas concentrações e decréscimo do mesmo de 0,2 a 0,5 mg/mL. Como esperado, observamos que *T. harzianum* secreta proteínas na ausência de alumínio, diferindo significativamente das condições em que o fungo foi submetido ao estresse pelo metal, não apresentando secreção considerável de proteínas.



Figura 6. A. Crescimento de *T. harzianum* em meio líquido MYG. B. Massa micelial de *T. harzianum* após secagem em estufa.

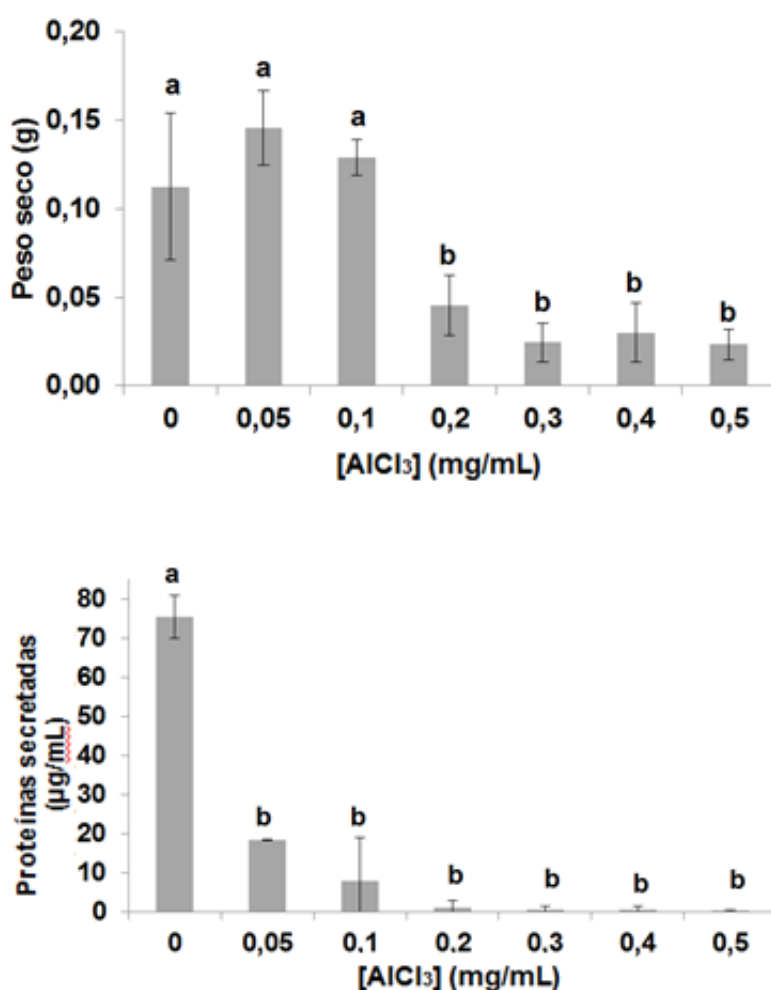


Figura 7. Análise do crescimento de *T. harzianum* em meio MYG. Peso seco, proteínas secretadas e teste estatístico tukey.

5.2.3 Crescimento em meio MEX

Os testes realizados em meio MEX foram primeiramente realizados nas mesmas concentrações de alumínio utilizadas para o meio BDA, observando que houve pouco crescimento, alteramos as concentrações para 0 mg/mL (sem metal); 0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,3 mg/mL; 0,4 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1,0 mg/mL e 1,5 mg/mL. Através do teste tukey, podemos notar que não houve diferença significativa no crescimento entre as concentrações de 0 a 0,5 mg/mL, havendo inibição a partir de 1,0 mg/mL. Observamos por meio do teste de proteínas secretadas que no controle, bem como nas primeiras concentrações de alumínio, houve maior nível de secreção de proteínas, resultado semelhante aos meios BDA e MYG, demonstrando que a presença de metal diminui ou inibe a secreção.



Figura 8. A. Crescimento de *T. harzianum* em meio líquido MEX. B. Massa micelial de *T. harzianum* após secagem em estufa.

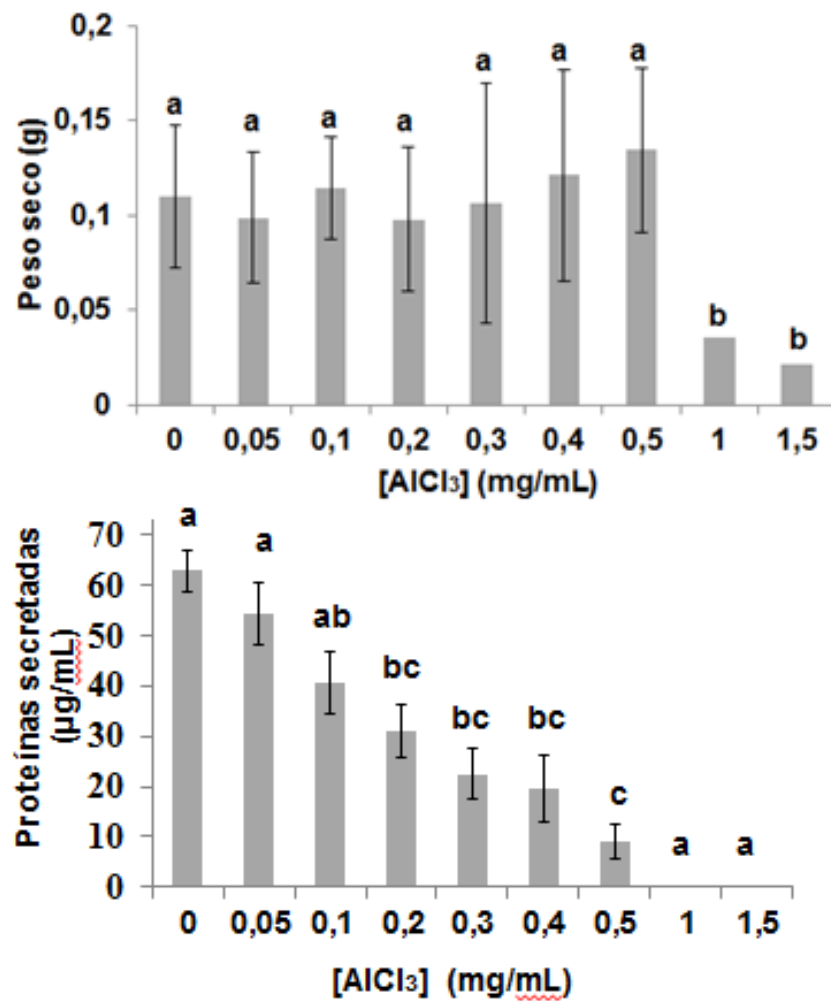


Figura 9. Análise do crescimento de *T. harzianum* em meio MEX. Peso seco, proteínas secretadas e teste estatístico tukey.

6. Análise da expressão de genes em *T. harzianum* em resposta ao tratamento com alumínio.

Para verificar a alteração na expressão gênica de *T. harzianum* em resposta ao alumínio, realizamos sequenciamento de RNA extraído de células submetidas a 1,5 mg/mL e 3,0 mg/mL de cloreto de alumínio ou em condições fisiológicas (todas as condições em meio BDA). Antes de realizar o sequenciamento foi feito um gel de agarose para verificar a integridade dos RNAs a serem sequenciados (figura 10), o grau de pureza dos RNAs foi estimado pela razão entre as absorbâncias medidas a 260/280 nm obtendo média de 2,0. As amostras de RNA também foram verificadas quanto à sua integridade utilizando o equipamento Bioanalyzer. Observamos que todas as amostras tinham qualidade acima da desejável para a construção das bibliotecas de sequenciamento de RNA (RNAseq), com valores de RIN (Índice de integridade das amostras) próximos a 7,0 (Figura 11).

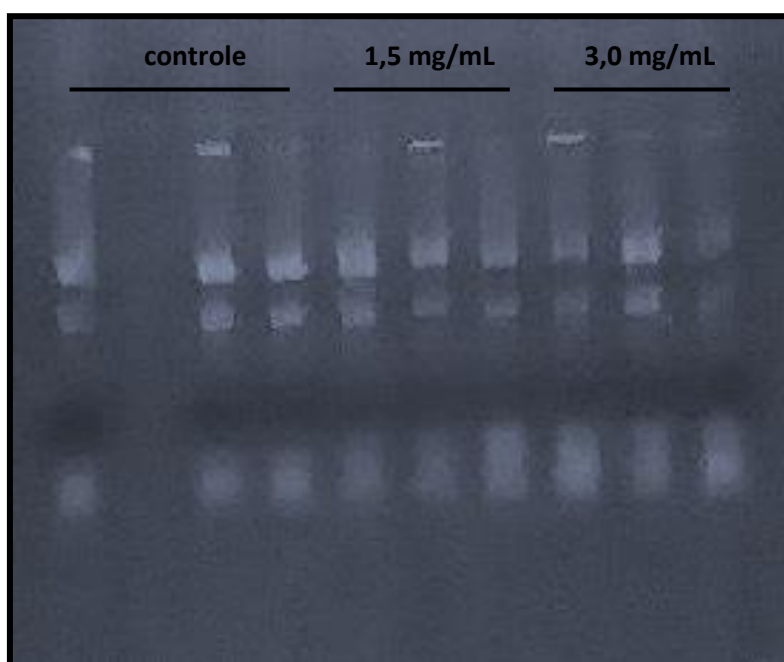
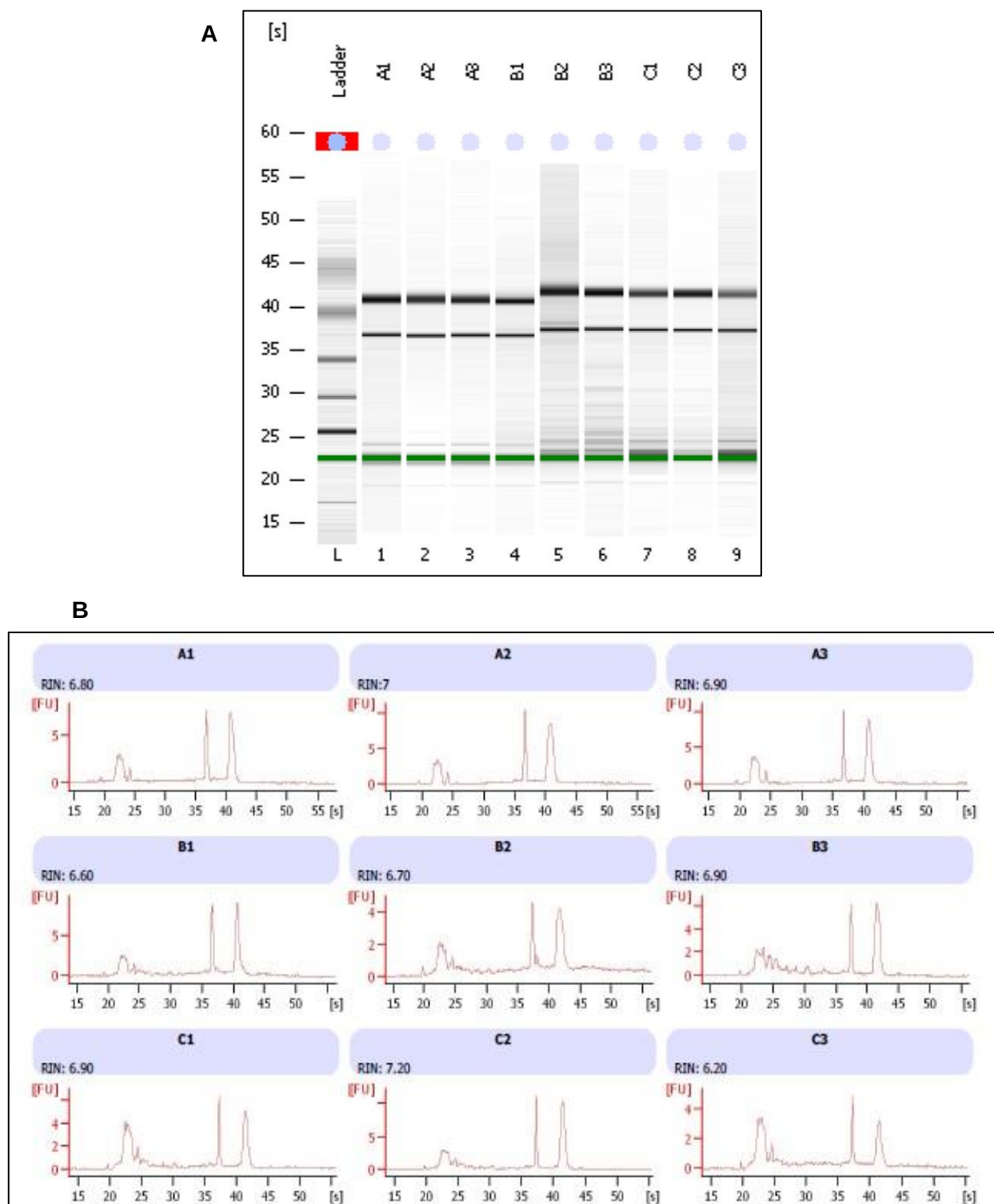


Figura 10. Gel de agarose das amostras de RNA total extraído de células de *T. harzianum* crescido em meio BDA, na ausência (controle) ou presença de 1,5 mg/mL e 3,0 mg/mL de AlCl_3 .



Foram sequenciadas três amostras de cada condição, resultando em 9 bibliotecas. Em média foram geradas mais de 25 milhões de sequências em cada biblioteca sequenciada, um número significativo para análises de expressão gênica. A tabela 1 demonstra a porcentagem de mapeamento no genoma de *T. harzianum* das sequências geradas pelo RNAseq. Observamos que a maior parte das sequências geradas foram mapeadas no genoma de *T. harzianum* (>50%) (o tamanho do genoma de referência *T. harzianum* TR274 corresponde a 40.87 mil pares de bases (JGI, 2017)). As sequências das bibliotecas (triplicata) foram agrupadas para as posteriores análises de expressão gênica.

Tabela 1. Análise das sequências geradas pelo sequenciamento das bibliotecas de RNAseq.

Biblioteca	reads ^a	Mapeamento ^b (%)
A1	33.119.024	75.11
A2	26.428.933	51.06
A3	26.590.958	72.90
B1	21.745.772	77.22
B2	26.233.966	76.47
B3	23.503.806	74.42
C1	23.345.237	73.52
C2	25.154.377	76.15
C3	25.886.061	56.16

A1, A2 e A3 = triplicatas controle; B1, B2 e B3 = triplicatas 1,5 mg/mL AlCl₃; C1, C2 e C3 = triplicatas 3,0 mg/mL AlCl₃. ^aNúmero total de sequências obtidas pelo sequenciamento das bibliotecas. ^bPorcentagem de sequências mapeadas no genoma de *T. harzianum*.

Observamos um total de 4.011 genes diferencialmente expressos em *T. harzianum* em resposta ao tratamento com 1,5 mg/mL de AlCl₃, sendo 2.022 induzidos e 1.989 reprimidos. Observamos um número similar de genes diferencialmente expressos em resposta ao tratamento com 3,0 mg/mL de AlCl₃, um total de 4.132 sendo 2.121 induzidos e 2.011 reprimidos (Figuras 12 e 13). A maioria dos genes que foram diferencialmente expressos quando *T. harzianum* foi submetido ao tratamento com 1,5 mg/mL foram também diferencialmente expressos no tratamento com 3,0 mg/mL AlCl₃, (Figura 13). Verificamos que 3.371 genes foram diferencialmente expressos nas duas condições e, quase na totalidade dos casos, verificamos que quando era induzido em uma condição também era induzido na outra. O mesmo comportamento observamos no caso dos genes reprimidos, como mostra a figura 13.

Embora a maioria dos genes tenha mostrado expressão diferencial nas duas condições de tratamento de alumínio analisadas, alguns genes mostraram ser reprimidos ou induzidos apenas em uma das condições. Observamos que 640 genes foram diferencialmente expressos apenas na condição de 1,5 mg/mL de AlCl_3 , enquanto que apenas na condição de 3 mg/mL observamos 761 genes diferencialmente expressos (Figura 13).

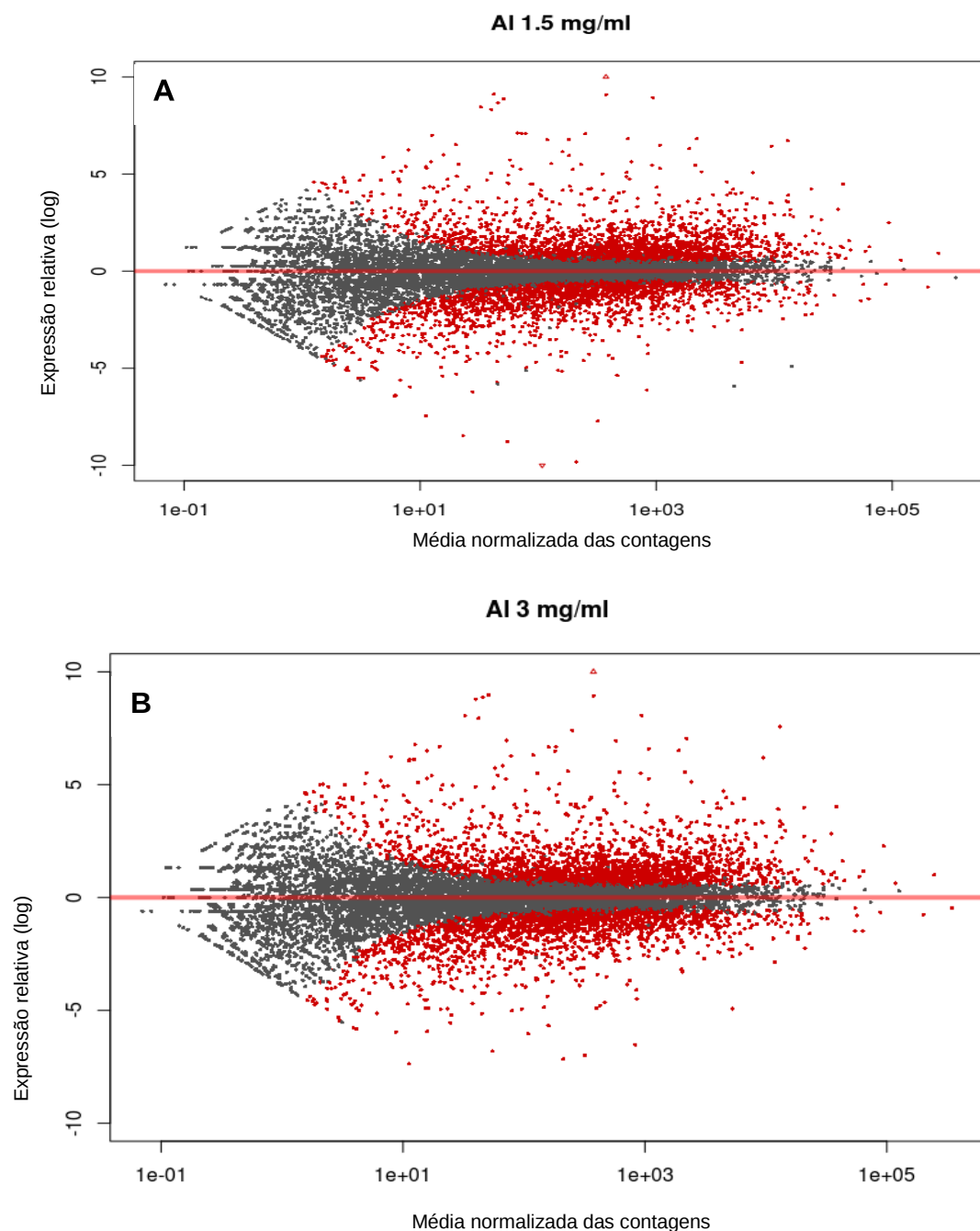


Figura 12. Análise dos genes diferencialmente expressos pelo tratamento com alumínio em *T. harzianum*. A) 1,5 mg/mL AlCl_3 . B) 3,0 mg/mL AlCl_3 . Em vermelho estão destacados os genes sequenciados diferencialmente expressos.

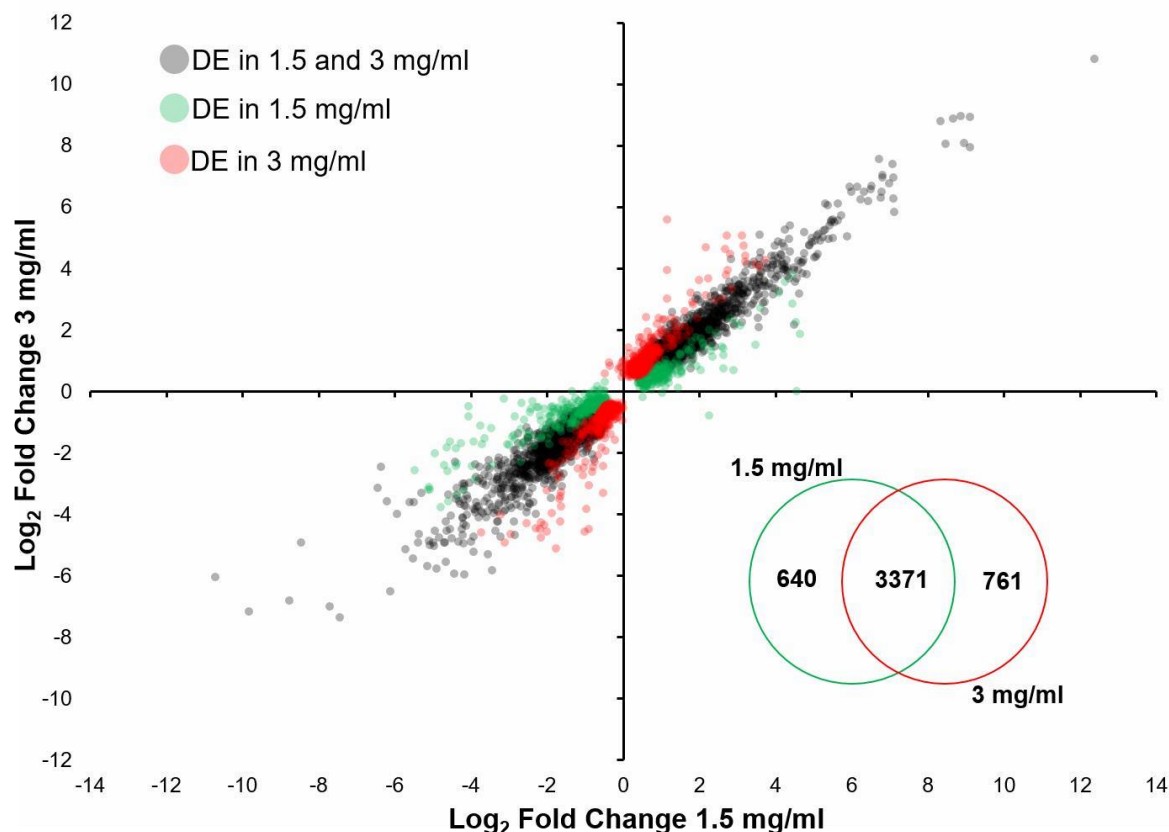


Figura 13. Diagrama de Venn demonstrando em verde e vermelho os genes diferencialmente expressos respectivamente em 1,5 e 3,0 mg/mL AlCl_3 . Em preto são apresentados os genes diferencialmente expressos nas duas condições. DE – Diferencialmente expresso.

Dentre os genes diferencialmente expressos, aqueles que apresentaram maior indução ou repressão são apresentados nas tabelas 2 e 3, respectivamente. Observamos dentre os genes induzidos aqueles codificando diferentes tipos de transportadores, peptidases, genes relacionados a transferases de carboidratos e alguns genes com função desconhecida (Tabela 2). Interessantemente, diferentes tipos de transportadores e peptidases também foram identificadas entre os genes reprimidos, indicando uma regulação diferencial desses processos pela exposição de *T. harzianum* ao alumínio (Tabela 3). Foi observada a repressão também de genes codificando uma Hsp70 e DNA Polimerase, entre outros.

Para avaliar quais processos celulares estariam envolvidos na resposta ao alumínio realizamos uma análise das categorias mais representadas entre os genes induzidos e reprimidos utilizando a categorização do Gene Ontology (GO) (<http://www.geneontology.org/>), importante ferramenta da bioinformática usada para definir conceitos/classes utilizadas para descrever a função do gene e as relações

entre essas classes, como por exemplo: componente celular, processos biológicos e função molecular (Gene Ontology, 2017). Realizamos também essa análise considerando os processos moleculares e compartimentos celulares mais representados entre os genes diferencialmente expressos (Figuras 14 a 18).

Tabela 2. Genes de *T. harzianum* que apresentaram maior indução em resposta ao tratamento com 1,5 e 3,0 mg/mL de cloreto de alumínio.

Genes	Função	1,5 mg/mL (log ₂)	3,0 mg/mL (log ₂)
176218	Transportador de açúcar	12,3	10,8
630626	Citocromo P450	9,1	7,9
744792	Proteína de resistência a tetraciclina, TetB	9,0	8,9
778969	Peptidase S8 e S53,	8,9	8,1
798326	Região de ligação a glicosil transferase	8,9	9,0
811212	Beta-lactamase	8,7	8,9
764204	Peptidase S10	8,5	8,1
830234	Iniciador de formação de septo	8,3	8,8
782833	<i>Arrestin-like</i> , N- terminal	7,1	5,8
784576	Transportador de oligopetídeos	7,1	7,0
713804	ND	7,1	6,3
842016	N-acetiltransferase relacionada com GCN5	7,1	7,4
698384	Glicosil transferase Família 8	7,0	6,8
778789	Dinamina, região GTPase	6,8	7,0
747086	<i>GroES-like</i>	6,8	7,0
176226	Proteína reguladora de transcrição fúngica	6,8	6,5
778507	Transportador de açúcar	6,8	6,3
835279	ATPase, transportador de cobre de tipo P	6,7	7,6
790077	ND	6,5	6,7
77248	ND	6,5	6,6
786396	Peptidase A1	6,4	6,2
783752	<i>Major facilitator superfamily</i>	6,3	6,5
803620	ND	6,2	6,2
144055	Beta-lactamase	6,1	6,7

ND= Função não identificada

Tabela 3. Genes de *T. harzianum* que apresentaram maior repressão em resposta ao tratamento com 1,5 e 3,0 mg/mL de cloreto de alumínio.

Genes	Função	1,5 mg/mL (log ₂)	3,0 mg/mL (log ₂)
783231	ND	-10,7	-6,0
690025	Peptidase M35, deuterolisina	-9,8	-7,2
325036	Superfamília: SSF81324 Canais de potássio	-8,8	-6,8
721566	Transportador de cobre	-8,5	-4,9
785321	Peptidase S8 e S53, subtilisina	-7,7	-7,0
780949	Peptidase M28	-7,5	-7,4
784892	Transportador de açúcar	-6,5	-3,2
717969	ND	-6,4	-2,5
841077	<i>Major facilitator superfamily</i>	-6,2	-3,6
816953	Peptidase M36, fungalesina	-6,1	-6,5
812191	Transferência de metil tipo 12	-6,0	-4,0
779324	Lise de pectina	-5,7	-5,1
460947	Proteína de função desconhecida	-5,6	-3,6
737794	ND	-5,5	-5,4
305993	Fosfatidilserina decarboxilase	-5,5	-3,6
782080	Lipopoteína PROKAR	-5,4	-4,9
828076	Transportador de cobre Ctr	-5,4	-4,7
786098	Metiltransferase tipo 11	-5,3	-3,3
221879	Peptidase S1 e S6	-5,2	-5,7
778695	Hidroxilase de anel aromático	-5,1	-4,9
708607	Hsp70	-5,1	-5,0
818527	DNA-polimerase	-5,0	-4,9
782526	Fosfolipase A2	-5,0	-5,0
786097	Citocromo P450	-5,0	-4,5
796171	Proteína reguladora de transcrição fúngica	-4,9	-5,8

ND= Função não identificada

Dentre os processos biológicos que apresentaram enriquecidos nos genes induzidos por alumínio (1,5 e 3,0 mg/mL), observamos o aumento de categorias como: Glicosilação, Biossíntese de compostos orgânicos cíclicos, Modificação de proteínas por conjugação de pequenas proteínas, Iniciação da transcrição a partir de promotores da RNA Polimerase II, Regulação biológica mediada por proteína G e Transporte vacuolar (Figuras 14 e 15).

Como esperado, o enriquecimento desses processos biológicos levou a observação dos seguintes funções moleculares também enriquecidas dentre os genes induzidos por alumínio (1,5 e 3,0 mg/mL): Ligação à lipídeos (fosfatidilinositol), Ligação à DNA em sequências específicas (fatores de transcrição), Ligação à cátions, Monoxigenase de nitronato, Hidrolase de ubiquitina e Ligação à íons de zinco, dentre outros (Figuras 16 e 17).

Dentre os processos biológicos que apresentaram enriquecidos nos genes reprimidos por alumínio (1,5 e 3,0 mg/mL), observamos o aumento de categorias como: Processos metabólicos proteicos, Processos metabólicos de síntese de nucleotídeos, Processos metabólicos de síntese de aminoácidos, Processos metabólicos de carboidratos, Processos metabólicos de replicação de DNA e Processos baseados em microtubulos (Figuras 14 e 15). Esses dados sugerem que vários processos biológicos importantes para o crescimento de *T. harzianum* encontram-se reprimidos no tratamento com alumínio.

O enriquecimento desses processos biológicos levou a observação dos seguintes funções moleculares enriquecidas dentre os genes reprimidos por alumínio (1,5 e 3,0 mg/mL): Oxidoredutases, Ligação à tubulina, Ligação de carboidratos, Fatores de alongação da tradução e Moléculas estruturais, dentre outros (Figuras 16 e 17).

Em relação ao enriquecimento nas categorias de componente celular, destaca-se a “Componente integral de membrana de organelas”, a única que apresentou-se enriquecida entre os genes induzidos tanto no tratamento com 1,5 quanto com 3,0 mg/mL de cloreto de alumínio. O número de categorias de componente celular enriquecidas entre os genes reprimidos foi bem mais significativa que entre os genes induzidos. Isso pode ser o reflexo da severidade do estresse gerado pela presença de alumínio, causando a repressão de vários genes cujos produtos protéicos participam de processos biológicos basais de *T. harzianum*.

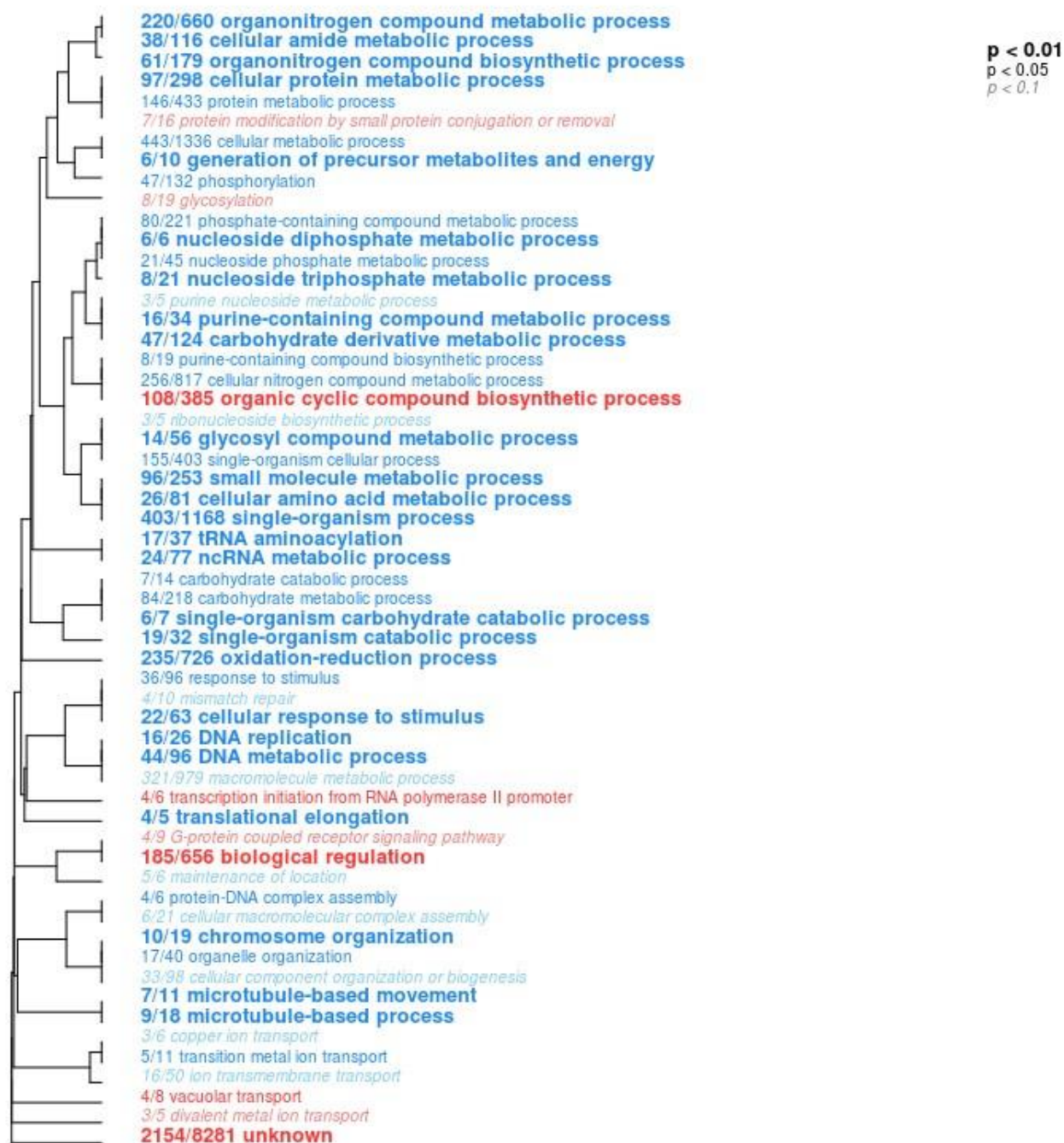


Figura 14. Análise de enriquecimento dos GO diferenciais da condição 1,5 mg/mL. Em vermelho são as categorias referentes aos processos biológicos induzidas e em azul, as reprimidas. A árvore mostra a relação entre as categorias. Os números adjacentes aos nomes das categorias do GO representam: números de genes diferencialmente expressos incluídos na categoria/número de genes totais de *T. harzianum* incluídos nessa categoria.

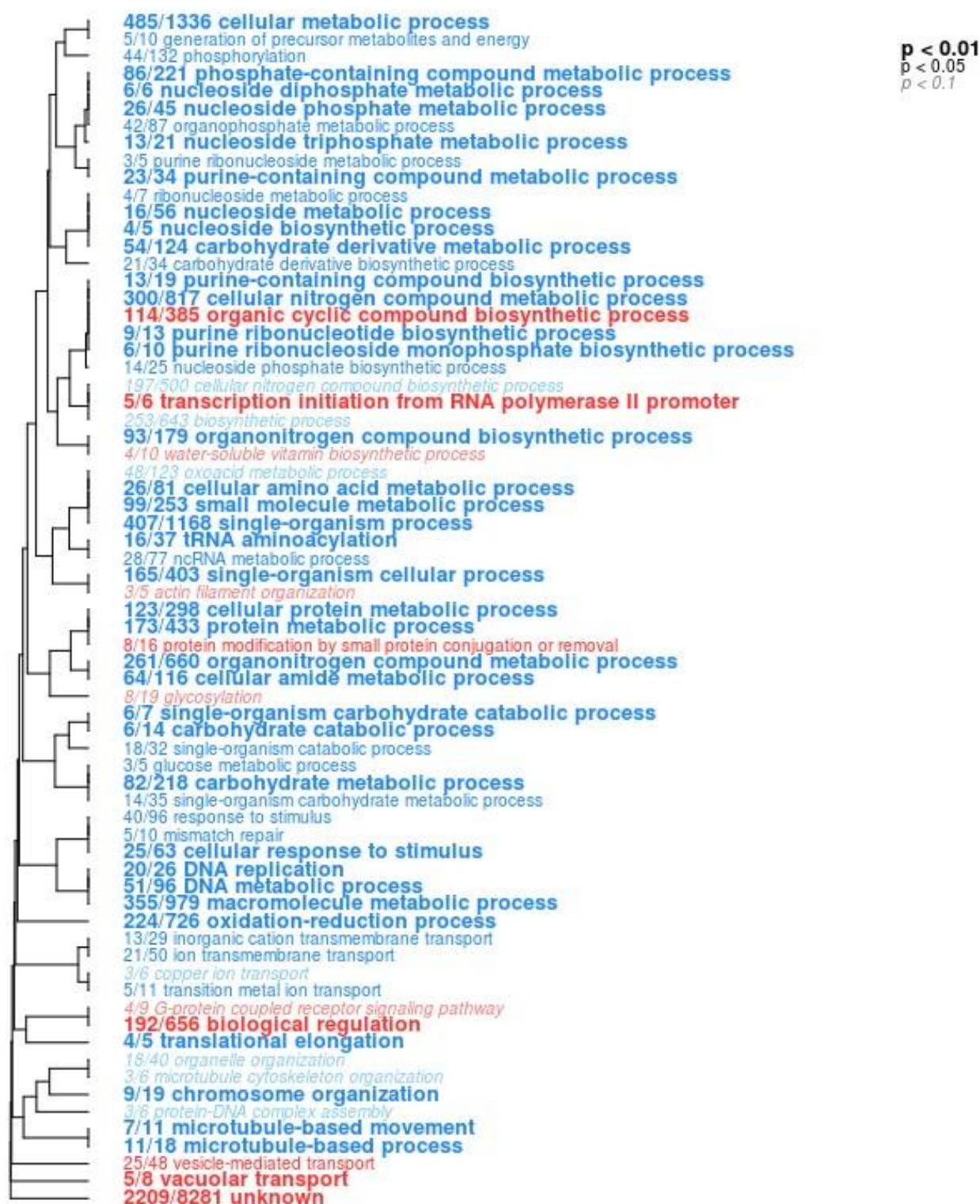


Figura 15. Análise de enriquecimento dos GO diferenciais da condição 3,0 mg/mL. Em vermelho são as categorias referentes aos processos biológicos induzidas e em azul, as reprimidas. A árvore mostra a relação entre as categorias. Os números adjacentes aos nomes das categorias do GO representam: números de genes diferencialmente expressos incluídos na categoria/número de genes totais de *T. harzianum* incluídos nessa categoria.

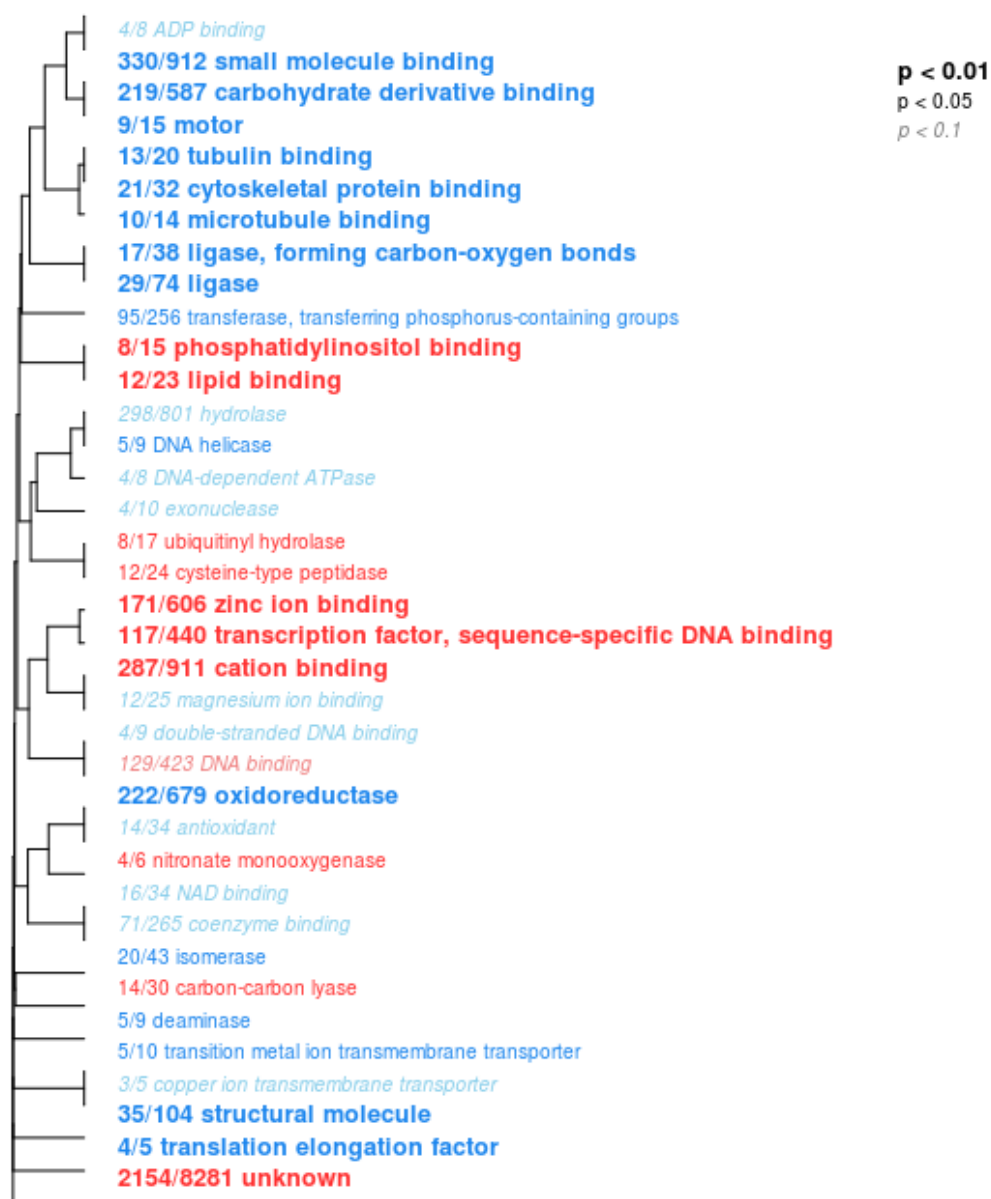


Figura 16. Análise de enriquecimento dos GO diferenciais da condição 1,5 mg/mL. Em vermelho são as categorias referentes às funções moleculares induzidas e em azul, as reprimidas. A árvore mostra a relação entre as categorias. Os números adjacentes aos nomes das categorias do GO representam: números de genes diferencialmente expressos incluídos na categoria/número de genes totais de *T. harzianum* incluídos nessa categoria.



Figura 17. Análise de enriquecimento dos GO diferenciais da condição 3,0 mg/mL. Em vermelho são as categorias referentes às funções moleculares induzidas e em azul, as reprimidas. A árvore mostra a relação entre as categorias. Os números adjacentes aos nomes das categorias do GO representam: números de genes diferencialmente expressos incluídos na categoria/número de genes totais de *T. harzianum* incluídos nessa categoria.

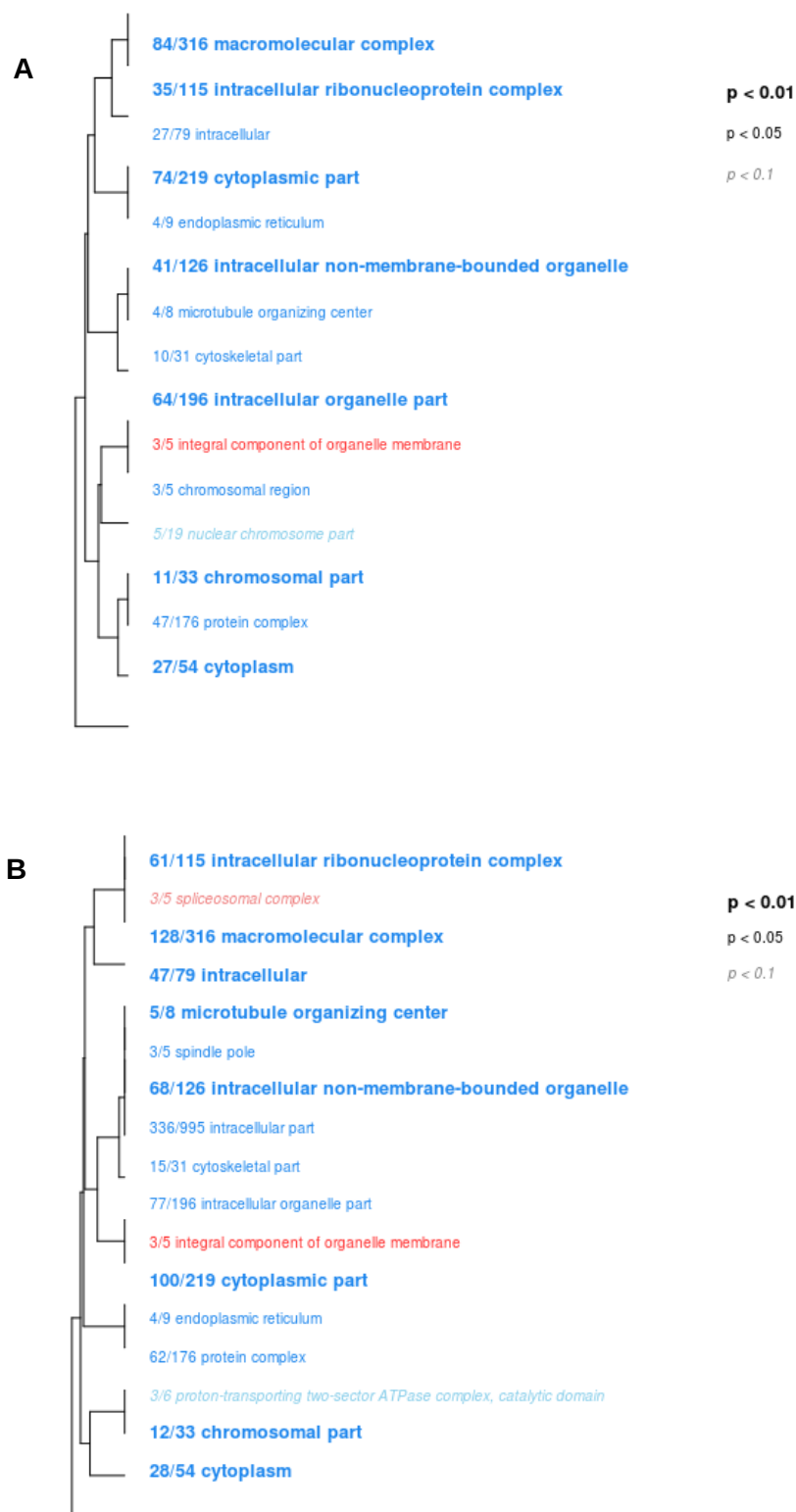


Figura 18. Análise de enriquecimento dos GO diferenciais da condição 1,5 mg/mL (A) e 3,0 mg/mL (B). Em vermelho são as categorias referentes aos componentes celulares induzidas e em azul, as reprimidas. A árvore mostra a relação entre as categorias. Os números adjacentes aos nomes das categorias do GO representam: números de genes diferencialmente expressos incluídos na categoria/número de genes totais de *T. harzianum* incluídos nessa categoria.

6. DISCUSSÕES

Os metais presentes no solo são necessários para o desenvolvimento de plantas e microrganismos, no entanto, concentrações muito baixas ou elevadas podem limitar o crescimento de ambos, uma vez que interfere em seus processos metabólicos (GADD, 1978).

Fungos possuem a capacidade de alterar as respostas das plantas às condições de solo estressantes. Além de seu papel na aquisição de nutrientes, os fungos alteram as relações entre as plantas e os solos, tais como a disponibilidade de alumínio (LEYVAL *et al.* 1997; RUFYIKIRI 2000; LUX e CUMMING 2001; CUMMING e NING 2003). A tolerância a metais pode variar de acordo com a presença de uma ou mais estratégias de mecanismos de resistência apresentados em cada fungo (BABICH e STOTZKY, 1985). Para avaliar se *T. harzianum* possui tolerância ao alumínio, metal abundante em solos do cerrado, avaliamos o crescimento desse fungo em concentrações crescentes de cloreto de alumínio.

Observamos que dentre as concentrações utilizadas, *T. harzianum* apresentou boa tolerância às concentrações de 0,1 a 0,5 mg/mL de AlCl_3 em meio BDA, que não interferiram significativamente no crescimento do fungo mesmo após 144 h (6 dias) de tratamento. *T. harzianum* diminuiu seu crescimento apenas após ser submetido às concentrações de 1,0 e 2,0 mg/mL de AlCl_3 . Mesmo quando avaliamos as maiores concentrações de alumínio que interferiram no crescimento de *T. harzianum*, observamos que o fungo apresenta capacidade de recuperação. Isso foi verificado pois a diminuição do crescimento do fungo após 72 h de tratamento com 1 mg/mL de alumínio não foi constatada após 96 h de tratamento, indicando que *T. harzianum* se adaptou e reestabeleceu seu crescimento. *T. harzianum* tem sido listado frequentemente entre os fungos mais eficientes em bioabsorção e tolerância a metais (AKTHAR & MOHAN, 1995; BOSSHARD *et al.*, 1996; VOLESKY, 2001; GADD, 1993, BRIERLEY, 1990; KATAYAMA & MATSUMURA; ZAFAR *et al.*, 2007).

Embora tenhamos observado que as menores concentrações de alumínio (0,1 e 0,5 mg/mL AlCl_3) não interferiram no crescimento micelial radial de *T. harzianum*, detectamos alterações morfológicas que diferem do crescimento normal do fungo. Essas alterações consistiram em modificação na coloração do meio de cultura e na esporulação do fungo. A síntese e difusão de diferentes metabólitos, produzido por

algumas espécies em certos meios de cultura, podem influenciar a coloração do meio sólido variando do amarelo ao marrom. Já a cor do micélio é normalmente devida à pigmentação e densidade dos conídios, podendo ser ainda influenciada pelos componentes do meio, como o pH (CORABI-ADELL, 2014). No processo de antibiose, *Trichoderma* pode liberar metabólitos secundários, tais substâncias consistem em inibir o desenvolvimento de agentes externos frente uma ameaça para o fungo (BOMFIM *et al.*, 2010; VELAZQUEZ-ROBLEDO *et al.*, 2011). Desta maneira, o mecanismo celular que permite a adaptação de *T. harzianum* ao alumínio pode ter como consequência a liberação de metabólitos que estariam alterando sua morfologia e as condições do meio de cultura.

Além disso, constatamos que o meio de cultura influencia o crescimento de *T. harzianum*, pois quando AlCl_3 foi adicionado ao meio MYG, verificamos ausência no crescimento do fungo, o que não foi detectado quando utilizamos o meio BDA. Essa maior tolerância de *T. harzianum* ao alumínio em meio BDA pode ser devido à atuação de grânulos de amido como quelantes de metal, influenciando a disponibilidade do alumínio para as células do fungo. Ainda assim, BDA tem sido um meio de cultura utilizado para estudos de tolerância a metais em fungos do gênero *Trichoderma* (SIDDIQUEE *et al.*, 2013).

Para avaliar a tolerância de *T. harzianum* a AlCl_3 , utilizamos além do crescimento em placas, o método de crescimento em meio líquido. De acordo com ALVES; PEREIRA (1989); HARTLEY (1997), estudos realizados em cultura pura são uma ferramenta importante para o estudo da relação fungo-metal, principalmente quando realizado em meio líquido, facilitando a avaliação da tolerância destes aos metais pesados. Observamos que quando crescido em meio BDA *T. harzianum* apresentou tolerância significativa ao alumínio até a concentração 1,25 mg/mL, diminuindo o crescimento em resposta ao tratamento com alumínio a partir da concentração de 1,5 mg/mL. No meio MYG *T. harzianum* apresentou crescimento satisfatório até 0,1 mg/mL, diminuindo seu crescimento nas concentrações de 0,2 a 0,5 mg/mL. No meio MEX, o crescimento foi similar nas concentrações de 0 a 0,5 mg/mL, diminuindo significativamente o crescimento em concentrações acima de 1,0 mg/mL.

Os resultados encontrados neste trabalho, comprovam que *T. harzianum* apresenta tolerância significativa a AlCl_3 , possuindo capacidade de estabelecer crescimento em concentrações mais elevadas principalmente em meio BDA. *T. atroviride* também apresenta boa tolerância a metais, ERRASQUIN e VÁZQUEZ (2003) sugeriram que esta resistência esta relacionada com uma elevada concentração de fonte de carbono que leva a um processo de desintoxicação e conduz a diminuição de metal na parede celular do fungo.

Os mecanismos de captação de metal por fungos vivos abrangem três processos diferentes: captação extracelular através de troca iônica, acumulação intracelular e o aprisionamento de partículas ricas em íons metálicos. A captação de íons de Al^{3+} por *T. harzianum* é um mecanismo importante devido ao fato desse metal interferir em vários processos físicos e celulares, sua toxicidade pode induzir aberrações nos cromossomos e aumentar a quantidade de micronúcleos, além de provocar diminuição no numero de células mitóticas, inibindo a divisão celular, sendo prejudicial tanto para o ambiente quanto para humanos (KOCHIAN, 2005; TING & CHOONG, 2009; JAWORSKA, 2007).

Outros efeitos tóxicos dos metais podem ser: redução do conteúdo de água, alteração na produção de pigmentos, alteração na permeabilidade da membrana plasmática, indução a peroxidação dos lipídios da membrana, produção de radicais livres que danificam a estrutura da célula, proteínas e DNA e atividade mitocondrial levando a um estresse oxidativo (NAGAJYOTI *et al*, 2010).

Mesmo *T. harzianum* apresentando boa tolerância a alumínio, algumas alterações podem ser observadas como inibição de crescimento em altas concentrações de metal. Estudos demonstram também que a presença de metais pode causar alteração nas quantidades de enzimas e metabólitos secretados (KREDCS *et al*, 2001a; KREDCS *et al*, 2001). No presente trabalho pudemos verificar que a presença de alumínio inibe a secreção de proteínas, principalmente no meio MYG.

Para verificar como *T. harzianum* responde ao estresse causado pelo alumínio analisamos o perfil de expressão gênica em resposta à esse metal. Avaliamos por RNAseq os genes diferencialmente expressos em resposta à duas concentrações de alumínio, 1,5 e 3,0 mg/mL. A maioria dos genes diferencialmente expressos em

resposta ao tratamento com 1,5 mg/mL de alumínio também foram diferencialmente expressos em resposta ao tratamento com 3,0 mg/mL. Esses dados indicam que as concentrações de alumínio estudadas não foram determinantes para promover uma resposta diferenciada, sugerindo que existe um grupo de genes que são induzidos/reprimidos em resposta ao metal, independente da concentração.

Dentre os processos biológicos que apresentaram enriquecidos nos genes induzidos por alumínio (1,5 e 3,0 mg/mL), observamos o aumento de categorias que compreendem proteínas envolvidas em modificações pós traducionais, como a Glicosilação, na biossíntese de compostos orgânicos cíclicos, na modificação de proteínas por conjugação de pequenas proteínas (ubiquitinação), na iniciação da transcrição a partir de promotores da RNA Polimerase II, na regulação biológica mediada por proteína G e no transporte vacuolar.

Esses dados mostram que um dos mecanismos de resposta ao alumínio é a alteração na expressão gênica, através do aumento da quantidade de determinados fatores de transcrição de resposta a estresse, além da indução de genes envolvidos em sinalização celular mediada por proteína G. Aumento em genes envolvidos com transporte vacuolar também é um mecanismo importante de resposta ao alumínio. Proteínas transportadoras foram bastante expressas e estão relacionadas com a compartimentação de metais no interior da célula, sendo acumulado principalmente na biomassa fúngica e colaborando assim para o mecanismo de tolerância (RASPANTI *et al*, 2009).

No basidiomiceto *Laccaria bicolor* foi observado o acúmulo de alumínio em polifosfatos de vacúolo de micélio crescido na presença do metal (MARTIN *et al.*, 1994). Um estudo realizado por FREITAS *et al*, (2011), relata a potencial absorção de polifosfatos por *T. harzianum*, onde esta capacidade estaria relacionada com a remoção de metais. O alumínio interage preferencialmente com ligantes doadores de oxigênio que, sendo aniônicos, balanceiam a carga positiva desse cátion. Em ambientes biológicos, os grupos carboxilato e fosfato, fosfato inorgânico, citrato, polifosfato, nucleotídeos e polinucleotídeos preenchem este requisito (MACDONALD & MARTIN, 1988).

A presença de alumínio leva à acidificação do meio afetando a homeostase de íons e a estrutura/função de macromoléculas. A toxicidade do alumínio advém da sua capacidade de também se ligar a componentes de membrana, enzimas ou seus

substratos, além de atuar substituindo o magnésio em reações enzimáticas. Foi descrita ainda a capacidade do alumínio de inibir o transporte de íons e de se ligar à molécula de DNA e ATP (PIÑA e CERVANTES, 1996). Devido a essas características, vários processos celulares são afetados tais como: transporte através de membranas, processos enzimáticos e metabólicos, replicação e transcrição, bem como processos dependentes de ATP (PIÑA e CERVANTES, 1996).

De fato, observamos a repressão de vários genes codificando proteínas associadas a processos celulares importantes para o crescimento de *T. harzianum*. Dentre eles encontram-se processos metabólicos proteicos, processos metabólicos de síntese de nucleotídeos, processos metabólicos de síntese de aminoácidos, processos metabólicos de carboidratos, processos metabólicos de replicação de DNA e processos baseados em microtúbulos. Nossos dados corroboram outros já descritos na literatura sobre o efeito do alumínio em fungos. ZEL *et al*, (1993) relataram que o alumínio modifica a dinâmica da membrana no fungo micorrízico *Amanita muscaria* causando uma diminuição na proporção de domínios de membrana menos ordenados.

Nesse trabalho verificamos que células de *T. harzianum* expostas ao alumínio apresentaram baixa secreção de proteínas, comparado ao controle. Esses dados, foram complementados com os dados de expressão gênica, onde observamos a repressão de genes envolvidos em síntese de proteínas e aminoácidos, evidenciando o efeito prejudicial do alumínio em *T. harzianum*.

Embora o alumínio apresente várias características tóxicas para a célula, ainda assim *T. harzianum* apresentou boa tolerância a esse metal, sendo capaz de alterar o perfil de expressão de seus genes promovendo seu crescimento nessa condição de estresse. As explicações dos mecanismos de tolerância ao alumínio nos organismos vivos incluem aqueles que propõem que algumas células sejam capazes de extrudir o alumínio do citoplasma ou que as células excretem substâncias que quelam o alumínio extracelularmente (PIÑA e CERVANTES, 1996).

7. CONCLUSÕES

Com base nas análises efetuadas a cerca da resistência de *T. harzianum*, é possível observar que esta espécie apresenta tolerância significativa ao alumínio, exibindo crescimento em altas concentrações deste metal, no entanto, extremas concentrações podem interferir no seu crescimento e secreção de proteínas.

Observamos uma significativa mudança no perfil de expressão dos genes de *T. harzianum* em resposta ao estresse por alumínio, promovendo uma adaptação e tolerância em resposta à esse metal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelatey, LM, Khall, WKB, ALI, TA. Mahrous, KF. Heavy metal resistance and gene expression analysis of metal resistance genes in Gram-positive 10 and Gram-negative bacteria present in Egyptian soils. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation*, Surabaya, v.6, n.2, p. 201–211, 2011.

Agrios, GN. *Plant Pathology*. San Diego: Academic Press. P. 635, 1997.

Akthar, MN, Mohan, PM. Bioremediation of toxic metal ions from polluted lake waters and industrial effluents by fungal biosorbent. *Current Science* 69, 1028±1030, 1995.

Allabouvette, C, Steinberg, C. The soil as a reservoir for antagonists to plant diseases. In: Wilenbergh, J. Hokkanen, HMT, eds. *An ecological and societal approach to biological control*. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 123-144, 2006.

Al-Asheh, S., Duvnjak, Z. Adsorption of copper and chromium by *Aspergillus carbonarius*. *Biotechnology Progress* 11, 638±642, 1995.

Alves, SB, Pereira, RM. Produção de fungos entomopatogênicos. In: Alves, SB, Lopes, RB. (Eds). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, p.845-870, 1998.

Alexopoulos, C J, MIMS, CW, Blackwell, M. - *Introductory Mycology*. New York, John Wiley e Sons publishers, p, 233, 1996.

Almeida, FBR. et al. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: Evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology letters*, v. 29, n. 8, p. 1189–1193, 2007.

Andrade, LCR, Felicori, TC, Marques, EAG, Chagas, CS. Avaliação da Qualidade do Solo na Bacia do Córrego Palmital, Viçosa – MG. *Revista de Geografia*, Juiz de Fora, v. 9, p. 7-22, 2013.

Axelsen KB, Palmgren MG. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol* 46:84–101, 1998.

Bailão, AM. Análises transcricionais no estudo de expressão gênica de *Paracoccidioides brasiliensis* em condições que mimetizam nichos do hospedeiro. 2008. 95 f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Universidade Federal de Brasília, Brasília, DF, 2008.

Benítez, T, Rincón, AM, Limón, MC. e Condón, AC. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7, 4: 249-260, 2004.

Bettiol, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. (Org.) *Controle biológico de doenças de plantas*. Brasília, Embrapa, p.1-5, 1991.

Bisinoti MC, Yabe MJS, Gimenez SMN. Avaliação da influência de metais pesados no sistema aquático da bacia hidrográfica da cidade de Londrina PR. Revista Analítica 8: 22-27, 2004.

Bono, JAM, Macedo, MCM, Torneira, CA. Qualidade física do solo em um latossolo vermelho da região sudoeste dos cerrados sob diferentes sistemas de uso e manejo. Viçosa, MG. fev. 2012/ mar.2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S01006832013000300021&script=sci_arttext>. Acesso em: 15 abr. 2017.

Bonfim, MP. et al. Avaliação antagônica in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. Summa Phytopathologica [online] vol.36, n.1, p. 61-67, 2010.

Bridges, EM. Dealing with contaminated soils. Soil Use Mgmt., 7, 151-8, 1991.

Bosshard, P, Bachofen, R, Brandl, H. Metal leaching of y ash from municipal waste incineration by *Aspergillus niger*. Environmental Science and Technology 30, 3066±3070, 1996.

Bullard, J, Purdom, E, Hansen, K., Durinck, S. & Dudoit, S. Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. BMC Bioinformatics, 11, 94. 2010.

Cai, L, XU, Z, Bao, P, HE, M, Dou, L.; Chein, L, Zhou, Y.; Zhu, Y. Multivariate and geostatistical analyses of the spatial distribution and source of arsenic and heavy metals in the agricultural soils in Shunde, Southeast China. Journal of Geochemical Exploration, New York, v. 148, p. 189-195, 2015. doi: 10.1016/j.gexplo. 09.010, 2014.

Camargo, OA & Furlani, PR. Alumínio no solo: concentração, especiação e efeito no desenvolvimento radicular. In: SIMPÓSIO AVANÇADO DE SOLOS E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 2., Piracicaba, 1989. Anais. Campinas, Fundação Cargill, p. 45-69, 1989.

Carlile, MJ & Watkinson, SC. The Fungi. Tokyo, Academic press. Briefly CL. 1990 In: Ehrlich HL, Brierley CL, eds. *Microbial Mineral Recovery*. New York: McGraw-Hill; 303-323, 1996.

Cetesb – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Qualidade do solo Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/qualidade-do-solo/42-qualidade-do-solo>>. Acesso em: 8 abr. 2017.

Chet, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil*, 235: 235–242, 2001.

Corabi-Adell, C. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (HYPOCREALES – FUNGI) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica. 2014. 220f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, UNESP. Rio Claro, SP, 2014.

Costa, FXX, Beltrão, NMEM, Silva, FEA, Filho, JSMM, Silva, MAS. Disponibilidade de nutrientes no solo em função de doses de matéria orgânica no plantio da mamona. Revista Verde, Mossoró, v.5, p. 204 – 212, 2010.

Cumming, JR, NING, N. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance aluminum resistance of broomsedge (*Andropogon virginicus*L.). *J Exp Bot* 54:1447–1459, 2003.

Danielson, RM, Davey, CB. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil Biol. Biochem.* v. 5, p. 495-504, 1973.

Druzhinina, IS, Seidl-Seiboth, V, Herrera-Estrella, A, Horwitz, BA, Kenerley, CM, Monte, EI, Mukherjee, PK., Zeilinger, S., Grigoriev, IV., Kubicek, CP: *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature*, 9(10):749-759, 2011.

Druzhinina, I, Kubicek, CP. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *Journal of Zhejiang University Science*, v. 6, p. 100–112, 2005.

Ensinas, SC, Marchetti, ME, Silva, Ef, Potrich, DC, Martinez, MA. Atributos químicos, carbono e nitrogênio total em latossolo submetido a diferentes sistemas de uso do solo. *Global Science and Technology*, Rio Verde, v. 7, p. 24-36, 2014.

Errasquin LE, Vazquez C. Tolerance and uptake of heavymetals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. *Chemosphere*, 50(1):137–143, 2003.

Ferreira, ME, Cruz, MCP, RAIJ, BV, Abreu, CA. Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura. Ribeirão Preto: Ed. Legis Summa, 2001.

Ferraz, ALJ. *Ánálise da expressão gênica no músculo esquelético de bovinos das raças nelore e aberdeen angus e sua relação com o desenvolvimento muscular e a maciez da carne.* 2009. 96 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, São Paulo, SP, 2009.

Filho, MRC, Mello, SCM, Santos, RP e Menêzes, JE. Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético *in vitro* e colonização endofítica de mudas de eucalipto. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento*, 226. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.

Filizola, HF, Manoel, D, Gomes, MAF. Amostragem de solos para análises de metais pesados. Cap. 3. In: *Manual de procedimentos de coletas de amostras em áreas agrícolas para análise da qualidade ambiental: solo, água e sedimentos.* Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006.

Freitas LA, de Moura GF, de Lima MAB, de Souza PM, de Silva CAA, de Campos Takaki GM, do Nascimento AE. Role of the morphology and polyphosphate in *Trichoderma harzianum* related to cadmium removal. *Molecules* 16:2486–2500, 2011.

Gadd GM, Griffith A J. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microb Ecol* 4:303-317, 1978.

Gadd, GM. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia* 46, 834–840, 1990.

Gadd, GM. Tansky review no. 47 ± Interactions of fungi with toxic metals. *The New Phytologist* 124, 25 ± 60, 1993.

Garg, UK, Kaur, MP.; Sud, D, Garg, VK. Removal of hexavalent chromium from aqueous solution by adsorption on treated sugarcane bagasse using response surface methodological approach. *Desalination*, Amsterdam, v. 249, p. 475–479, 2009.

Gene Ontology. Disponível em: <<http://www.geneontology.org/>> Acessado em 23 de ago. 2017

Gómez I, Chet I, Herrera-Estrella A. Genetic diversity and vegetative compatibility among *Trichoderma harzianum* isolates. *Molecular and General Genetics*; 256: 127-135, 1997.

Griffin, DH. Fungal physiology. John Wiley e Sons Incorporation Publishers. p. 458, 1994.

Grigoriev, IV et al. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. *Nucleic acids research*, v. 40, n. Database issue, p. D26–32, 2012.

Hutchinson TC, Symington MS. Persistence of metal stress in a forested ecosystem near Sudbury, 66 years after closure of the O'Donnell roast bed. *Journal of Geochemical Exploration*, New York, v. 58, p. 323-330, 1997.

Hayden EC. Genome sequencing: the third generation. *Nature*. 457: 769. 2009.

Harman, GE, Howell, CR, Viterbo, A, Chet, I. e Lorito, M. (2004a) – *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 43–56. SALES, C. Medicina Funcional integrativa. Disponível em: <www.cristinasales.pt/pt-pt/Medicina-Integrada/Texts/Text.aspx>. Acessado em 28 dez. 2013.

Harman, GE, Howel, CR, Viterbo, A, Chet, I, Lorito, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature review Microbiology*, v.02, p.43-56, 2004.

Harmanescu M, Liana, MA, Despina, MB, Ioan, G, Iosif, G. Heavy metals health risk assessment for population via consumption of vegetables grown in old mining area; a case study: Banat County,Romania. *Chemistry Central Journal*, London, v. 5, p.1-10, 2011.

Hartley, J, Cairney, JWG & Meharg, AA. Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment? *Plant Soil*, 189:303-319, 1997.

Hjeljord, LG, Tronsmo, A. Effect of germination initiation on competitive capacity of *Trichoderma atroviride* P1 conidia. *Phytopathology*, v. 93, p.1593–1598, 2003.

Hoffmann, E, Strootbart, V. Mass spectrometry: principles and applications. 3. Ed. West Sussex, England: Wiley-Interscience, p. 502, 2007.

Howell, CR, Mechanisms Employed by *Trichoderma* species in the Biological Control of Plant Disease: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*, 87, 1: 4-10, 2003.

Jaworska M, Dluzniewska J. The effect of manganese ions on development and antagonism of *Trichoderma* isolates. *Pollish Jenviron Stud*;16(4):549–553, 2007.

JGI Genome Portal. *Trichoderma harzianum*. Disponível em: <<https://genome.jgi.doe.gov/Trihar1/Trihar1.info.html>> Acesso em: 23 de ago. 2017.

Joeniarti, E, Matuzahroh, N, Kusrinningrum. Tolerance of *Trichoderma asperellum* Isolates to Chemical Fungicide and Their Antagonistic Activity against *Phytophthora infestans*. *International Journal of Plant & Soil Science*, v. 3, nº 1, p. 36-46. 2013.

Kacprzak, M. and Malina, G. (2005) The tolerance and Zn²⁺, Ba²⁺ and Fe²⁺ accumulation by *Trichoderma atro- viride* and *Mortierella exigua* isolated from contaminated soil. *Canadian Journal Soil Science*, 85, 283-290, 2005.

Khall, SK, Shah, MA, Naeem, M. Laboratories studies on the compability of the entomophatogenic fungus *Verticillium lecanii* whit certain pesticides. *Agriculture, Ecosystems, and Environment*, Amsterdam, v 13, n. 3 /4, p. 329-334, 1985.

Kapoor, A. and Viraraghavan, T. Biosorption of heavy metals on *Aspergillus niger*: Effect of pretreatment. *Bioresource Technology*, 63, 109-113, 1998.

Kapoor, A., Viraraghavan, T., Cullimore, D.R. Removal of heavy metals using fungus *Aspergillus niger*. *Biores. Technol.* 70, 95–104, 1999.

Khosravi F, Savaghebi GH, Farah Bakhsh H: Effect of Potassium chloride on Cd uptake by colza in a polluted soil. *Water Soil J*, 23:28–35, 2009.

Katayama A, Matsumura F. Photochemically enhanced microbial degradation of environmental pollutants. *EnvironSci Technol*;25:1329–1333, 1991.

Kochian LV, Piñeros MA, Hoekenga OA. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant and Soil* 274: 175-195, 2005.

Kommedahl, T. and C. E. Windels. Root, stalk, and ear-infecting *Fusarium* species on corn in the Usa, p. 94-103. In: P.E. Nelson, T.A. Toussoun, and R. J. Cook (eds). *Fusarium: Disease, biology, and taxonomy*. Peann. State Univ. Press, University Park, 1981.

Krastanov, A, Alexieva, Z, Yemendzhiev, H. Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. *Engineering in Life Sciences*, Weinheim, v. 13, n.1, p. 76-87, 2013.

Kredics L, Antal Z, Doczi I, Manczinger L. Effect of heavy metal on growth and extracellular enzyme activity of mycoparasitic *Trichoderma* strains. *Bull Environ Contam Toxicol*; 66:249–354. 12, 2001.

Kredics L, Antal Z, Manczinger L, Nagy E. Beading of mycoparasitic *Trichoderma* strains for heavy metal resistance. *Lett Appl Microbiol.*;33:112–116, 2001.

Kovacevic, FZ, Sipos, L, Briski, F. Biosorption of chromium, copper, nickel and zinc ions onto fungal pellets of *Aspergillus niger* 405 from aqueous solutions, *Food Technology and Biotechnology*, v. 38, n. 3, 211-216, 2000.

Kuçük, C, Kivanç, M, Kinaci, E, Kinaci, G. Determination of the growth and solubilization capabilities of *Trichoderma harzianum* T1. *Biologia*. v. 63 (2). p. 167-170. 2008.

Kulling, CM. March, RL, Lorito, M & Kbicek, CP. Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (*T.harzianum*) to *Rhizoctonia solani* is a Prerequisite for Triggering of *Trichoderma ech42* Gene Expression before mycoparasitic contact. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000.

Kmar, A, Bisht, BS, Joshi, VD, Dhewa, T. Review on bioremediation of polluted environment: A management tool. *International Journal of Environmental Sciences*, Jaipur, v.1, n.6, p. 1079-1093, 2011.

Kumar CS, Sivarama Sastry K, Maruthi Mohan P. Use of wild type and nickel resistant *Neurospora crassa* for the removal of Ni ²⁺ from aqueous medium. *Biotechnol Lett* 14, 1099 1102, 1992.

Kumar R, Bishnoi NR, Garima K: Biosorption of Chromium (VI) from aqueous solution and electroplating wastewater using fungal biomass. *Chem Eng J.*, 135:202–208, 2008.

Latge, JP. The Cell Wall: a carbohydrate armour of the fungal cell. *Molecular Microbiology*, 66: 279-290, 2010.

Leyval C, Joner . Bioavailability of heavy metals in the mycorrhizosphere, In G.R. Gobran, W.W. Wenzel, E. Lombi (Eds.), *Trace elements in the rhizosphere*. CRC, Boca Raton, FL. p. 165-185. 2001.

Leyval C, Turnau K, Haselwandter K. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: Physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza*, 7: 139–153. 1997.

Lima, VF, Merçon, F. Metais pesados no ensino da química. *Rev. Quim. Nova na Escola*, v. 33, n. 4, p. 2011. Disponível em: <nesc.sbq.org.br/online/qnesc33_4/199-CCD-7510.pdf>. Acessado em 20 dez. 2016.

Lima, AST. Variabilidade espacial de cádmio, chumbo, cobre, níquel e zinco em um Latossolo tratado como lodo de esgoto por treze anos consecutivos. 2011. 56f. Tese (Doutorado em Agronomia- Ciência do Solo)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

Lopes, RB. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. *In: Bettiol, W. e Morandi, M.A.B. (Ed.) - Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, p. 15–28, 2009.

Lorito, M. et al. Translational research on trichoderma: from 'omics to the field. *Annual review of phytopathology*, v. 48, p. 395–417, jan. 2010.

Lux HB, Cumming JR. Mycorrhizae confer aluminum tolerance to tulip-poplar seedlings. *Can J For Res* 31:694–702. 2001.

Macdonald TL, Martin RB. Aluminium ion in biological systems. *Trends Biochem Sci* 13, 15–19, 1988.

Martin F, Rubini P, Cote R, Kottke I. Aluminum polyphosphate complexes in the mycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*: a ²⁹Al nuclear magnetic resonance study. *Planta* 194, 241–246, 1994.

Maruthi Mohan P, Sivarama Sastry K. Interrelationships in trace element metabolism in metal toxicities in nickel-resistant strains of *Neurospora crassa*. *Biochem J* 212, 205–210, 1983.

McBeath, J, & Adelman, M. Taxonomy of a new *Trichoderma* found in Alaska. *Abstract. Phytopathology*, Saint Paul, v. 81, n. 10, p. 1151, 1991.

McBride, MB. Toxic metals in sewage sludge-amended soils: has promotion of beneficial use discounted the risks. New York: *Advances in Environmental Research*, Elsevier Science, 2003. Disponível em: <http://www.sourcewatch.org/images/2/22/McBride_Toxic_Metals_in_Sludge.pdf>. Acesso em: 16 dez. 2016.

Melo, IS. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. *In: Bettiol, W. (Org.) - Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna, Embrapa - CNPDA, p.135–156, 1991.

Melo, IS. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 4: 261–295, 1996.

Melo, IS. e Costa FG. *Desenvolvimento de uma formulação granulada a base de Trichoderma harzianum para o controle de fitopatógenos*. Jaguariúna, Embrapa, p. 1–4. (Comunicado técnico 31), 2005.

Mohsenzade F, Chehregani A, Akbari M: Evaluation of oil removal efficiency and enzymatic activity in some fungal strains for bioremediation of petroleum polluted soils. *Iran J Environ Health Eng*, 9:26–34, 2012.

Mohsenzadeh F, Nasser S, Mesdaghiniam A, Nabizadeh R, Zafari D, Khodakaramian G, Chehregani A: Phytoremediation of petroleum polluted soils: Application of *Polygonum aviculare* and its root-associated (penetrated) fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. *Ecotoxicol Environ Saf*, 73:613–619, 2010.

Morandi, MAB. e Bettiol, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: Bettiol, W; Morandi, M.A.B. (Ed.). *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, p.07-14, 2009.

Myrold, DD. & Nason, G. E. (1992). Effect of acid rain on soil microbial processes. In *Environmental Microbiology*, pp. 59–82. Edited by R. Mitchell. New York: Wiley
Godoy, C.V.; Koga, L.J.; Canteri, M.G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira*, v.31, p.63-68, 2006.

Nagajyoti, PC, Lee, KD, Sreekanth, TVM. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, Alemanha, v. 8, p. 199-216, 2010.

Nur Liyana, I, Nur Ain Izzati, MZ. and Tan, SG. Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem. *Journal of Environmental Science*, **23**, 824-830, 2011.

Papavizas, GC. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual Reviews of Phytopathology* v. 23, p. 23-54. 1985.

Pumja, ZK, Utkhede, RS. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotechnology* 21:400-4007, 2003.

Pinã, RG, e Cervantes, C. Microbial interactions with aluminium. *Biometals*. v. 9, p. 309-316. 1996.

Raspanti E, Cacciola SO, Gotor C, Romero LC, Garcia I. Implications of cysteine metabolism in the heavy metal response in *Trichoderma harzianum* and in three *Fusarium* species. *Chemosphere* 76:48–54, 2009.

Ribeiro MAQ, Almeida AAF, Mielke MS, Gomes FP, Pires MV, Baligar VC. Aluminum effects on growth photosynthesis, and mineral nutrition of cacao genotypes. *Journal of Plant Nutrition* 36: 1161-1179, 2013.

Roiger, TC, Jeffers, SN, Caldwell, RW. Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soil. *Soil Biology and Biochemistry*, Britain, v. 43, n4, p. 353-359, 1991.

Romeiro, RS. *Controle biológico de doenças de plantas – procedimentos*. Viçosa, Editora UFV, p. 172, 2007.

Rufykiril G, Declerk, S, Duffey, JE, Delvaux, B Arbuscular mycorrhizal fungi might alleviate Al toxicity in banana plants. *New Phytol* 148:343–352, 2000.

Samuels, GJ. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, v. 96, n. 2, p. 195–20, mar, 2006.

Santos, APA, Batista, SB. Isolamento e caracterização fenotípica de micro-organismos isolados de solo poluído por resíduos sólidos do bairro carrapicho município de Várzea Grande – Mato Grosso. *Connection Line*, Várzea Grande, v. 12, p. 29-43, 2015.

Santos, JS, Santos, MLP. Estudo da mobilização de metais e elementos traços em ambientes aquáticos do semiárido Brasileiro aplicando análises de componentes principais. *Química Nova*, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1107-1111, 2008.

Scherm, B. et al. Identification of potential marker genes for *Trichoderma harzianum* strains with high antagonistic potential against *Rhizoctonia solani* by a rapid subtraction hybridization approach. *Current genetics*, v. 55, n. 1, p. 81–91, 2009.

Shimada H, Tominaga N, Kohra S, Ishibashi H, Mitsui Y, Ura K, Arizono K. Metallothionein gene expression in the larvae of *Caenorhabditis elegans* is a potential biomarker for cadmium and mercury. *Trace Elem Electrolytes* 20:240–243, 2003.

Siddiquee, S, Aishah, SN, Azad, SA, Shafawati SN, Naher, L. Tolerance and biosorption capacity of Zn²⁺, Pb²⁺, Ni³⁺ and Cu²⁺ by filamentous fungi (*Trichoderma harzianum*, *T. aureoviride* and *T. virens*) *Advances in Bioscience and Biotechnology* Vol.4 No.4(2013), Article ID:30313,14 pages DOI:10.4236/abb, 44075, 2013.

Silva, APM. Expressão gênica associada à resistência da soja a *Piezodorus guildinii*. 2014. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciência. Área de concentração: Genética e melhoramento de plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo, SP, 2014.

Souza, FVP. Crescimento, teores, acúmulo e disponibilidade de níquel em gramíneas forrageiras. 2014. 59f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2014.

Srivista, S, Ahmad, AH, Thakur. I. S. Removal of chromium and pentachlorophenol from tannery e Zuentes, *Bioresource Technology*, v. 98, p. 1128-1132, 2007.

Steindorf, AS. et al. *Trichoderma harzianum* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in mycoparasitism against *Fusarium solani*. *Biological Control*, v. 61, n. 2, p. 134–140, maio 2012.

Schuster, A, Schomoll, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 87, n. 3, p. 787–99, jul. 2010b.

Templeton, EG, Heiny, DK, Improvement of fungi to enhance mycoherbicide potential. In: WHIPPS, J. M.; LUMSDEN, R. D. (Eds.). *Biotechnology of Fungi for*

Improving Plant Growth. [s.l.] Cambridge University Press, 1989. p. 127–151.

Ting ASY, Choong C.C. Bioaccumulation and biosorption efficacy of *Trichoderma* isolates SP2F1 in removing Copper(Cu II) from aqueous solutions. *World J Microbiol Biotechnol* ;25:1431–1437, 2009.

Topolovec-pintaric, S, Zutic, I, Dermic, E. Enhanced growth of cabbage and red beet by *Trichoderma viride*. *Acta agriculturae Slovenica*, v. 101, n. 1, p. 87–92, 1 jan. 2013.

Trushina, N. et al. Pac and pH-dependent transcriptome of the mycotrophic fungus *Trichoderma virens*. *BMC genomics*, v. 14, n. 1, p. 138, jan. 2013.

Veglio, F, Beolchini, F. Removal biosorption: a review, *Hydrometallurgy*, v.44, p.301-316, 1997.

Velazquez-Robledo, R, Contrerascornejo, HÁ, Manias-Rodriguez, L, Hernandez-Morales, A. et al. Role of the 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* in secondary metabolism and induction of plant defense responses. *Molecular Plant - Microbe Interactions*, v. 24, n. 12, p. 1459-1471, 2011.

Verna, M. et al. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, v. 37, n. 1, p. 1–20, 2007.

Vinale, F. et al. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 40, n. 1, p. 1–10, jan. 2008.

Viterbo, A. et al. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 81, n. 1-4, p. 549–56, ago. 2002.

Volesky, B, 1987. Biosorbents for metal recovery. *TIBTECH* 5, 96–101. Zetic, V.G., Thomas, V.S., Grba, S., Lutitsky, L., Kozlek, D, 2001.

Wang L, Li P, Brutnell TP. Exploring plant transcriptomes using ultra highthroughput sequencing. *Briefings in Functional Genomics*. 9: 118 – 128. 2010.

Wang, Z, Gertein, M, Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for Transcriptomics. *Nat. Reviews Genetics*, (10) 57-63, 2009.

Wijesinghe, C. J. et al. Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple caused by (*Thielaviopsis paradoxa*). *Crop Protection*, v. 30, n. 3, p. 300–306, mar. 2011.

Whipps, JM, Lumsden, RD. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: T., B.; C., J.; N., M. (Eds.). *Fungal Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. Wallingford: CABI Publishing, p. 9, 2001.

Xiezhi Y, Jieming C, Ming HM: Earthworm-mycorrhiza interaction on Cd uptake and

growth of ryegrass. *Soil Biol Biochem*, 37:195–201, 2005.

Yazdani, M, Chee, KY, Faridah, A. and Tan, S.G. An *in vitro* study on the adsorption, absorption and up- take capacity of Zn by the bioremediator *Trichoderma atroviride*. *Environmental Asia*, **3**, 53-59, 2010.

Zafar S1, Aqil F, Ahmad I. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresour Technol*. 2007 Sep;98(13):2557-61, Nov 17, Epub 2006.

Zhang, L., Zhao, L., Yu, Y., Chen, C. Removal of lead from aqueous solution by non-living *Rhizopus nigricans*. *Water Research* 31, 1437±1444, 1998.

Zel J, Stevek J, Crne H, Schara M. Effects of aluminum on membrane fluidity of the mycorrhizal fungus *Amanita muscarm*. *Physiol Plant* 89, 172 176, 1993.