

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

**CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DE UMA BIBLIOTECA DE  
cDNA DE *Trichoderma harzianum* CRESCIDO NA  
PRESENÇA DE PAREDE CELULAR DE *Fusarium solani***

*ANDREI STECCA STEINDORFF*

GOIÂNIA  
2010

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

**CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DE UMA BIBLIOTECA DE  
cDNA DE *Trichoderma harzianum* CRESCIDO NA  
PRESENÇA DE PAREDE CELULAR DE *Fusarium solani***

Dissertação apresentada ao programa  
de pós-graduação em Biologia do  
Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Goiás por  
Andrei Stecca Steindorff para obtenção  
do grau de mestre em Biologia

Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa  
Co-orientador: Roberto do Nascimento Silva

Goiânia  
2010

## **Banca Examinadora**

### **Titulares:**

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa – Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Eliane Ferreira Noronha – Instituto de Ciências Biológicas / Universidade de Brasília

Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho – Escola de Agronomia / Universidade Federal de Goiás

### **Suplentes:**

Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus - Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Raphaela de Castro Georg - Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Goiás

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço primeiramente a minha família por todo apoio durante minha formação acadêmica. Principalmente minha mãe que sempre foi e sempre será o esteio de minha vida. Agradeço à Lis por todo o companheirismo e apoio durante todo esse tempo ao seu lado.*

*Agradeço ao Prof. Dr. Cirano José Ulhoa pela oportunidade oferecida e orientação durante todo esse tempo. Pelos projetos e artigos que espero nunca faltar! Também agradeço pela amizade, paciência e calma que sempre nos ajuda a seguir em frente.*

*Agradeço também a todos os professores que me ajudaram a compreender melhor esse mundo da ciência, especialmente ao Prof. Dr. Eliane Ferreira Noronha, que me acolheu na UnB no início deste trabalho. Ao Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho que também me ajudou imensamente na parte de seqüenciamento e bioinformática.*

*Roberto do Nascimento Silva e Valdirene Neves Monteiro: Estes com certeza merecem um agradecimento especial por toda ajuda e amizade durante nosso tempo de convivência no Laboratório. Ao professor Roberto, muita sorte lá na USP, pois competência, sei que não falta. Agradeço também ao Marcelo Ramada pela amizade e caronas ao longo dos anos. Agradeço também a todos colegas de laboratório: Saulo, Vanessa, Patrícia, Fabiano, Amanda, Amanda, Raquel, Rogério e a todos que de alguma forma participaram e ajudaram na minha formação.*

*"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos."*

*(Albert Einstein)*

## SUMÁRIO

|                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>Resumo.....</i>                                                         | <i>1</i>  |
| <i>Abstract.....</i>                                                       | <i>2</i>  |
| <i>1. Introdução.....</i>                                                  | <i>3</i>  |
| <i>2. Objetivos da pesquisa.....</i>                                       | <i>12</i> |
| <i>3. Material e métodos.....</i>                                          | <i>13</i> |
| <i>3.1. Manutenção do fungo.....</i>                                       | <i>13</i> |
| <i>3.2. Produção de parede celular de F. solani.....</i>                   | <i>13</i> |
| <i>3.3. Indução do crescimento.....</i>                                    | <i>13</i> |
| <i>3.4. Extração de RNA total.....</i>                                     | <i>13</i> |
| <i>3.5. Isolamento dos mRNA e construção do banco.....</i>                 | <i>14</i> |
| <i>3.6. Análise do banco de cDNA.....</i>                                  | <i>16</i> |
| <i>3.7. PCR para verificação do tamanho médio dos insertos.....</i>        | <i>17</i> |
| <i>3.8. Seqüenciamento das ESTs.....</i>                                   | <i>18</i> |
| <i>3.9. Análise preliminar das seqüências e controle de qualidade.....</i> | <i>18</i> |
| <i>4. Resultados e discussão.....</i>                                      | <i>19</i> |
| <i>4.1. Construção do banco de cDNA.....</i>                               | <i>19</i> |
| <i>4.2. Características do banco de cDNA.....</i>                          | <i>20</i> |
| <i>4.3. Anotação funcional e análise das seqüências.....</i>               | <i>21</i> |
| <i>5. Conclusões.....</i>                                                  | <i>40</i> |
| <i>6. Perspectivas.....</i>                                                | <i>41</i> |
| <i>7. Referências bibliográficas.....</i>                                  | <i>42</i> |

## Resumo

Espécies do gênero *Trichoderma* são comercialmente aplicadas como agentes de controle biológico contra fungos patógenos de plantas. Sua ação é baseada em diferentes mecanismos como a produção de antibióticos voláteis e não-voláteis, competição por espaço e nutrientes e micoparasitismo. O mecanismo de biocontrole da interação entre *Trichoderma harzianum* e *Fusarium solani* ainda não foi explorado ao nível de transcriptoma. Este estudo buscou iniciar o desenvolvimento de uma base de dados de EST (Expressed Sequence Tags) para assim obter informações úteis nas sequências de *Trichoderma harzianum* e entender melhor as vias integradas do mecanismo de biocontrole. Uma biblioteca direcional de cDNA foi construída a partir do micélio de *Trichoderma harzianum* crescido em parede celular isolada de *Fusarium solani*. 3984 clones foram selecionados aleatoriamente, submetidos ao seqüenciamento da região 5' do vetor e identificados por similaridade contra a base de dados de seqüências de fungos GenBank. Dentre os 3984 clones, 40,8% mostraram similaridade com genes conhecidos e descritos na literatura. Análises dos genes identificados indicam similaridade com uma grande diversidade de genes que codificam para enzimas, proteínas estruturais e fatores de regulação. Uma proporção significativa dos genes identificados está envolvida com processos relacionados ao micoparasitismo (3,81%), como esperado para um fungo envolvido no controle biológico. Estes resultados mostram uma aplicação bem sucedida da análise de ESTs na interação entre

*Trichoderma harzianum* e *Fusarium solani* e dar uma sugetão da expressão gênica.

Palavras chave: *Trichoderma harzianum*, *Fusarium solani*, transcriptoma, micoparasitismo

## Abstract

Species of *Trichoderma* are commercially applied as biological control agents against plant fungal pathogens. Their action is based on a set of events, such as the production of antifungal metabolites, competition for space and nutrients and mycoparasitism. However the biocontrol mechanism of the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium solani* is not yet understood at the transcriptome level. This study aimed to initiate the preliminary development of an expressed sequence tag (EST) database for *Trichoderma harzianum* and thereby gain potentially useful information on *Trichoderma* gene sequences in order to elucidate the integrated biocontrol mechanism. Partial sequencing of anonymous cDNA clones is a widely used technique for gene identification. A directional cDNA library has been constructed from mycelium of *Trichoderma harzianum* grown on cell wall isolated from *Fusarium solani*. 3984 clones have been randomly selected, subjected to single-pass sequencing from the 5' end of the vector, and identified by sequence similarity searches against gene sequences in GenBank fungal database. Of the 3984 mycelium clones, 40.8% exhibit similarity to known genes. Analysis of the identified clones indicated sequence similarity to a broad diversity of genes encoding proteins such as enzymes, structural proteins, and regulatory factors. A significant proportion of genes identified were involved in processes related to mycoparasitism (3,81%), as would be expected in biocontrol fungus. These results present the successful application of EST analysis in the interaction of *Trichoderma harzianum* and *Fusarium solani* to provide a preliminary indication of gene expression.

Keywords: *Trichoderma harzianum*, *Fusarium solani*, transcriptome, micoparasitism

## 1 - Introdução

O gênero *Trichoderma* compreende um grupo de fungos filamentosos saprófitas de solo, encontrados sobre matéria orgânica em decomposição e na rizosfera de algumas plantas. Caracterizam-se por utilizarem uma grande variedade de compostos como fonte de carbono e nitrogênio, e serem resistentes a inibidores produzidos por outros microorganismos e tolerantes a diferentes tipos de fungicidas (PAPAVIZAS, 1985).

Com o trabalho pioneiro de Weindling (1932), constatando a capacidade de *Trichoderma lignorum* parasitar importantes patógenos de solo em cultura, vários trabalhos visando a utilização de espécies do gênero *Trichoderma* para fins de controle biológico de patógenos de plantas têm sido desenvolvidos (HARMAN, 2000; BENÍTEZ et al, 2004). Esse estímulo deve-se, principalmente, ao aumento da conscientização da opinião pública sobre os danos causados por pesticidas químicos ao ambiente, bem como sobre a possibilidade da presença de resíduos carcinogênicos nos alimentos (RAGSDALE & SISLER, 1994; GULLINO & KUIJPERS, 1994); além da constante preocupação quanto ao surgimento de patógenos resistentes aos fungicidas disponíveis no mercado (HJELJORD & TRONSMO, 1998).

Uma das alternativas à redução da aplicação de fungicidas químicos para o controle de doenças de plantas é a utilização de fungicidas à base de organismos biologicamente ativos (biopesticidas). Nesse sentido, as inúmeras estratégias de sobrevivência e proliferação de espécies de *Trichoderma*, como o rápido crescimento, produção de clamidósporos, capacidade de produzir antibióticos e atacar outros fungos, bem como sua elevada capacidade de

degradar carboidratos estruturais e não estruturais, o tornam de elevado interesse para fins de controle biológico. Uma vez que essas características ecológicas o possibilitam competir, colonizar e proteger importantes pontos de infecção do hospedeiro, como raízes, lesões e tecido em senescência (HJELJORD & TRONSMO, 1998). Por outro lado, é de conhecimento corrente entre pesquisadores que trabalham com controle biológico, que candidatos de elevado potencial para controle de patógenos em condições experimentais restritas, podem ser incapazes de produzir os mesmos resultados em condições de campo. Isso se deve ao fato de que as condições de armazenamento e aplicação são mais críticas para organismos biológicos, uma vez que estes estão mais sujeitos a reações diferenciais do hospedeiro e ambiente (CALLAN et al., 1997), fazendo com que se tenha uma eficácia de controle mais variável do que a obtida com fungicidas químicos (HARMAN, 1991). Essa característica (reação diferencial a fatores bióticos e abióticos) faz com que um passo fundamental no desenvolvimento de agentes de biocontrole seja o desenvolvimento de uma formulação apropriada, que vise superar limitações ambientais e proporcionar ao antagonista uma vantagem competitiva em relação ao(s) patógeno(s) e organismos da microflora nativa (FAVEL et al., 1995; HJELJORD & TRONSMO, 1998). O acúmulo de informações quanto à capacidade antagônica e habilidade de colonização e proliferação em diferentes habitats, associado a sistemas de produção massal, formulação e aplicação eficientes, tem levado ao desenvolvimento de produtos estáveis a base de *Trichoderma* (especialmente *T. harzianum*). Tais produtos, como RootShield<sup>TM</sup>, T-22 Planter Box<sup>TM</sup> e Trichodex<sup>TM</sup>, já encontram-se em comercialização nos Estados Unidos, Europa e Israel (HARMAN, 2000). A

busca de novos produtos específicos para a agricultura brasileira é necessária. A atividade antagonista e a indução de defesa em plantas são atributos importantes na seleção de novos isolados.

O grão do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é um dos produtos agrícolas de maior importância sócio-econômica no Brasil. Sua importância decorre da área efetivamente cultivada, volume e valor de produção, geração de mão-de-obra, e como uma das principais fontes de proteína e energia na alimentação da maior parte da população brasileira (BROUGHTON et al., 2003). Esta cultura é cultivada, de acordo com o IBGE (2008), em todo o território nacional, porém seis estados se destacam em sua produção: Paraná, Minas Gerais, Bahia, São Paulo, Goiás e Santa Catarina, sendo os responsáveis por cerca de 70% do produto comercializado.

Alguns dos fatores levantados como críticos para este déficit de produção são: o uso de sementes de má qualidade e a suscetibilidade desta cultura a doenças, que além de impactar na sua produtividade, reduzem o valor comercial do produto. Grande parte da perda em lavouras no Brasil e no mundo atribui-se aos fungos fitopatogênicos “de solo”, sendo que anualmente milhões de dólares são gastos no seu controle (OARD et al., 2004). Nas lavouras brasileiras, infecções causadas por patógenos “de solo” como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, e pelo fungo *Fusarium solani* causam perdas de até 100% na produção de culturas suscetíveis, principalmente de feijão e batata, cultivadas no Cerrado (CAFÉ FILHO & LOBO Jr., 2000; HALL & NASSER, 1996), e são amplamente reconhecidas como um dos maiores desafios para a agricultura brasileira (LOBO Jr., 2002). Estes fungos são parasitas não-

especializados, geralmente polívoros, que utilizam matéria orgânica como substrato e que apresentam uma alta capacidade de colonizar resíduos vegetais no solo, bem como de infectar diferentes tipos de culturas e, por isto, causam doenças com sintomas similares (POLETTI et al., 2006).

Os fungos fitopatogênicos *R. solani*, *F. solani* e *F. oxysporum* invadem o sistema radicular de plantas hospedeiras e inibem o seu crescimento ocasionando podridões radiculares. Sendo também responsáveis por podridões de sementes e podridão mole em frutos maduros, que estão em contato com o solo. A ocorrência destas doenças no estágio inicial de desenvolvimento da planta hospedeira pode levar ao impedimento da germinação, assim como após a germinação, ao encharcamento e desidratação rápida do hipocótilo acima do solo. Com a evolução da doença, o hipocótilo torna-se fino e tomba, e por fim há o colapso e morte da planta hospedeira (MELO & AZEVEDO, 2000). Outras características observadas para doenças causadas por estes fitopatógenos são: a coloração de cor escura, em geral preta e marrom do hipocótilo e o sistema radicular que permanece próximo à superfície do solo (MELO & AZEVEDO, 2000).

O gênero *Fusarium* é um grupo vasto e heterogêneo que compreende fungos de grande importância na indústria alimentícia e farmacêutica (EGGERT et al., 2010). *Fusarium solani* é um fungo fitopatogênico classificado dentro da seção Martiella. Ele é um importante agente causador de doenças em várias culturas, como exemplo ele ataca as raízes de ervilha, feijão e batata. Além de causar a síndrome de morte súbita na soja (ZACCARDELLI et al., 2008).

A importância deste fungo na agricultura está no fato de espécie do gênero *Trichoderma* agirem como antagonistas contra diversos fungos patógenos de plantas como, por exemplo, espécies de *Fusarium*, *Phytium*, *Rhizoctonia* e *Sclerotinia* (THRANE, 1997). A característica mais importante para utilização de um isolado no controle biológico é a sua capacidade micoparasítica.

O Micoparasitismo ocorre através de eventos seqüenciais, que vão desde o reconhecimento até o contato direto com o hospedeiro com a expressão de genes específicos (HERRERA-ESTRELA & CHET, 1998; HARAN et al., 1996, SCHERM et al., 2008). O micoparasita na presença do hospedeiro apresenta uma ramificação atípica, podendo ocorrer crescimento trófico à sua volta (BENHAMOU & CHET, 1993). Este evento provavelmente ocorre devido a um gradiente de nutrientes vindo do hospedeiro e produção de antibióticos não voláteis que inibem o crescimento do hospedeiro e o predispõe à infecção (BAKER, 1987). Dados da literatura sugerem que este enovelamento não ocorre apenas devido a um estímulo por contato, mas pela participação de proteínas presentes na parede celular dos hospedeiros (INBAR & CHET, 1992). As lectinas parecem estar diretamente envolvidas no processo de reconhecimento, bem como no enovelamento do antagonista sobre o hospedeiro. Diferentes tipos de lectinas que diferem com relação aos resíduos glicosídicos aos quais se ligam, foram isoladas da parede celular de *S. rolfsii* e *R. solani* (INBAR & CHET, 1994). Uma vez que o antagonista já reconheceu e estabeleceu o contato com o hospedeiro, segue-se a formação de estruturas em forma de gancho e estruturas semelhantes à apressórios que provavelmente ajudam na penetração na parede celular da hifa hospedeira

(HERRERA-ESTRELA & CHET, 1998). Entretanto, trabalhos recentes mostram que esta interação é bastante complexa, envolvendo mecanismos de transdução de sinal com participação de AMP cíclico (ZEILINGER e OMAN, 2007). A colonização interna do hospedeiro envolve atividade mecânica, através das estruturas citadas anteriormente, e também atividade enzimática. Após a penetração e crescimento do antagonista na célula hospedeira o citoplasma apresenta-se desestruturado e vacuolizado e a hifa perde as suas características (BENHAMOU & CHET, 1993).

O desenvolvimento de agentes de biocontrole para aplicações na agricultura necessita do entendimento do princípio biológico da sua ação. Conseqüentemente, já foram estudados alguns aspectos moleculares do mecanismo de biocontrole de *Trichoderma spp.*, como a regulação e papel das enzimas hidrolíticas e metabólitos secundários (HARMAN et al, 2004). Análises mais abrangentes como, por exemplo: uso de técnicas de hibridização subtrativa, proteômica e EST's (*expressed sequence tags*) foram utilizadas com diferentes espécies de *Trichoderma*, mas a maioria carece de não haver um genoma completo anotado disponível para uma melhor interpretação dos resultados. Estes estudos, em sua grande maioria, utilizam diferentes condições de crescimento para mostrar o arsenal genético destes fungos ao invés de estudar eventos individuais durante o micoparasitismo (CARPENTER et al, 2005; LIU & YANG, 2005; VIZCAÍNO et al, 2006; VIZCAÍNO et al, 2007; SCHERM et al, 2008).

Carpenter e colaboradores em 2005 utilizaram a técnica de hibridização subtrativa (SSH - *suppression subtractive hybridization*) para buscar e estudar novos genes expressos pelo *T. hamatum* durante a interação com *Sclerotinia*

*sclerotiorum*. Um fato interessante desse trabalho foi que eles utilizaram um confronto *in vivo* em placas de petri. Foram encontrados dezenove novos genes expressos durante a interação com *S. sclerotiorum*. Alguns cDNA mostraram similaridade com genes de bactérias e fungos, já outros não mostraram similaridade com nenhum gene descrito. Somente um gene foi caracterizado em outra espécie de *Trichoderma*, o gene *HEX1* (principal componente do corpúsculo de Woronin) de *T. reesei*. Os novos genes encontrados incluem três monooxigenases, uma metalopeptidase, uma gluconato desidrogenase, uma endonuclease e uma proton ATPase.

Ainda em 2005, Liu e Yang estudaram, utilizando a análise de ESTs, o mecanismo de biocontrole de *T. harzianum*. As condições de crescimento não foram descritas em seu manuscrito, somente que era relacionada ao biocontrole. Foram identificados 3298 clones, destes 2174 mostraram similaridade com genes conhecidos, 451 com EST's conhecidas e 673 seqüências representaram novos genes. Análises das seqüências identificadas mostraram similaridade com uma grande variedade de proteínas como enzimas, proteínas estruturais e fatores de regulação como, exemplo: proteína de parede celular QID3, *Woronin body major protein*, proteína de resposta a danos no DNA, oxidoreductase *ywfD* e fator de alongação 1-alpha. Uma grande proporção dos genes identificados está envolvida em processos relacionados com o micoparasitismo e produção de metabólitos secundários, o que já era esperado de um fungo conhecidamente micoparasita.

Em dezembro de 2002 foi construído um consórcio internacional chamado "Functional genomics and proteomics of *Trichoderma* antagonist strains for industry and agriculture (TRICHOEST)" (<http://www.trichoderma.org>).

Financiado pela União Européia, este projeto visou entender os mecanismos utilizados pelo fungo *Trichoderma* na área biotecnológica, principalmente no que diz respeito ao seu antagonismo a fitopatógenos, utilizando-se de técnicas de genômica e proteômica.

Foram publicados dois artigos por Vizcaíno e colaboradores em 2006 e 2007 no que diz respeito à análise de EST's. Em seu primeiro artigo foram construídas oito bibliotecas de cDNA de *T. harzianum* em diferentes condições de crescimento. Foram geradas ao todo 8710 EST's. Após várias análises foi encontrado como gene mais expresso em condições de stress e micoparasitismo, uma hidrofobina. As hidrofobinas são proteínas de baixo peso molecular, de origem fúngica e que tem várias funções nos processos celulares como, por exemplo: adesão, esporulação, desenvolvimento e patogênese (ASKOLIN et al, 2005).

No seu segundo artigo de 2007 foram construídas quatro bibliotecas em condições de stress e micoparasitismo, mas com quatro espécies diferentes: *T. longibrachiatum*, *T. asperellum*, *T. virens* e *Trichoderma sp.* Neste estudo foram geradas 8610 ESTs onde os mais expressos para pelo menos duas espécies foram seqüências similares a hidrofobina, HEX1 (*Woronin body major protein*), QID3 (proteína de parede celular) e NMT1 (proteína envolvida na síntese de tiamina).

Este projeto já tem ao todo mais de 7000 seqüências gênicas codificantes para proteínas, o que representa uma boa variedade dentro da espécie *Trichoderma*, considerando que este não é um projeto "genoma".

Em 2008, Scherm e colaboradores utilizaram bibliotecas subtrativas para estudar o biocontrole de *T. harzianum*. O foco deste trabalho foi clonar genes

que são expressos especificamente durante a interação de *Trichoderma* com o fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, usando a metodologia de RaSH (*rapid subtraction hybridization*) para assim poder selecionar isolados com melhor capacidade de agir no biocontrole (JIANG et al, 2000; SCHMOLL et al, 2004). Para este fim foi selecionado um isolado com boa capacidade para proteger sementes de algodão contra *R. solani* como modelo. Então foi adotado uma condição similar a do micoparasitismo, o micélio de *Trichoderma* e *R. solani* foram pré-crescidos em meio líquido e depois as biomassas foram colocadas em contato, servindo assim como *tester* para construção da biblioteca subtrativa. Nessas condições eles conseguiram detectar dois clones significativamente mais expressos no isolado utilizando o isolado mais efetivo no biocontrole, em comparação com os isolados com moderada e baixa ação micoparasítica. O que este trabalho conseguiu efetivamente foi isolar possíveis genes que poderão ser utilizados como marcadores para seleção de isolados de *Trichoderma* com bom desempenho no biocontrole.

A análise de transcritos (EST's) representa uma eficiente forma de caracterizar o transcriptoma de um organismo, principalmente quando existe um genoma anotado disponível para o organismo estudado. Seidl e colaboradores em 2009 utilizaram desta técnica em seus estudos utilizando um isolado de *T. atroviride*, devido a disponibilidade do genoma completo e anotado, além de bibliotecas de cDNA do fungo na sua forma miceliana e conidial. Foram utilizadas quatro condições de cultivo no estudo: confronto em placa contra os fitopatógenos *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia solani* no escuro, seus respectivos controles na ausência do fitopatógeno, culturas crescidas com luz azul para indução da esporulação e culturas crescidas no escuro, mas

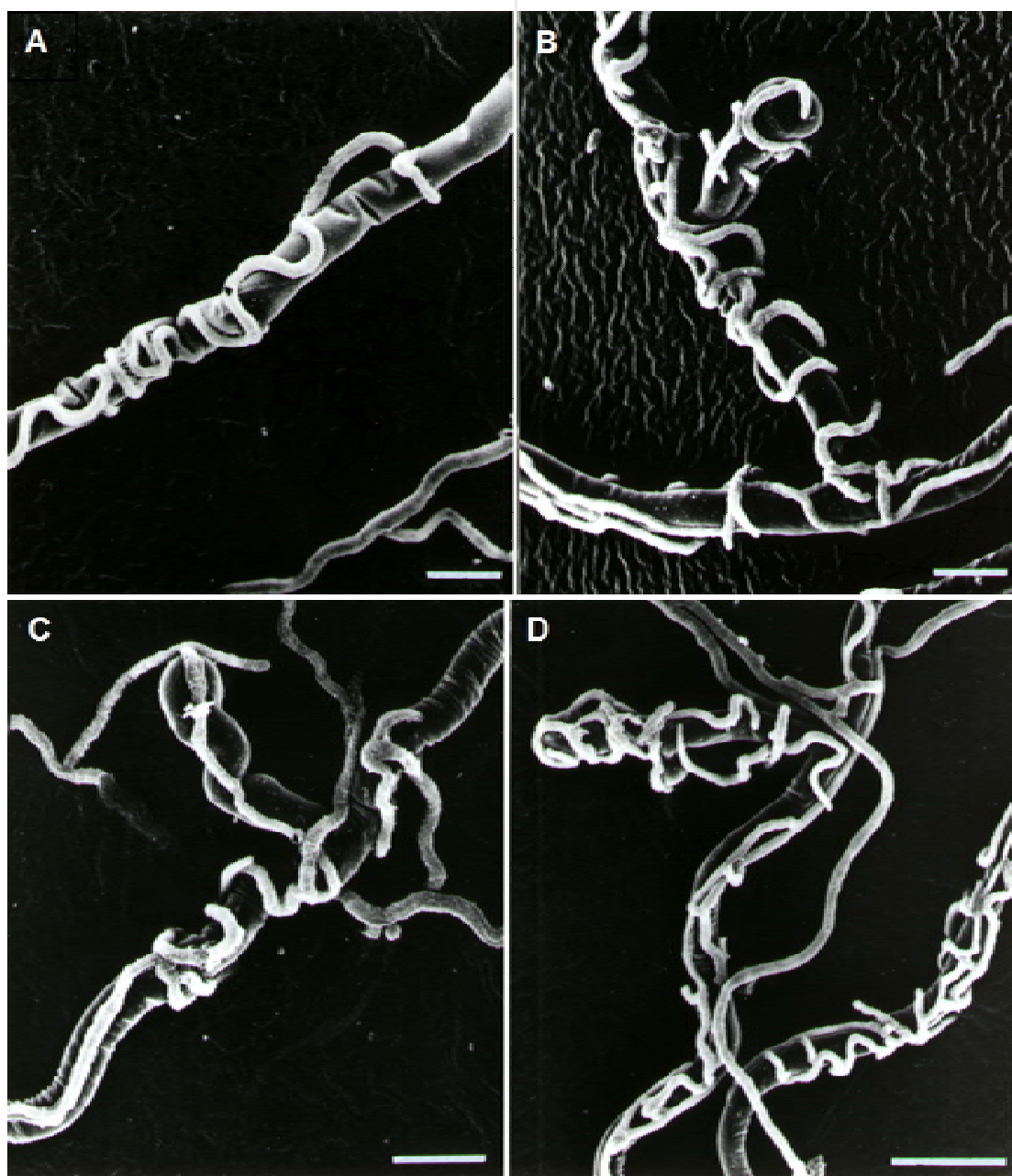
sofrendo dano físico (um método para indução da esporulação, não dependente de luz). Aproximadamente 3000 EST's, o que representa cerca de 900 genes, foram obtidos de cada biblioteca. Após as análises foi visto que 66 genes (442 EST's) foram significativamente mais expressos nas condições de micoparasitismo. Dentre estes genes, as vias mais representadas foram: processamento pós-traducional, metabolismo de aminoácidos, componentes de resposta a stress, reação à carência de nitrogênio, transdução de sinal e catabolismo de lipídios.

Bibliotecas de cDNA de *T. reesei* também foram feitas (DIENER et al, 2004) com o interesse de encontrar genes que regulam a secreção de proteínas e posteriormente melhorar sua produção enzimática. Proteínas responsáveis por dar estrutura tridimensional e ornamentação são consideradas um gargalo para o melhoramento da produção e secreção de proteínas na indústria. Neste trabalho foram encontrados vários genes homólogos dessas vias (*folding* e ornamentação). Isso trouxe perspectivas para o melhoramento da produção industrial de enzimas, principalmente do complexo celulolítico.

Uma ferramenta interessante utilizada a respeito da interação entre fungos do gênero *Trichoderma* e fitopatógenos são as técnicas baseadas em estudos *in vivo* através do confronto em placa de petri. Diversos trabalhos descritos na literatura (MARCELLO et al., 2010, MORISSETTE et al., 2007, SANZ et al., 2004) vem demonstrando que essa é uma ferramenta muito interessante para análise da expressão de genes na interação *in vivo*, devido a facilidade na execução do experimento e obtenção de dados, além de ser uma situação mais próxima do que ocorre na natureza.

O grupo do Laboratório de Enzimologia (ICB/UFG) tem concentrado esforços no sentido de contribuir para o entendimento do papel de enzimas hidrolíticas no mecanismo de micoparasitismo e controle biológico. O isolamento e caracterização morfológica de fungos do gênero *Trichoderma* têm sido feito, principalmente de amostras de solo do cerrado da região Centro-Oeste. LIMA (2002) isolou e classificou quarenta e seis isolados de *Trichoderma* provenientes deste bioma através de cultura monospórica e os caracterizou com base em aspectos morfológicos e moleculares (análise da sequência da região 1 e 2 dos espaçadores internos - ITS 1, 5,8S e ITS 2 - do rDNA). A espécie mais freqüentemente isolada foi *Trichoderma harzianum* (34 isolados), seguida por *Trichoderma asperellum* (4 isolados), *Trichoderma koningii* (3 isolados) e *Trichoderma spirale* (2 isolados).

O potencial antagônico dos isolados de *T. harzianum* foi avaliado pelo teste de pareamento de culturas contra o fitopatógeno *Rhizoctonia solani* (Figura 1). O fungo foi capaz de crescer em direção ao hospedeiro, sobrepondo as hifas de *R. solani*, inclusive com esporulação (LIMA, 2002). Foi também observado um crescimento rápido em direção ao hospedeiro e enrolamento em torno da sua hifa. O tipo de colonização do *T. harzianum*, demonstrada nestes trabalhos, é um indicativo de atuação por micoparasitismo, conforme também descrito para outros isolados do gênero *Trichoderma* (EL-KATATNY et al., 2001).



**Figura 1-** MEV (Microscopia eletrônica de varredura) da ação micoparasítica de *T. harzianum* sobre *R. solani*. A, B, C e D correspondem a interação entre os isolados de *T. harzianum* ALL-23, ALL-40, ALL-41 e ALL-44 e o isolado de *R. solani* CNPAF-03, respectivamente. Cedido por LIMA, 2002. Bar = 10  $\mu$ m.

Segundo dados da Embrapa CNPAF, 70% das doenças fúngicas na cultura de feijão são causadas por fungos do gênero *Fusarium*. O entendimento do mecanismo de biocontrole da interação entre *Trichoderma harzianum* e

*Fusarium solani* é necessário. Bem como o conhecimento dos genes envolvidos com o micoparasitismo para se entender melhor os mecanismos envolvidos e assim otimizar processos para futuras aplicações em campo.

Novas tecnologias de seqüenciamento (*Next Generation Sequencing*-NGS) já estão sendo aplicadas com sucesso na análise do transcriptoma de eucariotos, permitindo a análise simultânea do nível de expressão, da variação estrutural e de seqüência em um determinado locus (WANG et al.,2009). Estas técnicas possibilitam a obtenção de milhões de seqüências e por isto, reduzem os custos destas análises e aumentam a possibilidade de detecção de transcritos raros. Estas novas técnicas trazem novas perspectivas para o estudo do transcriptoma da interação de *Trichoderma* frente à fitopatógenos.

O seqüenciamento de EST's (expressed sequence tags) utilizando a estratégia de Sanger é um método robusto para a identificação de transcritos envolvidos em processos biológicos específicos. Neste trabalho utilizamos esta técnica para a análise do transcriptoma de *Trichoderma hazianum* crescido em parede celular de *Fusarium solani*. As seqüências oriundas deste trabalho darão suporte para futuros trabalhos de clonagem e expressão de genes envolvidos no controle biológico.

### 3 – Objetivos da Pesquisa

Esta pesquisa tem como objetivo a construção de um mapa de EST's da interação de *Trichoderma harzianum* com o fitopatógeno *Fusarium solani* e fazer sua validação.

Tendo cumprido a etapa de construção da biblioteca temos como objetivos específicos:

- Seqüenciamento e análise dos transcritos;
- Classificar e agrupar as EST's por função;
- Construção de um banco de dados com as EST's encontradas;
- Submissão das seqüências em banco de dados públicos (GenBank).

## 4 – Material e Métodos

### 4.1. Manutenção dos fungos

O isolado de *Trichoderma harzianum* (ALL-42), da Coleção do Laboratório de Enzimologia (ICB/UFG) foi mantido com repiques periódicos em meio MYG (0,5% de extrato de malte, 0,25% de extrato de levedura, 1% de glicose e 2% de ágar) e estocado a -20 °C. O isolado de *Fusarium solani* foi cedido pela EMBRAPA – CNPAF e mantido nas mesmas condições.

### 4.2. Produção de parede celular de *F. solani*

Vinte discos (5 mm de diâmetro) de micélio de *F. solani* crescidos em MYG foram utilizados para inocular 4 frascos erlenmeyer de 1L contendo 250 mL de meio MYG. As culturas foram incubadas por sete dias em agitador rotatório, à 28° C e 180 rpm. Após a incubação, o meio de cultura foi filtrado e lavado com solução salina 0,9% e o micélio coletado em papel de filtro. O micélio foi liofilizado e triturado com gral e pistilo. Após a trituração o micélio foi novamente lavado com solução salina 0,9% e liofilizado.

### 4.3. Indução

Cerca de  $10^7$  esporos do isolado ALL-42 (Lima, 2002) de *Trichoderma harzianum* foram inoculados em meio mínimo ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g.L<sup>-1</sup>,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,4 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{MgSO}_4$  0,3 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{CaCl}_2$  0,15 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{FeSO}_4$  0,005 g.L<sup>-1</sup>,  $\text{MnSO}_4$  0,0016 g.L<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>, ZnSO<sub>4</sub> 0,0014 g.L<sup>-1</sup>) suplementado com 0,5% de parede celular de *Fusarium solani*, e crescido em agitador rotatório a 28 °C 180 rpm. As coletas dos micélios foram feitas após 12, 24, 36 e 48 horas de indução. Esses micélios foram filtrados, lavados com água destilada e guardados em ultrafreezer a -80 °C para posterior extração dos RNAs.

#### **4.4. Extração de RNA total**

Para as extrações dos RNAs os micélios foram macerados com N<sub>2</sub> líquido em gral e pistilo até conseguir um pó fino. 100 mg desse pó foi ressuspendido em 1 mL de TRIzol (Invitrogen™), homogeneizado em vortex e incubado 5 minutos em temperatura ambiente. Foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio, agitado por 15 segundos e incubado por 3 minutos a temperatura ambiente. Após isso a amostra foi centrifugada à 12000 g por 15 minutos a 4 °C. Depois de centrifugado a fase aquosa foi transferida para um tubo com 0,25 mL de isopropanol e 0,25 mL de uma solução de citrato de sódio 0,8 M e NaCl 1,2 M para a precipitação do RNA e retirada de carboidratos e proteoglicanas. Após a precipitação por 15 minutos a temperatura ambiente e centrifugação por 10 minutos a 12000 g, removido o sobrenadante e lavado o pellet com 1 mL de etanol 75%, centrifugado a 7.500 rpm por 5 minutos a 4° C, retirado o sobrenadante e seco a temperatura ambiente por 10 minutos e ressuspendido em 50 µL de água RNase free.

Os RNAs das induções de cada tempo foram misturados na mesma proporção para se obter uma maior variedade de transcritos na biblioteca. Após

a mistura os RNAs foram quantificados por espectrofotometria utilizando o aparelho GeneQuant (Pharmacia).

#### **4.5. Isolamento dos mRNA e construção das bibliotecas**

Cerca de 500 µg de RNA total foram utilizados para a aplicação em uma coluna com uma matriz contendo oligo-dT (Amersham Inc.). A amostra foi desnaturada a 65 °C por 5 minutos e adicionado 0,2 mL de tampão de amostra (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 3 M pH 7,4). A amostra foi aplicada na coluna previamente lavada com tampão de alta concentração de NaCl (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 0,5 M pH 7,4) e centrifugada a 350 g por 2 minutos. Mais uma lavagem e centrifugação com tampão de alta concentração foi feita. Após isso foram feitas mais 3 lavagens seguidas de centrifugação com tampão de baixa concentração de NaCl (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 0,1 M pH 7,4).

Para a eluição do mRNA ligado a matriz foram adicionados 0,25 mL de tampão sem NaCl (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,4) aquecido a 65 °C, centrifugado a 350 g por 2 minutos e coletado em microtubo de 1,5 mL. Esse procedimento foi repetido mais 3 vezes para um total de 1 mL final.

O mRNA foi precipitado pela adição de 0,1 mL de tampão de amostra, 10 µL de glicogênio 10 mg/mL e 2,5 mL de etanol gelado. A mistura foi homogeneizada e colocada a -20 °C por 2 horas. Após isso a amostra foi centrifugada a 12000 g por 10 minutos a 4 °C e ressuspensa em água Mili Q RNase free para a construção da biblioteca (SuperScript™ Plasmid System with Gateway® Technology for cDNA Synthesis and Cloning, Invitrogen™).

Para síntese da 1ª fita de cDNA utilizamos 1 µg de mRNA, adicionando 2 µL do adaptador *Not1* (50 µg.mL<sup>-1</sup>), desnaturado a 70° C por 10 minutos, e anelado por 2 minutos no gelo, em seguida foi adicionado 4 µL de tampão 1ª fita, 2 µL de DTT 0,1 M, 1 µL de dNTP 10 mM e levado ao banho-maria a 37° C por 2 minutos, adicionado 2,5 µL de transcriptase reversa (20.000 U.mL<sup>-1</sup>) por 1 hora a 37° C.

Para síntese da 2ª fita foi utilizado 18 µL (1 µg) do cDNA fita simples a 93 µL de água, 30 µL de tampão 5X, 3 µL de dNTP mix 10 mM, 1 µL de DNA ligase 10 U/µL, 4 µL de DNA polimerase I 10 U/µL e 1 µL de RNase H 2 U/µL, totalizando 150 µL de volume final, agitado gentilmente e incubado por 2 horas a 16° C, adicionado 2 µL de T4 DNA polimerase (10 U.µL<sup>-1</sup>), incubado por 5 minutos a 16° C, adicionado 10 µL de EDTA 0,5 M e incubado no gelo para parar a reação. O cDNA dupla fita foi aplicado em coluna cromatográfica para fracionamento de cDNA.

A ligação do cDNA ao vetor foi realizada utilizando-se 5 µL de cDNA dupla fita 4 ng/µL a 4 µL de tampão 5x T4 DNA ligase, 1µL de vetor pSPORT1 (2,5 µg.mL<sup>-1</sup>), 1 µL de T4 DNA ligase (50 U.mL<sup>-1</sup>) e completando o volume para 20 µL com H<sub>2</sub>O mili Q, incubado overnight a 4° C.

A transformação de células de *E. coli* (DH5α) (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) foi realizada pelo método de eletroporação. O preparo das células competentes e os procedimentos de eletroporação foram realizados de acordo com as instruções do fabricante do eletroporador utilizado, o "Gene Pulser II system" (BIO-RAD®). Tendo sido utilizados cerca de 20 µl de células competentes e 2 µl do sistema de ligação ou 20 ng do DNA de interesse. Após

o choque as células foram recuperadas em meio SOC (2% Bacto triptona, 0,5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glicose) e inoculadas, posteriormente, em placas de meio LB contendo o antibiótico ampicilina a 100 µg/mL. Como o plasmídeo utilizado permite a seleção "azul e branco", foram também adicionados ao meio LB, IPTG para concentração final de 40mg/mL e X-Gal para concentração final de 3%.

As placas foram incubadas a 37° C durante a noite, e os clones brancos, provavelmente correspondentes aos clones recombinantes, foram selecionados para a extração do DNA plasmidial e para estoque das células transformadas em glicerol 35%, a -80° C.

#### **4.6. Análise da biblioteca de cDNA**

O total de 25 placas de meio de cultura foram utilizadas para crescimento das bactérias transformadas, os quais foram isolados 192 clones de cada placa e estocados em glicerol 35% a -80 °C. Posteriormente as células foram cultivadas em placas de 96 poços com capacidade de 2,2 mL para extração do DNA plasmidial através de Mini preparação. 20 µL das células estoque foram transferidos para a placa com 0,75 mL de meio LB com ampicilina em cada poço. As células foram crescidas em agitador rotatório por 18 horas a 37 °C. Após o crescimento, as placas foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos, descartado o sobrenadante e adicionado 240 µL da solução 1 (Tris 25 mM, EDTA 1 mM, glicose 1%) para ressuspender as células em vórtex. 60 µL dessa solução foram transferidos para outra placa com 80 µL de solução 2 (NaOH 0,2M e SDS 1%) e incubado 10 minutos a temperatura ambiente. Foi

adicionado 70 µL da solução 3 (Acetato de potássio 3 M), incubado 10 minutos e centrifugado 10 minutos a 4000 rpm. Após isso 100 µL do sobrenadante foi transferido para uma placa com o fundo de membrana 0,22 µm (Millipore) e centrifugado 6 minutos a 4000 rpm sendo o filtrado coletado em outra placa. 80 µL de isopropanol foram adicionados para a precipitação por 30 minutos a -20 °C seguido de uma centrifugação por 45 minutos a 40 00 rpm. Após isso foi feita uma lavagem com 200 µL de etanol 70%, centrifugado 15 minutos a 4000 rpm e descartado o sobrenadante para a secagem do pellet por 1 hora a temperatura ambiente. Os plasmídeos foram ressuspensos com 50 µL de água MiliQ.

#### **4.7. PCR (*Polimerase Chain Reaction*) para verificação do tamanho médio dos insertos**

Para a verificação do tamanho médio dos insertos, foram selecionados aleatoriamente 96 clones para uma reação de PCR com os *primers* universais SP6 (5' ATTTAGGTGACACTATAG 3') e T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3)'. A reação procedeu com os seguintes ciclos: 94°C por 2 min., 35 ciclos de 94°C 1 min., 50°C 30 seg., 72°C 2,5 min., seguida de uma extensão de final de 72°C por 10 minutos. Foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1% por 1 hora a 5 V.cm<sup>-1</sup>. Foi utilizado como marcador molecular DNA Ladder 1kb (Invitrogen). A análise do tamanho dos insertos foi feita pelo programa QuantityOne (BioRad®).

#### 4.8. Seqüenciamento das EST's

Para a reação de seqüenciamento foi utilizado 1 µL do plasmídeo (~ 250 ng) e seguido protocolo do kit DYEnamic ET terminator (GE healthcare) modificado. A reação foi realizada utilizando 1 µL do *master mix*, 2,5 pM de primer T7 para um volume final de 10 µL. As amostras foram seqüenciadas no aparelho ABI prisma 3100 (Applied Biosystems).

#### 4.9. Análise preliminar das seqüências e controle de qualidade

Para análise dos resultados obtidos foram utilizadas ferramentas computacionais gratuitas, disponíveis via Web, baseadas no sistema operacional Linux. Todos os eletroferogramas obtidos foram submetidos ao *base-calling* utilizando-se o programa phred (EWING & GREEN, 1998). Foram considerados válidos os *reads* que apresentarem um mínimo de 100 pares de bases com valor phred igual ou superior a 20. As seqüências de qualidade obtidas foram inicialmente submetidas à análise pelo programa *CrossMatch* (<http://www.genome.washington.edu/UWGC/analysistools/Swat.cfm>) visando, principalmente, a remoção de seqüências contaminantes de vetores e adaptadores.

Uma vez processados, os *reads* obtidos foram submetidos à clusterização utilizando-se o software CAP3 (HUANG & MADAN, 1999) para obtenção dos *contigs*. Os *contigs* obtidos foram então submetidos à comparação com o GenBank pela utilização do algoritmo *blastx* (ALTSCHUL et al, 1997), de modo a possibilitar a anotação preliminar das seqüências obtidas.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Construção do banco de cDNA (pré-sequenciamento)

Um banco de cDNA da interação de *T. harzianum* crescido em parede celular de *F. solani* foi construído. Para verificar a qualidade do banco, foram selecionados 96 clones aleatoriamente para posterior reação de PCR e análise do tamanho médio dos insertos (Figura 2). O tamanho médio obtido foi de 1149 pb. 74% dos insertos apresentaram um tamanho maior que 300 pb, mostrando um rendimento satisfatório na transcrição reversa dos RNAs. Os insertos variaram de 250 pb a 4000 pb mostrando uma boa variedade de tamanhos, o que é esperado em um banco representativo.

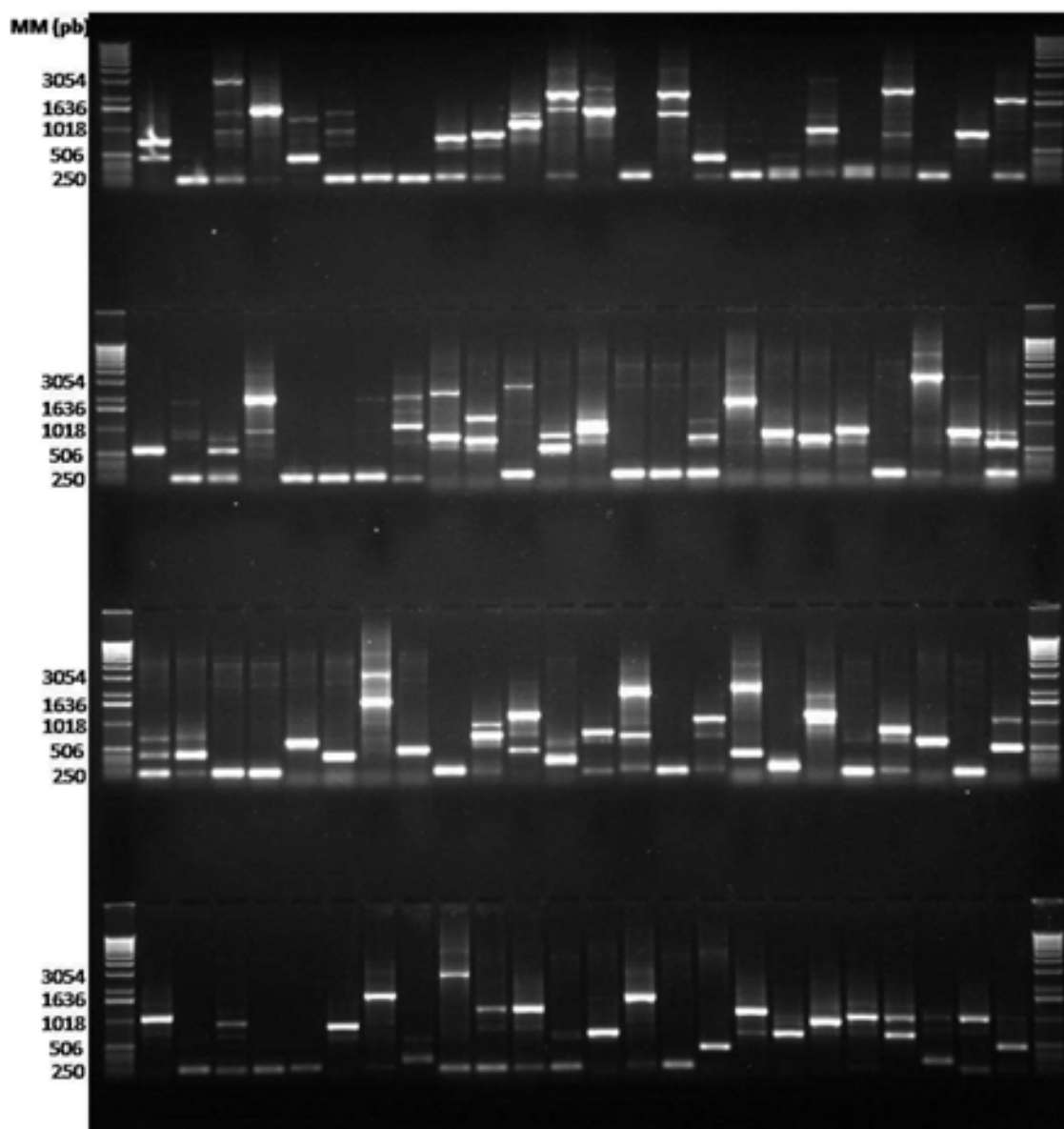


Figura 2 – Análise eletroforética em gel de agarose 1% mostrando o tamanho médio dos insertos.

## 5.2. Características do banco de cDNA (pós-sequenciamento)

No total foram obtidas 3984 EST's após a passagem pelo controle de qualidade (PHRED) e retirada de seqüências de vetores e adaptadores (CrossMatch). Foi utilizado o programa CAP3 para alinhar seqüências similares e formar os *contigs*, que no total foram gerados 383. Seqüências únicas

(*singlets*), que não se alinharam com nenhuma outra, foram obtidas 2508 (Tabela 1).

Tabela 1 – Características gerais do banco de cDNA de *T. harzianum*

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| <i>Tamanho total das sequências</i> | 1924 kb |
| <i>Total de EST</i>                 | 3984    |
| <i>Contigs</i>                      | 383     |
| <i>Contigs identificados</i>        | 262     |
| <i>Singlets</i>                     | 2508    |
| <i>Singlets identificados</i>       | 687     |
| <i>ESTs/Contig</i>                  | 3,574   |
| <i>Conteúdo de G + C</i>            | 53,20%  |
| <i>Total de ESTs identificadas</i>  | 40,80%  |

As seqüências de EST foram comparadas com o banco de dados não-redundante do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando o algoritmo BlastX (ALTSCHUL et al, 1997). Para uma análise mais rápida o banco de dados utilizado corresponde a somente seqüências de proteínas correspondentes a fungos. Foram consideradas para análise somente seqüências com *e-value* abaixo de  $10^{-5}$  na comparação com o GenBank.

As seqüências foram agrupadas em 1054 *clusters* onde 687 correspondem a *singlets* e 367 a *contigs*. Na contagem dos *clusters* foram retiradas seqüências que não tiveram homologia com nenhuma proteína no GenBank.

Uma análise que geralmente não é realizada em trabalhos que fazem estudo de ESTs, é a quantidade de cDNAs *full length* (a seqüência se alinha com o primeira Metionina do gene alvo). Neste trabalho observamos que em 44,1% dos contigs identificados isso ocorre e em 22,8% dos singlets. Este é um dado bastante interessante quando existe interesse na caracterização e na clonagem e expressão de genes específicos, o que é caso do nosso grupo de pesquisa.

Dentre esses contigs, 69,3% tem 2 ou 3 ESTs, enquanto apenas 7 tem mais de 10 ESTs. Esta baixa redundância sugere uma alta complexidade e uma boa representatividade deste banco de cDNA.

### 5.3. Anotação funcional e análise das seqüências

O banco de cDNA deste estudo não sofreu nenhuma subtração ou normalização, assim pode-se sugerir que o número de clones derivados de um gene é diretamente proporcional à sua expressão. A alta redundância de um cDNA específico é relacionado com sua expressão. A tabela 2 mostra os 25 contigs mais redundantes.

Tabela 2 – Genes identificados com maior redundância em *T. harzianum*

| Produto gênico                        | Nº Acesso      | E-value   | Organismo                      | Redundância |
|---------------------------------------|----------------|-----------|--------------------------------|-------------|
| QI74 protein                          | CAA64974.1     | 3,00E-90  | <i>Hypocrea lixii</i>          | 55          |
| ribosomal protein S5                  | NP_570148.1    | 4,00E-18  | <i>Hypocrea jecorina</i>       | 20          |
| 40S ribosomal protein S26             | XP_001227903.1 | 7,00E-43  | <i>Chaetomium globosum</i>     | 13          |
| hypothetical protein                  | EEU48641.1     | 2,00E-17  | <i>Nectria haematococca</i>    | 13          |
| predicted protein                     | EEU41772.1     | 1,00E-05  | <i>Nectria haematococca</i>    | 13          |
| glucanase B                           | EEY24054.1     | 1,00E-41  | <i>Verticillium albo-atrum</i> | 12          |
| inorganic pyrophosphatase             | XP_363672.1    | 5,00E-62  | <i>Magnaporthe grisea</i>      | 11          |
| 40S ribosomal protein S3              | XP_002542517.1 | 4,00E-60  | <i>Uncinocarpus reesii</i>     | 11          |
| translation elongation factor 1 alpha | AAR16425.1     | 1,00E-71  | <i>Metarhizium anisoplae</i>   | 10          |
| Mmc protein                           | ACN92038.1     | 6,00E-14  | <i>Metarhizium anisopliae</i>  | 10          |
| ribosomal protein S28                 | ABE68883.1     | 2,00E-66  | <i>Stachybotrys elegans</i>    | 10          |
| hypothetical protein                  | XP_001799364.1 | 7,00E-05  | <i>Phaeosphaeria nodorum</i>   | 10          |
| exochitinase                          | AAB47060.1     | 2,00E-79  | <i>Hypocrea lixii</i>          | 9           |
| histone H4                            | XP_368084.1    | 9,00E-33  | <i>Magnaporthe grisea</i>      | 9           |
| 60S acidic ribosomal protein P2       | XP_002625564.1 | 6,00E-16  | <i>Ajellomyces capsulatus</i>  | 9           |
| woronin body major protein            | EER41322.1     | 1,00E-06  | <i>Ajellomyces capsulatus</i>  | 9           |
| hypothetical protein                  | EEU38858.1     | 7,00E-35  | <i>Nectria haematococca</i>    | 9           |
| hypothetical protein partial mRNA     | XM_380672.1    | 1,00E-128 | <i>Gibberella zeae</i>         | 9           |
| nucleoside diphosphate kinase A       | EEQ29020.1     | 5,00E-39  | <i>Microsporium canis</i>      | 8           |
| 40S ribosomal protein S6              | XP_001557655.1 | 1,00E-57  | <i>Botryotinia fuckeliana</i>  | 8           |
| 60S ribosomal protein L12             | XP_961403.1    | 3,00E-63  | <i>Neurospora crassa</i>       | 8           |

|                                            |                |          |                             |   |
|--------------------------------------------|----------------|----------|-----------------------------|---|
| 60S ribosomal protein L24                  | XP_001270287.1 | 1,00E-30 | <i>Aspergillus clavatus</i> | 8 |
| hypothetical protein                       | XP_380668.1    | 4,00E-12 | <i>Gibberella zeae</i>      | 8 |
| hydrophobin                                | ABS59379.1     | 7,00E-14 | <i>Hypocrea virens</i>      | 7 |
| outer mitochondrial membrane protein porin | XP_960950.1    | 4,00E-32 | <i>Neurospora crassa</i>    | 7 |

---

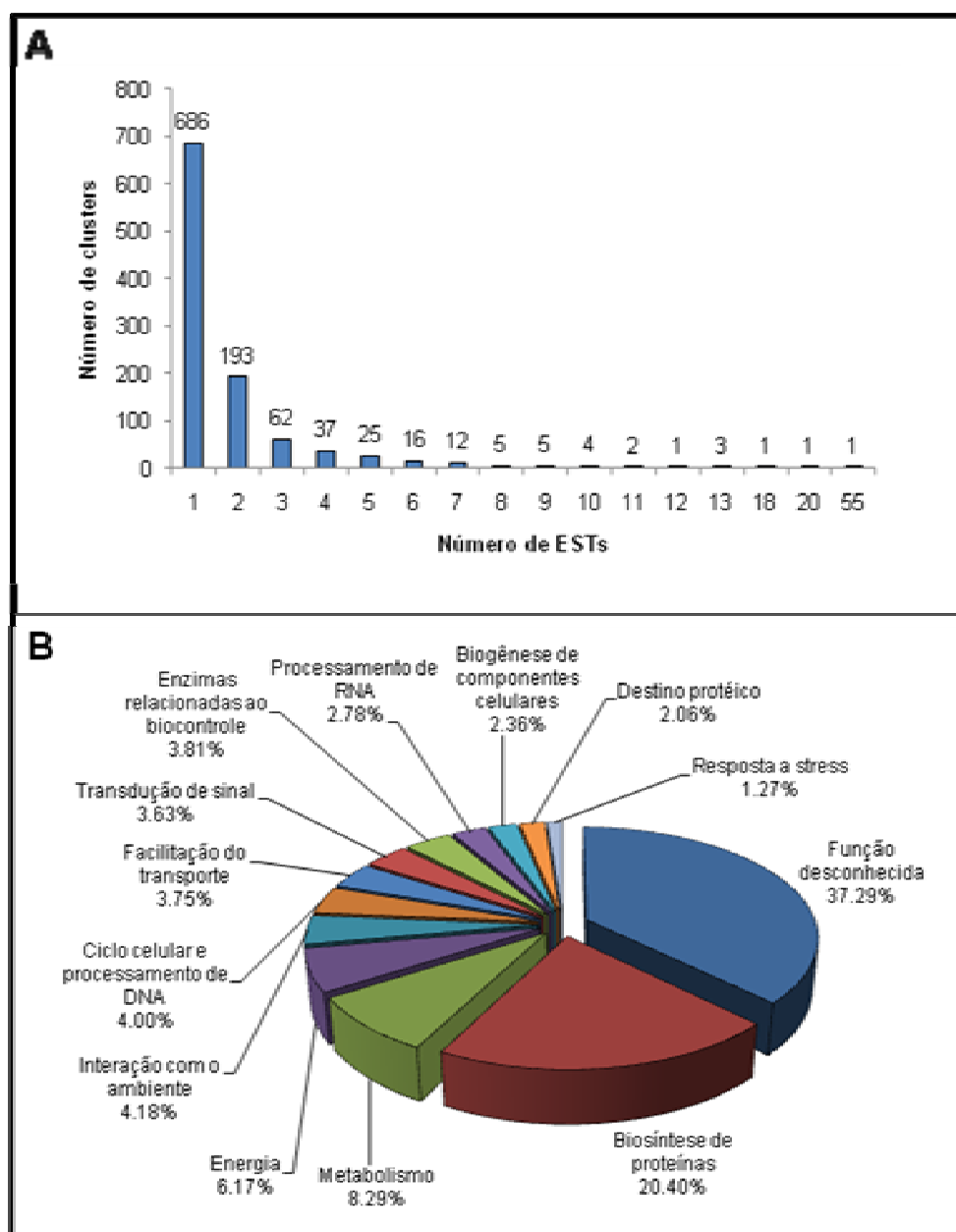
De acordo com a redundância, o gene mais expresso neste estudo foi o QI74, já encontrado e altamente expresso por *T. harzianum* em meios de cultura contendo quitina (REY et al., 1998). Liu e Yang em 2005 também encontraram esse gene bastante expresso em sua biblioteca. Sua função ainda não é muito bem definida, sugere-se que esta proteína confere hidrofobicidade à hifa e seja crucial no contato célula-célula. Também participa no reconhecimento do patógeno e formação de apressórios (VIZCAÍNO et al., 2007). Hidrofobinas também foram encontradas expressas e sugere-se que elas tenham ação na interface hidrofílico-hidrofóbico na superfície da hifa diminuindo a tensão superficial da água para aumentar seu contato com ar (LIU e YANG, 2005). O aparecimento da QI74 e hidrofobinas sugere a competência do *T. harzianum* na competição por nutriente e espaço, impedindo o crescimento do patógeno.

Genes *housekeeping* como, por exemplo, proteínas ribossomais aparecem em bastante quantidade e variedade. Isso mostra a grande necessidade que o fungo tem de produzir novas proteínas para crescimento da hifa e aumentar seu arsenal protéico. Sugere-se que nos estágios iniciais do crescimento de *Trichoderma* na interação com fitopatógenos, uma das formas de defesa é o aumento significativo da expressão de genes da síntese de proteínas, onde as hidrolases e metabólitos secundários são expressos posteriormente (SEIDL et al, 2009). Devido a nosso banco abranger mRNA desde o início da interação (12 h – 48 h), nós obtivemos EST's representativas de ambos estágios do

micoparasitismo. Nos estágios iniciais (12 e 24 horas) provavelmente houve uma expressão de genes envolvidos na síntese de proteínas e nos estágios posteriores (36 e 48 horas) a expressão de genes relacionados ao micoparasitismo como hidrolases e metabólitos secundários.

Enzimas hidrolíticas relacionadas ao biocontrole foram obtidas, as mais expressas foram glucanase B (endo- $\beta$ -1,3-glucanase) e exoquitinase. Devido a parede dos fitopatógenos serem compostas principalmente por quitina e  $\beta$ -1,3-glucana estas enzimas têm um papel fundamental na sua hidrólise. Outras enzimas hidrolíticas também foram encontradas como uma serina endopeptidase, chitinase 33kDa, Cel3b ( $\beta$ -glicosidase),  $\beta$ -manosidase,  $\alpha$ -glicosidase, quitosanase, lipase, carboxipeptidase entre outras classes de proteases, bastante importante no micoparasitismo (VITERBO et al, 2002; OLMEDO-MONFIL et al, 2002; POZO et al, 2004). Uma enzima interessante que foi encontrada é a  $\beta$ -1,3-exoglucanase que já foi caracterizada pelo nosso grupo e que é diferencialmente expressa durante a interação de *T. asperellum* com *R. solani* (MARCELLO et al, 2010).

Utilizando os dados dos *clusters*, as EST's foram anotadas e classificadas de acordo com suas funções conhecidas. Durante o processo, *clusters* que representavam um mesmo produto gênico foram agrupados. A divisão foi feita utilizando as seguintes categorias: síntese de proteínas, metabolismo, energia, interação com o ambiente, ciclo celular e processamento de DNA, facilitação do transporte, transdução de sinal, enzimas relacionadas ao biocontrole, processamento de RNA, biogênese de componentes celulares, destino protéico, resposta a stress e função desconhecida (Figura 2). A tabela 3 mostra todos os unigenes divididos de acordo com sua classificação.



**Figura 2** – **A** – Gráfico mostrando a quantidade de ESTs pelo número de clusters. **B** – Visão geral do transcriptoma de *T. harzianum* crescido em parede celular de *F. solani*. As respectivas funções foram determinadas de acordo com a base de dados Kegg e análise pelo InterProScan.

A maioria das ESTs encontradas referem-se a funções desconhecidas ou proteínas hipotéticas (37,29%). Isso se deve ao fato de que existem poucas espécies de fungos que tem suas proteínas devidamente caracterizadas, o que está mudando atualmente (LIU e YANG, 2005). Um gene com função

desconhecida chamado *cellulose signalling related protein ooc1* foi identificado em nossa biblioteca, o que é um achado muito interessante devido à ausência de celulose na parede de fungos do gênero *Fusarium* (BARTNICKI-GARCIA, 1968; SCHOFEEELMEER et al., 1999). Scholl e Kubicek em 2005 visando entender melhor o crescimento de *T. reesei* em fontes de carbono insolúveis para produção de celulases, fizeram varias bibliotecas subtrativas utilizando como fonte de carbono celulose (presença e ausência de luz), soforose, lactose, glicose e glicerol. Eles notaram que este gene *ooc1* (*expressed only on cellulose*) foi altamente expresso somente quando o fungo era crescido utilizando celulose como fonte de carbono e no escuro. Outro dado interessante é que este gene não tem similaridade com nenhum outro gene fungico já descrito. Em nosso caso o crescimento foi feito sem controle da luminosidade, mas predominantemente no escuro. O aparecimento deste gene em nosso banco deve ser investigado.

ESTs com função relacionada ao metabolismo (8,29%) foram bastante representativas, principalmente as vias de metabolismo de aminoácidos, ácidos graxos e carboidratos. Um gene de triacilglicerol lipase foi encontrado também no trabalho de Scherm em 2008, mas não foi determinada ainda sua ligação com o micoparasitismo, o que requer mais estudos. Genes dessas vias metabólicas são considerados em sua maioria *housekeeping*, o que é esperado em bibliotecas de cDNA total. O metabolismo de energia também se mostrou bem representativo (6,17%) onde apareceram principalmente proteínas da fosforilação oxidativa.

Foram encontrados vários genes envolvidos com ciclo celular e processamento de DNA (4%), os mais expressos estão envolvidos com o

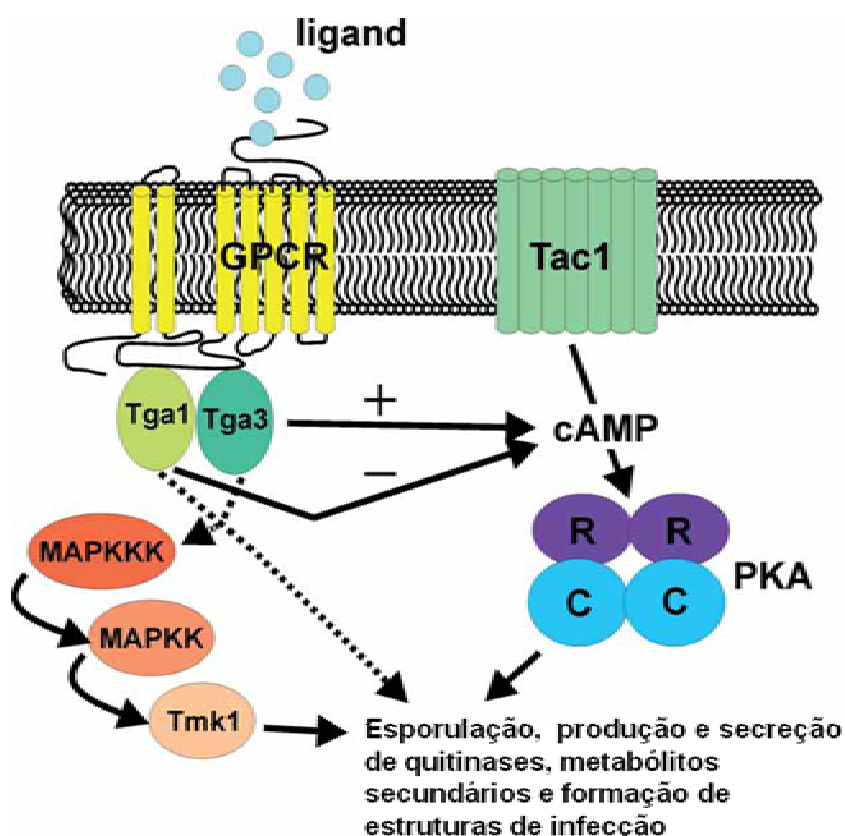
processo de esporulação, entre eles o *Mmc protein*, *cross-pathway control 1* e *conidiation-specific protein*. Genes envolvidos no enovelamento e suporte da cromatina também foram expressos como esperado, entre eles várias histonas (ZHANG & XIA, 2008).

Genes envolvidos com o transporte celular (3,75%), principalmente no transporte de carboidratos e peptídeos foram expressos, principalmente da classe dos MFS (*Major Facilitator Subfamily protein*). Isso se deve ao fato de que a absorção de nutrientes do meio deve ser alta para o devido crescimento do fungo em um meio onde a única fonte de nutrientes é a parede do fitopatógeno (CHOQUER et al., 2007).

Vias de sinalização (3,63%) são de extrema importância para todos os seres vivos. Em fungos micoparasitas (Figura 3), determinadas vias são essenciais para sua ação (ADACHI e HAMER, 1998; OMERO et al., 1999). O gene mais expresso dessa classe foi uma pirofosfatase inorgânica. Esta é uma enzima citosólica de grande importância no metabolismo do fosfato, hidrolizando uma molécula de difosfato em dois fosfatos. Esta importância se deve ao fato que grande parte das vias de sinalização requer uma fosforilação ou defosforilação. Encontramos algumas proteínas de sinalização de grande importância tanto para o fungo quanto para o nosso grupo de pesquisa, como a Proteína G subunidade  $\alpha$  e  $\beta$ , MAP kinase e PKA.

Nos últimos anos tem se estudado as vias de sinalização em *Trichoderma* durante sua ação no biocontrole. Mostrou-se que a proteína G e as MAP quinases afetam o processo de biocontrole, como na produção de enzimas hidrolíticas, metabólitos secundários e formação de estruturas de infecção. Sinalização via MAP quinase se mostrou envolvida na indução de resistência

em plantas, em *Trichoderma virens* e em situação de stress hiperosmótico em *Trichoderma harzianum* (ZEILINGER & OMMAN, 2007). Análises da função dos componentes da via do cAMP no biocontrole de *Trichoderma* revelou que o enrolamento, a produção de quitinase, NAGase e metabólitos secundários são afetadas pelo nível de cAMP intracelular (OMERO et al., 1999; SILVA et al., 2004).



**Figura 3** – Representação esquemática dos componentes das vias de sinalização relacionadas ao micoparasitismo de *Trichoderma atroviride*. Tga1, Tga3: subgrupo I e III G-protein  $\alpha$  subunits; GPCR: receptor acoplado a proteína G; Tac1: adenilate ciclase; PKA: proteína quinase A subunidades regulatória (R) e catalítica (C); Tmk1: MAP quinase (ZEILINGER & OMMAN, 2007).

Foram encontradas também algumas enzimas de biosíntese de parede celular como quitina sintase e glicosiltransferase gel1. Uma proteína bastante expressa e encontrada em outros trabalhos foi a HEX1 (DIENER et al,

2004; CARPENTER et al, 2005; LIU e YANG, 2005; VIZCAÍNO et al, 2006; VIZCAÍNO et al, 2007). Ela é proteína principal do corpúsculo de Woronin e muito importante para evitar perda de citoplasma quando a célula sofre algum dano, funcionando assim como um mecanismo de defesa da célula.

Na classe “destino protéico” (2,06%) estão as proteínas responsáveis pela degradação de componentes celulares e outras proteínas como, por exemplo, proteínas que dão conformação a outras proteínas, proteossomos e algumas proteases. Dentro desta classe, as EST's mais expressas foi uma ubiquitina, responsável por “marcar” outras proteínas para sua hidrólise, e uma ciclofilina. A ciclofilina possui uma atividade peptidil-prolil cis-trans isomerase *in vitro* e tem papel em uma grande quantidade de processos como de dar conformação a proteínas e transporte, *splicing* de RNA, e regulação de complexos multiprotéicos (WANG and HEITMAN 2005). Porém, ciclofilinas ainda não foram muito bem estudadas em fungos filamentosos, mas foi encontrada uma ciclofilina (CYP1) em *M. grisea* que age como determinante de virulência no seu ataque ao arroz (VIAUD et al., 2002).

Estudos prévios (LIU e YANG, 2005) mostraram a importância da produção de toxinas e antibióticos durante o biocontrole. O gene *norA* (*norsolorinic acid reductase*) foi encontrado expresso em nosso banco, ele participa da síntese de micotoxinas, principalmente de aflatoxina em *A. parasiticus* (CARY et al., 1996). Um gene da síntese de bacilisina também foi encontrado (*bacilysin biosynthesis oxidoreductase bacC*), sugere-se que ele tenha uma ação inibindo a esporulação em *Bacillus subtilis*, além de sua produção ser inibida pela presença de glicose ou sacarose (ÖZCENGİZ et al., 1990, ÖZCENGİZ & ALAEDDINOGLU, 1991 ). Outro gene encontrado foi o

*trichothecene 3-O-acetyltransferase* que participa da síntese de Trichotecenos.

Trichoteceno é uma toxina sesquiterpenóide que age inibindo a síntese de proteínas e assim reduz o dano que o fungo patogênico pode causar a planta (LIU e YANG, 2005).

Tabela 3 - Lista com as ORFs identificadas no estudo do transcriptoma de *T. harzianum*

| Categoria           | Produto gênico                                                          | Nº Acesso      | E-value  | Organismo                       | Redundância | Full length |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------|----------|---------------------------------|-------------|-------------|
| Transdução de sinal | inorganic pyrophosphatase                                               | XP_363672.1    | 5,00E-62 | <i>Magnaporthe grisea</i>       | 11          | X           |
|                     | calmodulin                                                              | AAG00262.1     | 9,00E-41 | <i>Magnaporthe grisea</i>       | 5           | X           |
|                     | wos2                                                                    | EEY19129.1     | 2,00E-08 | <i>Verticillium albo-atrum</i>  | 5           | X           |
|                     | G-protein beta subunit                                                  | EEY20936.1     | 7,00E-69 | <i>Verticillium albo-atrum</i>  | 4           | X           |
|                     | Fso1                                                                    | ABQ88348.1     | 4,00E-62 | <i>Fusarium oxysporum</i>       | 2           |             |
|                     | Lysophospholipase NTE1                                                  | EEY22130.1     | 1,00E-32 | <i>Verticillium albo-atrum</i>  | 2           |             |
|                     | neuronal calcium sensor 1                                               | EEY14685.1     | 5,00E-51 | <i>Verticillium albo-atrum</i>  | 2           |             |
|                     | Probable adenylate kinase                                               | XP_390913.1    | 2,00E-31 | <i>Gibberella zeae</i>          | 2           | X           |
|                     | rab GDP dissociation inhibitor beta                                     | EEY18269.1     | 5,00E-19 | <i>Verticillium albo-atrum</i>  | 2           | X           |
|                     | related to fzr protein                                                  | CAD01127.1     | 3,00E-36 | <i>Neurospora crassa</i>        | 2           |             |
|                     | serine/threonine protein kinase                                         | AAA57318.1     | 2,00E-40 | <i>Hypocrea jecorina</i>        | 2           |             |
|                     | tyrosine-protein phosphatase SIW14                                      | EEY19705.1     | 2,00E-30 | <i>Verticillium albo-atrum</i>  | 2           |             |
|                     | 14-3-3-like protein                                                     | CAC20377.1     | 1,00E-43 | <i>Hypocrea jecorina</i>        | 1           |             |
|                     | adenylate cyclase                                                       | ABP88728.1     | 1,00E-50 | <i>Hypocrea virens</i>          | 1           |             |
|                     | cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit/PKA regulatory subunit | Q86ZN7.1       | 5,00E-55 | <i>Trichoderma atroviride</i>   | 1           |             |
|                     | G-protein complex alpha subunit GpaA/FadA                               | XP_002375854.1 | 9,00E-17 | <i>Aspergillus flavus</i>       | 1           | X           |
|                     | GTPase CDC42                                                            | AAK31624.1     | 3,00E-58 | <i>Colletotrichum trifolii</i>  | 1           |             |
|                     | GTPase-activating protein GYP5                                          | EEY19465.1     | 2,00E-20 | <i>Verticillium albo-atrum</i>  | 1           |             |
|                     | guanine nucleotide-binding protein beta subunit-like protein            | XP_001226350.1 | 8,00E-18 | <i>Chaetomium globosum</i>      | 1           |             |
|                     | hypothetical protein (GPI anchored protein)                             | XP_386740.1    | 2,00E-21 | <i>Gibberella zeae</i>          | 1           | X           |
|                     | MAP kinase Pmk1                                                         | BAE53432.1     | 1,00E-15 | <i>Hypocrea lixii</i>           | 1           |             |
|                     | protein hob3                                                            | XP_001591595.1 | 3,00E-08 | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> | 1           | X           |
|                     | protein phosphatase PP2A regulatory subunit A                           | EEY22610.1     | 1,00E-16 | <i>Verticillium albo-atrum</i>  | 1           |             |
|                     | protein phosphatase-Z-like serine/threonine protein phosphatase         | AAD09995.1     | 7,00E-15 | <i>Neurospora crassa</i>        | 1           | X           |
|                     | rab GDP-dissociation inhibitor                                          | XP_962059.1    | 1,00E-35 | <i>Neurospora crassa</i>        | 1           |             |
|                     | Rho1 guanine nucleotide exchange factor 1                               | EEY15560.1     | 3,00E-29 | <i>Verticillium albo-atrum</i>  | 1           |             |
|                     | Sec7 domain-containing protein                                          | EEY17023.1     | 3,00E-54 | <i>Verticillium albo-atrum</i>  | 1           |             |
|                     | serine/threonine-protein kinase psk1                                    | EEY18778.1     | 7,00E-05 | <i>Verticillium albo-atrum</i>  | 1           |             |
|                     | serine/threonine-protein phosphatase PP-X isozyme 1                     | EEY14764.1     | 4,00E-17 | <i>Verticillium albo-atrum</i>  | 1           |             |
|                     | Small COPII coat GTPase sar1                                            | P78976.1       | 5,00E-13 | <i>Hypocrea jecorina</i>        | 1           | X           |

|                             |                                                              |                |          |                                     |    |   |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------|----------|-------------------------------------|----|---|
|                             | Type I phosphodiesterase / nucleotide pyrophosphatase family | XP_002379173.1 | 1,00E-32 | <i>Aspergillus flavus</i>           | 1  |   |
| <b>Processamento de RNA</b> | translation elongation factor 1 alpha                        | AAR16425.1     | 1,00E-71 | <i>Metarhizium anisoplae</i>        | 10 | X |
|                             | Elongation factor 1-alpha                                    | P34825.1       | 2,00E-40 | <i>Hypocrea jecorina</i>            | 6  | X |
|                             | RNP domain-containing protein                                | EEY14625.1     | 1,00E-39 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 4  |   |
|                             | Lsm14a protein                                               | EEY19479.1     | 6,00E-30 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 2  | X |
|                             | translation elongation factor EF-1 alpha subunit             | XP_750388.2    | 8,00E-17 | <i>Aspergillus fumigatus</i>        | 2  |   |
|                             | zinc finger protein RTS2                                     | EEY13967.1     | 5,00E-29 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 2  | X |
|                             | C6 zinc finger protein                                       | EEY23292.1     | 8,00E-34 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1  | X |
|                             | elongation factor 1 alpha                                    | ABD24256.1     | 5,00E-16 | <i>Cordyceps brongniartii</i>       | 1  | X |
|                             | elongation factor 1-beta                                     | XP_959625.1    | 2,00E-34 | <i>Neurospora crassa</i>            | 1  | X |
|                             | elongation factor 1-gamma                                    | XP_961215.1    | 2,00E-42 | <i>Neurospora crassa</i>            | 1  |   |
|                             | elongation factor Tu                                         | XP_001936196.1 | 1,00E-26 | <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> | 1  |   |
|                             | pre-mRNA splicing factor ISY1                                | XP_965804.1    | 7,00E-45 | <i>Neurospora crassa</i>            | 1  |   |
|                             | probable transcription factor BTF3a                          | CAE76548.1     | 4,00E-14 | <i>Neurospora crassa</i>            | 1  | X |
|                             | RING-1                                                       | ABG78603.1     | 1,00E-22 | <i>Gibberella zeae</i>              | 1  |   |
|                             | RNA polymerase II subunit                                    | AAX11028.1     | 7,00E-09 | <i>Zignoella ovoidea</i>            | 1  |   |
|                             | RNA12                                                        | EEY19150.1     | 3,00E-23 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1  |   |
|                             | small nuclear ribonucleoprotein Sm D2                        | XP_961124.2    | 6,00E-49 | <i>Neurospora crassa</i>            | 1  | X |
|                             | Ste12                                                        | ACM80357.1     | 7,00E-36 | <i>Fusarium oxysporum</i>           | 1  |   |
|                             | TATA binding protein                                         | ACB30147.1     | 1,00E-41 | <i>Epichloe festucae</i>            | 1  |   |
|                             | transcription factor                                         | EEY21976.1     | 2,00E-22 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1  |   |
|                             | Transcriptional activator hac1                               | Q8TFF3.1       | 5,00E-39 | <i>Hypocrea jecorina</i>            | 1  |   |
|                             | U2 snRNP component prp10                                     | XP_964047.1    | 3,00E-61 | <i>Neurospora crassa</i>            | 1  |   |
|                             | U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm6                     | Q2HAN0.2       | 3,00E-23 | <i>Chaetomium globosum</i>          | 1  |   |
|                             | Zinc finger transcription factor ace1                        | Q9P8W3.1       | 5,00E-43 | <i>Hypocrea jecorina</i>            | 1  |   |
|                             | density-regulated protein                                    | EEQ34712.1     | 1,00E-17 | <i>Microsporum canis</i>            | 1  | X |
| <b>Resposta a stress</b>    | MAC1 interacting protein                                     | EEY16549.1     | 1,00E-08 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1  |   |
|                             | norsolorinic acid reductase                                  | XP_961973.2    | 2,00E-27 | <i>Neurospora crassa</i>            | 5  |   |
|                             | heat shock protein 90                                        | ACF93232.1     | 4,00E-59 | <i>Humicola fuscoatra</i>           | 3  |   |
|                             | 78 kDa glucose-regulated protein precursor                   | XP_956567.1    | 3,00E-69 | <i>Neurospora crassa</i>            | 1  |   |
|                             | bacilysin biosynthesis oxidoreductase bacC                   | EEY21846.1     | 2,00E-37 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1  |   |
|                             | grpE(hsp70 similar)                                          | EEY19303.1     | 9,00E-13 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1  |   |
|                             | heat shock protein SSB1 (hsp70)                              | XP_964602.2    | 7,00E-52 | <i>Neurospora crassa</i>            | 1  |   |
|                             | Pc12g07300                                                   | XP_002557565.1 | 3,00E-24 | <i>Penicillium chrysogenum</i>      | 1  |   |
|                             | peroxiredoxin PRX1                                           | XP_959621.1    | 2,00E-13 | <i>Neurospora crassa</i>            | 1  |   |
|                             | siderophore iron transporter mirB                            | EEQ35862.1     | 4,00E-28 | <i>Microsporum canis</i>            | 1  |   |
|                             | small heat shock protein                                     | AAX55622.1     | 1,00E-31 | <i>Hypocrea lixii</i>               | 1  | X |
|                             | stress response RCI peptide                                  | EER38374.1     | 4,00E-08 | <i>Ajellomyces capsulatus</i>       | 1  |   |
|                             | stress-activated MAP kinase                                  | AAAY82585.1    | 5,00E-46 | <i>Hypocrea lixii</i>               | 1  |   |
|                             | trichothecene 3-O-acetyltransferase                          | XP_001269085.1 | 1,00E-28 | <i>Aspergillus clavatus</i>         | 1  |   |
|                             | unnamed protein product (glutaredoxin, stress induced )      | XP_001911220.1 | 6,00E-10 | <i>Podospora anserina</i>           | 1  |   |
|                             |                                                              |                |          |                                     |    |   |
|                             |                                                              |                |          |                                     |    |   |
| <b>Destino protéico</b>     | ubiquitin                                                    | XP_001538414.1 | 3,00E-50 | <i>Ajellomyces capsulatus</i>       | 6  | X |

|                    |                                                               |                |          |                                      |   |   |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|----------------|----------|--------------------------------------|---|---|
|                    | cyclophilin, cytosolic form                                   | CAA88042.1     | 1,00E-30 | <i>Tolypocladium inflatum</i>        | 5 |   |
|                    | ubiquitin fusion protein                                      | AAC13689.1     | 2,00E-63 | <i>Magnaporthe grisea</i>            | 3 | X |
|                    | Pc21g14130                                                    | XP_002568429.1 | 0,0003   | <i>Penicillium chrysogenum</i>       | 2 |   |
|                    | 10 kDa chaperonin                                             | XP_001931022.1 | 2,00E-05 | <i>Pyrenophora tritici-repentis</i>  | 1 |   |
|                    | 26S proteasome regulatory subunit rpn-1                       | EEY22185.1     | 6,00E-52 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 |   |
|                    | deubiquitination-protection protein dph1                      | EEY17577.1     | 2,00E-30 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 | X |
|                    | ERp38                                                         | CAA68847.1     | 6,00E-49 | <i>Neurospora crassa</i>             | 1 |   |
|                    | hit family protein                                            | EEY21319.1     | 3,00E-46 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 |   |
|                    | methionine aminopeptidase 1                                   | EEQ90109.1     | 2,00E-12 | <i>Ajellomyces dermatitidis</i>      | 1 |   |
|                    | peroxin 26                                                    | EEY22794.1     | 3,00E-20 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 |   |
|                    | proteasome subunit alpha type 3                               | XP_367823.1    | 7,00E-47 | <i>Magnaporthe grisea</i>            | 1 | X |
|                    | Rab5-like protein ypt51                                       | XP_955952.1    | 2,00E-17 | <i>Neurospora crassa</i>             | 1 |   |
|                    | senescence-associated protein                                 | EEH16716.1     | 1,00E-10 | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | 1 |   |
|                    | thioredoxin                                                   | ACT21200.1     | 7,00E-10 | <i>Beauveria bassiana</i>            | 1 | X |
|                    | thioredoxin-like protein                                      | ACY01406.1     | 3,00E-54 | <i>Hypocrea virens</i>               | 1 | X |
|                    | ubiquitin-conjugating enzyme E2                               | XP_001587931.1 | 3,00E-16 | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>      | 1 |   |
|                    | UBX domain-containing protein                                 | EEY15848.1     | 1,00E-12 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 |   |
|                    | vacuolar protease A                                           | ACF20292.1     | 6,00E-05 | <i>Trichoderma aureoviride</i>       | 1 |   |
|                    | cytosolic non-specific dipeptidase                            | EEY14307.1     | 2,00E-24 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 |   |
|                    | dipeptidyl peptidase III                                      | XP_002624916.1 | 1,00E-26 | <i>Ajellomyces capsulatus</i>        | 1 | X |
|                    | tripeptidyl peptidase precursor                               | AAQ89573.1     | 8,00E-34 | <i>Beauveria bassiana</i>            | 1 |   |
| <b>Metabolismo</b> | manganese superoxide dismutase                                | CAC83814.1     | 5,00E-35 | <i>Podospira anserina</i>            | 3 | X |
|                    | dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase                                | EEY20676.1     | 3,00E-43 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 |   |
|                    | nucleoside diphosphate kinase A                               | EEQ29020.1     | 5,00E-39 | <i>Microsporum canis</i>             | 8 | X |
|                    | cobalamin-independent methionine synthase                     | AAQ73630.1     | 3,00E-52 | <i>Epichloe festucae</i>             | 5 |   |
|                    | putative enolase                                              | ABG77525.1     | 6,00E-29 | <i>Beauveria bassiana</i>            | 4 | X |
|                    | acetyl-coenzyme A synthetase                                  | EEY19297.1     | 4,00E-62 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 3 |   |
|                    | formate dehydrogenase                                         | XP_001224918.1 | 1,00E-23 | <i>Chaetomium globosum</i>           | 3 | X |
|                    | formyltetrahydrofolate deformylase                            | XP_958310.1    | 5,00E-28 | <i>Neurospora crassa</i>             | 3 | X |
|                    | N-terminal acetyltransferase C complex catalytic subunit MAK3 | EEY23608.1     | 1,00E-35 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 3 |   |
|                    | phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase                   | EEY18800.1     | 5,00E-58 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 3 | X |
|                    | phosphoserine aminotransferase                                | EEY13986.1     | 5,00E-17 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 3 | X |
|                    | putative aldehyde dehydrogenase                               | ABG77527.1     | 5,00E-17 | <i>Beauveria bassiana</i>            | 3 |   |
|                    | threonine synthase, putative                                  | EER29381.1     | 5,00E-30 | <i>Coccidioides posadasii</i>        | 3 | X |
|                    | transketolase                                                 | EEY14530.1     | 4,00E-38 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 3 |   |
|                    | 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase               | CAJ41062.1     | 6,00E-48 | <i>Hypocrea lixii</i>                | 2 |   |
|                    | 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase                           | XP_956614.1    | 8,00E-53 | <i>Neurospora crassa</i>             | 2 |   |
|                    | carboxylesterase family protein                               | XP_001262756.1 | 4,00E-22 | <i>Neosartorya fischeri</i>          | 2 |   |
|                    | glycerol kinase                                               | EEY19695.1     | 7,00E-54 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 2 |   |
|                    | hydantoinase/oxoprolinase, putative                           | XP_001276011.1 | 3,00E-34 | <i>Aspergillus clavatus</i>          | 2 |   |
|                    | hypothetical protein (L-serin dehidratase)                    | EEU44680.1     | 1,00E-28 | <i>Nectria haematococca</i>          | 2 | X |
|                    | hypothetical protein (sulfur metabolism)                      | XP_001393002.1 | 1,00E-10 | <i>Aspergillus niger</i>             | 2 |   |

|                                                                 |                |          |                                     |   |   |
|-----------------------------------------------------------------|----------------|----------|-------------------------------------|---|---|
| malate dehydrogenase                                            | XP_962927.1    | 3,00E-73 | <i>Neurospora crassa</i>            | 2 | X |
| minor allergen Alt a 7                                          | XP_965630.2    | 1,00E-14 | <i>Neurospora crassa</i>            | 2 | X |
| saccharopine dehydrogenase                                      | XP_964977.1    | 1,00E-37 | <i>Neurospora crassa</i>            | 2 |   |
| serine palmitoyltransferase                                     | EEY21312.1     | 6,00E-39 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 2 |   |
| sideroflexin-5                                                  | XP_001940879.1 | 7,00E-09 | <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> | 2 |   |
| superoxide dismutase                                            | EEY22851.1     | 1,00E-20 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 2 |   |
| FK506-binding protein 1B                                        | EEY14704.1     | 7,00E-24 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1 |   |
| 2-methylcitrate dehydratase, putative                           | XP_002143351.1 | 9,00E-15 | <i>Penicillium marneffeii</i>       | 1 |   |
| 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase                           | EEY18450.1     | 7,00E-09 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1 |   |
| 3-ketoacyl-CoA thiolase                                         | EEY22470.1     | 6,00E-34 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1 | X |
| acetolactate synthase small subunit                             | EEY15485.1     | 1,00E-27 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1 |   |
| acetyl-CoA carboxylase, putative                                | XP_002478864.1 | 6,00E-08 | <i>Talaromyces stipitatus</i>       | 1 |   |
| aconitate hydratase                                             | EEY21324.1     | 1,00E-59 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1 |   |
| acyl-CoA dehydrogenase, putative                                | XP_002376988.1 | 2,00E-16 | <i>Aspergillus flavus</i>           | 1 |   |
| acyl-CoA desaturase 1                                           | XP_961824.1    | 3,00E-11 | <i>Neurospora crassa</i>            | 1 |   |
| adenosylhomocysteinase                                          | XP_001224259.1 | 1,00E-41 | <i>Chaetomium globosum</i>          | 1 | X |
| anterior fat body protein, putative                             | XP_002483642.1 | 3,00E-10 | <i>Talaromyces stipitatus</i>       | 1 |   |
| argininosuccinate synthase                                      | XP_963976.1    | 2,00E-27 | <i>Neurospora crassa</i>            | 1 |   |
| aspartate aminotransferase                                      | EER23619.1     | 2,00E-12 | <i>Coccidioides posadasii</i>       | 1 |   |
| bifunctional D12/D15 fatty acid desaturase                      | ABB88516.1     | 8,00E-23 | <i>Gibberella moniliformis</i>      | 1 |   |
| cystathionine gamma-synthase                                    | EEQ35549.1     | 1,00E-16 | <i>Microsporum canis</i>            | 1 |   |
| Cysteine synthase                                               | XP_387463.1    | 7,00E-16 | <i>Gibberella zeae</i>              | 1 | X |
| DAHP synthase (Phe)                                             | XP_963757.1    | 1,00E-24 | <i>Neurospora crassa</i>            | 1 |   |
| fructose-bisphosphate aldolase                                  | XP_001556818.1 | 2,00E-33 | <i>Botryotinia fuckeliana</i>       | 1 | X |
| Fum16                                                           | ACB12561.1     | 2,00E-09 | <i>Fusarium oxysporum</i>           | 1 |   |
| glucose-6-phosphate isomerase                                   | CAG38420.1     | 7,00E-46 | <i>Hypocrea jecorina</i>            | 1 |   |
| glutaminyl cyclase, putative                                    | XP_001271721.1 | 2,00E-11 | <i>Aspergillus clavatus</i>         | 1 |   |
| glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                        | ACB87489.1     | 4,00E-44 | <i>Hypocrea virens</i>              | 1 | X |
| GNAT family acetyltransferase, putative                         | XP_001259077.1 | 8,00E-17 | <i>Neosartorya fischeri</i>         | 1 | X |
| GS1 protein                                                     | EEY22265.1     | 3,00E-17 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1 |   |
| HAD superfamily hydrolase                                       | EEY14225.1     | 3,00E-16 | <i>Nectria haematococca</i>         | 1 | X |
| homoserine acetyltransferase family protein                     | XP_001940705.1 | 1,00E-28 | <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> | 1 |   |
| hypothetical protein (isopentenyl-diphosphate delta-isomerase ) | XP_001223855.1 | 2,00E-11 | <i>Chaetomium globosum</i>          | 1 |   |
| hypothetical protein (serine palmitoyltransferase )             | XP_388121.1    | 4,00E-10 | <i>Gibberella zeae</i>              | 1 | X |
| KLTH0F03586p                                                    | XP_002554366.1 | 3,00E-09 | <i>Lachancea thermotolerans</i>     | 1 |   |
| methionine synthase                                             | AAF33834.1     | 2,00E-22 | <i>Passalora fulva</i>              | 1 |   |
| N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase                     | EEY21894.1     | 1,00E-09 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1 | X |
| nicotinate phosphoribosyltransferase                            | EEY21238.1     | 4,00E-19 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1 |   |
| ornithine decarboxylase                                         | ABM55741.1     | 1,00E-33 | <i>Epichloe festucae</i>            | 1 |   |
| orotate phosphoribosyltransferase                               | CAA39364.1     | 6,00E-06 | <i>Hypocrea jecorina</i>            | 1 |   |
| Pc18g03210                                                      | XP_002562161.1 | 5,00E-33 | <i>Penicillium chrysogenum</i>      | 1 |   |
| pentafunctional AROM polypeptide                                | XP_001931678.1 | 3,00E-14 | <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> | 1 |   |

|                                            |                                                                              |                |          |                                      |    |   |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------|--------------------------------------|----|---|
|                                            | pentalenene synthase, putative                                               | XP_002149866.1 | 1,00E-23 | <i>Penicillium marneffei</i>         | 1  |   |
|                                            | phosphatidylserine synthase                                                  | EEH48868.1     | 1,00E-12 | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | 1  |   |
|                                            | phosphoglucomutase                                                           | EEY20062.1     | 1,00E-28 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1  |   |
|                                            | phosphoglucomutase 2                                                         | XP_963704.1    | 7,00E-13 | <i>Neurospora crassa</i>             | 1  |   |
|                                            | Phosphoglycerate kinase                                                      | P14228.1       | 3,00E-55 | <i>Hypocrea jecorina</i>             | 1  | X |
|                                            | phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase | XP_002148981.1 | 3,00E-25 | <i>Penicillium marneffei</i>         | 1  |   |
|                                            | phytanoyl-CoA dioxygenase family protein                                     | XP_002483788.1 | 2,00E-32 | <i>Talaromyces stipitatus</i>        | 1  |   |
|                                            | polyketide synthase, putative                                                | EER28768.1     | 3,00E-20 | <i>Coccidioides posadasii</i>        | 1  |   |
|                                            | predicted protein (GPI transamidase )                                        | EEU38360.1     | 1,00E-15 | <i>Nectria haematococca</i>          | 1  | X |
|                                            | putative histidine biosynthesis trifunctional protein                        | CAX65442.1     | 5,00E-44 | <i>Gibberella fujikuroi</i>          | 1  |   |
|                                            | putative N-acetylglutamate synthase                                          | ACV69991.1     | 6,00E-06 | <i>Glomerella acutata</i>            | 1  |   |
|                                            | putative pyruvate decarboxylase                                              | BAE98181.1     | 5,00E-32 | <i>Fusarium oxysporum</i>            | 1  |   |
|                                            | pyruvate decarboxylase                                                       | XP_959717.2    | 4,00E-30 | <i>Neurospora crassa</i>             | 1  |   |
|                                            | related to sphingosine-1-phosphate lyase                                     | CAE85512.1     | 5,00E-51 | <i>Neurospora crassa</i>             | 1  |   |
|                                            | SSM1                                                                         | EEY14634.1     | 5,00E-15 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1  |   |
|                                            | succinate semialdehyde dehydrogenase                                         | EER38484.1     | 4,00E-14 | <i>Ajellomyces capsulatus</i>        | 1  |   |
|                                            | Sulfate adenyltransferase                                                    | Q4I1N3.2       | 7,00E-24 | <i>Gibberella zeae</i>               | 1  |   |
|                                            | sulfite reductase, putative                                                  | XP_002480232.1 | 1,00E-43 | <i>Talaromyces stipitatus</i>        | 1  |   |
|                                            | transaldolase                                                                | XP_366548.1    | 7,00E-09 | <i>Magnaporthe grisea</i>            | 1  |   |
|                                            | transferase family protein                                                   | EEQ35859.1     | 6,00E-23 | <i>Microsporum canis</i>             | 1  |   |
|                                            | transketolase TktA                                                           | XP_001268905.1 | 2,00E-12 | <i>Aspergillus clavatus</i>          | 1  |   |
|                                            | two-component histidine kinase                                               | ACX32464.1     | 1,00E-08 | <i>Fusarium oxysporum</i>            | 1  |   |
|                                            | tyrosinase 2                                                                 | CAL90884.1     | 2,00E-11 | <i>Hypocrea jecorina</i>             | 1  | X |
|                                            | UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase                                  | XP_964453.2    | 1,00E-35 | <i>Nectria haematococca</i>          | 1  |   |
|                                            | valacyclovir hydrolase, putative                                             | XP_002381660.1 | 2,00E-29 | <i>Aspergillus flavus</i>            | 1  |   |
|                                            | xylitol dehydrogenase                                                        | AAO42466.1     | 2,00E-30 | <i>Hypocrea jecorina</i>             | 1  | X |
|                                            | triacylglycerol lipase                                                       | ABG79930.1     | 6,00E-17 | <i>Magnaporthe grisea</i>            | 1  | X |
| <b>Interação com o ambiente</b>            | QI74 protein                                                                 | CAA64974.1     | 3,00E-90 | <i>Hypocrea lixii</i>                | 55 |   |
|                                            | hydrophobin                                                                  | ABS59379.1     | 7,00E-14 | <i>Hypocrea virens</i>               | 7  |   |
|                                            | hydrophobin 1                                                                | AAZ66376.1     | 1,00E-27 | <i>Trichoderma asperellum</i>        | 4  | X |
|                                            | adhesin protein Mad1                                                         | ABC65821.1     | 9,00E-11 | <i>Metarhizium anisopliae</i>        | 1  |   |
|                                            | class II hydrophobin                                                         | ABN64104.1     | 2,00E-23 | <i>Hypocrea lixii</i>                | 1  | X |
|                                            | Fasciclin domain family                                                      | XP_001268829.1 | 3,00E-06 | <i>Aspergillus clavatus</i>          | 1  |   |
| <b>Enzimas relacionadas ao biocontrole</b> | beta-mannosidase                                                             | XP_002145901.1 | 7,00E-16 | <i>Penicillium marneffei</i>         | 2  |   |
|                                            | glucanase B                                                                  | EEY24054.1     | 1,00E-41 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 12 | X |
|                                            | exochitinase                                                                 | AAB47060.1     | 2,00E-79 | <i>Hypocrea lixii</i>                | 9  |   |
|                                            | serin endopeptidase                                                          | CAL25575.1     | 6,00E-49 | <i>Hypocrea lixii</i>                | 6  | X |
|                                            | chitinase - 33kDa                                                            | CAA56315.1     | 2,00E-93 | <i>Hypocrea lixii</i>                | 5  |   |
|                                            | Cel3b                                                                        | AAP57755.1     | 1,00E-51 | <i>Hypocrea jecorina</i>             | 4  |   |
|                                            | P1 protein (b-1,6-glucanase)                                                 | CAC80490.1     | 3,00E-18 | <i>Hypocrea lixii</i>                | 2  | X |

|                                  |                                                             |                |          |                                     |   |   |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------|----------|-------------------------------------|---|---|
|                                  | peptidase family T4                                         | EER45139.1     | 3,00E-07 | <i>Ajellomyces capsulatus</i>       | 2 |   |
|                                  | dienelactone hydrolase                                      | XP_001227463.1 | 3,00E-26 | <i>Chaetomium globosum</i>          | 2 | X |
|                                  | peptidase S41 family protein                                | XP_002384408.1 | 2,00E-10 | <i>Aspergillus flavus</i>           | 1 |   |
|                                  | alpha-glucosidase                                           | EEY21948.1     | 4,00E-39 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1 |   |
|                                  | beta-1,3-exoglucanase                                       | ABY19519.1     | 6,00E-39 | <i>Trichoderma asperellum</i>       | 1 |   |
|                                  | bifunctional catalase-peroxidase Cat2                       | XP_001275126.1 | 8,00E-26 | <i>Aspergillus clavatus</i>         | 1 |   |
|                                  | carboxypeptidase Y                                          | EEY17000.1     | 2,00E-07 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1 |   |
|                                  | chitinase                                                   | CAA56315.1     | 1,00E-18 | <i>Hypocrea lixii</i>               | 1 |   |
|                                  | chitosanase                                                 | BAD08218.2     | 1,00E-08 | <i>Aspergillus oryzae</i>           | 1 |   |
|                                  | endo-1,3(4)-beta-glucanase                                  | XP_748630.1    | 6,00E-45 | <i>Aspergillus fumigatus</i>        | 1 |   |
|                                  | glucan endo-1,3-alpha-glucanase agn1 precursor              | XP_002152547.1 | 7,00E-32 | <i>Penicillium marneffeii</i>       | 1 |   |
|                                  | Glucan endo-1,3-beta-glucanase                              | P53626.1       | 6,00E-28 | <i>Hypocrea lixii</i>               | 1 |   |
|                                  | glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor                  | XP_002478358.1 | 5,00E-18 | <i>Talaromyces stipitatus</i>       | 1 |   |
|                                  | glycoside hydrolase family 76 (endo-1,6-alpha-mannosidase ) | EEU42734.1     | 5,00E-30 | <i>Nectria haematococca</i>         | 1 |   |
|                                  | hypothetical protein (endo-b-1,3-glucanase)                 | XP_382584.1    | 1,00E-06 | <i>Gibberella zeae</i>              | 1 |   |
|                                  | lipase                                                      | EEQ32224.1     | 1,00E-44 | <i>Microsporum canis</i>            | 1 | X |
|                                  | mannan endo-1,6-alpha-mannosidase                           | EEY23504.1     | 3,00E-14 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1 |   |
|                                  | muramidase, putative                                        | XP_002484015.1 | 4,00E-17 | <i>Talaromyces stipitatus</i>       | 1 |   |
|                                  | putative aspartate protease                                 | CAC17811.1     | 2,00E-68 | <i>Hypocrea lixii</i>               | 1 |   |
|                                  | SUN domain-containing protein                               | EEQ87523.1     | 1,00E-27 | <i>Ajellomyces dermatitidis</i>     | 1 |   |
|                                  | trypsin-like protease                                       | CAC80694.2     | 2,00E-60 | <i>Hypocrea lixii</i>               | 1 | X |
| <b>Facilitação do transporte</b> | outer mitochondrial membrane protein porin                  | XP_960950.1    | 4,00E-32 | <i>Neurospora crassa</i>            | 7 | X |
|                                  | stomatin-2                                                  | EEY19322.1     | 3,00E-25 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 2 |   |
|                                  | hexose transporter                                          | CBA11544.1     | 3,00E-43 | <i>Glomerella graminicola</i>       | 6 |   |
|                                  | aquaporin-3                                                 | EEY19696.1     | 5,00E-47 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 5 |   |
|                                  | putative peptide transporter                                | CAI30793.1     | 4,00E-44 | <i>Hypocrea lixii</i>               | 4 |   |
|                                  | high affinity copper transporter                            | XP_001941918.1 | 5,00E-05 | <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> | 3 |   |
|                                  | Sulfate transporter family protein                          | EER28055.1     | 1,20E-03 | <i>Coccidioides immitis</i>         | 3 |   |
|                                  | cytoplasm protein                                           | EEY18286.1     | 2,00E-54 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 2 |   |
|                                  | ER-derived vesicles protein ERV29                           | EEY19794.1     | 7,00E-19 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 2 |   |
|                                  | MFS transporter, putative                                   | XP_001262379.1 | 8,00E-30 | <i>Neosartorya fischeri</i>         | 2 |   |
|                                  | pantothenate transporter liz1                               | EEY22931.1     | 2,00E-09 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 2 |   |
|                                  | potassium transporter, putative                             | XP_001273808.1 | 1,00E-16 | <i>Aspergillus clavatus</i>         | 2 |   |
|                                  | proline-specific permease                                   | EEY22799.1     | 1,00E-08 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 2 |   |
|                                  | transporter-like protein                                    | AAX07640.1     | 7,00E-17 | <i>Magnaporthe grisea</i>           | 2 |   |
|                                  | carboxylic acid transport protein                           | AAO33825.1     | 4,00E-15 | <i>Beauveria bassiana</i>           | 1 |   |
|                                  | DUF895 domain membrane protein                              | XP_747457.1    | 2,00E-15 | <i>Aspergillus flavus</i>           | 1 |   |
|                                  | high-affinity glucose transporter SNF3                      | EEY16130.1     | 2,00E-38 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1 |   |
|                                  | hypothetical protein ( MFS transporter region)              | XP_001262184.1 | 1,00E-46 | <i>Neosartorya fischeri</i>         | 1 |   |
|                                  | importin alpha subunit                                      | XP_960652.1    | 2,00E-08 | <i>Neurospora crassa</i>            | 1 | X |
|                                  | kelch repeat-containing protein                             | EEY15640.1     | 5,00E-37 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1 |   |
|                                  | MFS monosaccharide transporter, putative                    | XP_002379197.1 | 1,00E-19 | <i>Aspergillus flavus</i>           | 1 |   |

|                |                                                                                    |                |          |                                     |   |   |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------|-------------------------------------|---|---|
|                | MSF1                                                                               | EEY15600.1     | 2,00E-31 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1 | X |
|                | nuclear transport factor NTF-2, putative                                           | XP_002479611.1 | 1,00E-12 | <i>Talaromyces stipitatus</i>       | 1 |   |
|                | oligopeptide transporter, putative                                                 | XP_002149499.1 | 1,00E-20 | <i>Penicillium marneffeii</i>       | 1 |   |
|                | peptide transporter                                                                | ACP19535.1     | 2,00E-11 | <i>Cadophora finlandica</i>         | 1 |   |
|                | quinase permease                                                                   | EEY17275.1     | 3,00E-22 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1 |   |
|                | SNARE domain-containing protein                                                    | EEY19447.1     | 2,00E-11 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1 |   |
|                | SNARE protein, putative                                                            | XP_369339.2    | 1,00E-36 | <i>Magnaporthe grisea</i>           | 1 | X |
|                | SSOI                                                                               | ABL74455.1     | 1,00E-17 | <i>Hypocrea jecorina</i>            | 1 |   |
|                | stomatin-like protein                                                              | BAB68403.1     | 6,00E-07 | <i>Gibberella fujikuroi</i>         | 1 |   |
|                | transporter protein smf2                                                           | EEQ31220.1     | 3,00E-14 | <i>Microsporum canis</i>            | 1 |   |
|                | v-SNARE                                                                            | EEY17898.1     | 5,00E-09 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1 |   |
| <b>Energia</b> | cytochrome P450 51B                                                                | ACL93392.1     | 3,00E-62 | <i>Gibberella zeae</i>              | 4 |   |
|                | cytochrome P450 51                                                                 | XP_964049.2    | 5,00E-09 | <i>Neurospora crassa</i>            | 1 |   |
|                | NADPH-cytochrome P450 reductase                                                    | XP_964443.1    | 1,00E-27 | <i>Neurospora crassa</i>            | 1 |   |
|                | probable benzoate 4-monooxygenase cytochrome P450                                  | CAD21305.1     | 1,00E-15 | <i>Neurospora crassa</i>            | 1 | X |
|                | ATP synthase gamma chain                                                           | EEY18828.1     | 5,00E-22 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 7 |   |
|                | ATP synthase D chain                                                               | EEY15942.1     | 1,00E-43 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 5 | X |
|                | ADP,ATP CARRIER PROTEIN                                                            | XP_386197.1    | 1,00E-26 | <i>Gibberella zeae</i>              | 4 | X |
|                | ATP synthase protein 9                                                             | XP_386224.1    | 7,00E-27 | <i>Neurospora crassa</i>            | 4 |   |
|                | Mitochondrial protein potentially involved in regulation of respiratory metabolism | NP_690845.1    | 9,00E-17 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>     | 4 |   |
|                | pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase family protein                       | XP_002378793.1 | 4,00E-27 | <i>Aspergillus flavus</i>           | 4 |   |
|                | aldo/keto reductase, putative                                                      | XP_002373595.1 | 4,00E-15 | <i>Aspergillus flavus</i>           | 3 | X |
|                | cytochrome c                                                                       | XP_001225547.1 | 1,00E-31 | <i>Chaetomium globosum</i>          | 3 |   |
|                | cytochrome c oxidase polypeptide V                                                 | XP_001228192.1 | 3,00E-29 | <i>Chaetomium globosum</i>          | 3 |   |
|                | ferric reductase                                                                   | XP_001935759.1 | 3,00E-20 | <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> | 3 |   |
|                | mitochondrial-processing peptidase subunit beta                                    | EEY21127.1     | 1,00E-62 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 3 | X |
|                | suaprga1                                                                           | EEY17155.1     | 3,00E-08 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 3 | X |
|                | ATP synthase alpha chain-like protein                                              | AAX07676.1     | 7,00E-32 | <i>Magnaporthe grisea</i>           | 2 |   |
|                | cytochrome b5                                                                      | XP_002378178.1 | 3,00E-29 | <i>Aspergillus flavus</i>           | 2 |   |
|                | cytochrome b-c1 complex subunit Rieske                                             | EEY15077.1     | 3,00E-49 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 2 | X |
|                | cytochrome c oxidase assembly protein COX19                                        | EEY19731.1     | 7,00E-31 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 2 |   |
|                | glycogen phosphorylase                                                             | EEY18288.1     | 4,00E-61 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 2 |   |
|                | NADH-ubiquinone oxidoreductase 78 kDa subunit                                      | XP_385374.1    | 5,00E-43 | <i>Gibberella zeae</i>              | 2 |   |
|                | ADP-ribosylation factor, putative                                                  | XP_002341722.1 | 3,00E-38 | <i>Talaromyces stipitatus</i>       | 1 |   |
|                | alcohol oxidase p68                                                                | AAK14990.1     | 2,00E-18 | <i>Cochliobolus victoriae</i>       | 1 |   |
|                | ATP synthase beta chain                                                            | XP_001228182.1 | 2,00E-38 | <i>Chaetomium globosum</i>          | 1 |   |
|                | ATP synthase subunit alpha                                                         | XP_001937880.1 | 1,00E-18 | <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> | 1 |   |
|                | ATP-binding cassette sub-family D member 1                                         | EEY19608.1     | 1,00E-55 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1 |   |
|                | ATP-citrate-lyase                                                                  | CAA10666.1     | 2,00E-34 | <i>Gibberella pulicaris</i>         | 1 | X |
|                | calcium-transporting ATPase                                                        | EEY16351.1     | 3,00E-17 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1 |   |
|                | CBP4 domain-containing protein                                                     | EEY15950.1     | 4,00E-06 | <i>Verticillium albo-atrum</i>      | 1 |   |
|                | CHCH domain protein                                                                | XP_002486149.1 | 9,00E-15 | <i>Talaromyces stipitatus</i>       | 1 |   |

|                                             |                                                           |                |          |                                      |    |   |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------|----------|--------------------------------------|----|---|
|                                             | cytochrome b-c1 complex subunit 7                         | EEY14506.1     | 1,00E-22 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1  |   |
|                                             | cytochrome c oxidase polypeptide II                       | NP_570154.1    | 6,00E-30 | <i>Hypocrea jecorina</i>             | 1  |   |
|                                             | cytochrome c oxidase polypeptide VI                       | XP_961010.1    | 5,00E-09 | <i>Neurospora crassa</i>             | 1  |   |
|                                             | cytochrome c1, heme protein                               | XP_001219976.1 | 2,00E-30 | <i>Chaetomium globosum</i>           | 1  |   |
|                                             | electron transfer flavoprotein alpha-subunit              | XP_962674.2    | 2,00E-52 | <i>Neurospora crassa</i>             | 1  |   |
|                                             | ferric-chelate reductase, putative                        | XP_002479556.1 | 2,00E-19 | <i>Talaromyces stipitatus</i>        | 1  |   |
|                                             | flavin containing polyamine oxidase, putative             | XP_002384541.1 | 6,00E-49 | <i>Aspergillus flavus</i>            | 1  |   |
|                                             | Flavin-binding monooxygenase-like family protein          | EER28767.1     | 5,00E-06 | <i>Coccidioides posadasii</i>        | 1  |   |
|                                             | kynurenine 3-monooxygenase, putative                      | XP_002483537.1 | 2,00E-25 | <i>Talaromyces stipitatus</i>        | 1  |   |
|                                             | L-ascorbate peroxidase                                    | EEY18112.1     | 4,00E-07 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1  |   |
|                                             | long chain fatty alcohol oxidase                          | XP_001940486.1 | 4,00E-18 | <i>Pyrenophora tritici-repentis</i>  | 1  |   |
|                                             | mitochondrial phosphate carrier protein Mir1              | XP_365668.2    | 3,00E-31 | <i>Magnaporthe grisea</i>            | 1  |   |
|                                             | monooxygenase                                             | EEY19274.1     | 7,00E-20 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1  | X |
|                                             | NADH dehydrogenase (ubiquinone) 29/21K chain              | CAD70991.1     | 2,00E-36 | <i>Neurospora crassa</i>             | 1  |   |
|                                             | NADH:ubiquinone oxidoreductase 13.4kD subunit             | EEY21440.1     | 1,00E-16 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1  | X |
|                                             | NADH2 dehydrogenase 14K chain                             | EEY21438.1     | 3,00E-22 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1  | X |
|                                             | NADH-ubiquinone oxidoreductase 21.3 kDa subunit           | EEH37543.1     | 3,00E-14 | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | 1  |   |
|                                             | NADH-ubiquinone oxidoreductase 49 kDa subunit             | EEY18596.1     | 8,00E-11 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1  | X |
|                                             | NADH-ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit             | XP_389426.1    | 6,00E-26 | <i>Gibberella zeae</i>               | 1  |   |
|                                             | plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase                    | ABV53589.1     | 6,00E-55 | <i>Trichoderma hamatum</i>           | 1  |   |
|                                             | plastocyanin-like domain-containing protein               | EEU37926.1     | 5,00E-20 | <i>Nectria haematococca</i>          | 1  |   |
|                                             | probable oligomycin sensitivity conferring protein (ATP5) | CAB91368.2     | 1,00E-17 | <i>Neurospora crassa</i>             | 1  |   |
|                                             | Riboflavin kinase                                         | A4QQ05.2       | 5,00E-15 | <i>Magnaporthe grisea</i>            | 1  |   |
|                                             | short-chain dehydrogenase                                 | EEH08892.1     | 4,00E-12 | <i>Ajellomyces capsulatus</i>        | 1  |   |
|                                             | short-chain dehydrogenases/reductase                      | XP_002485894.1 | 8,00E-11 | <i>Talaromyces stipitatus</i>        | 1  |   |
|                                             | Vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit          | XP_390178.1    | 6,00E-30 | <i>Gibberella zeae</i>               | 1  | X |
|                                             | vacuolar ATP synthase catalytic subunit A                 | EEU44765.1     | 3,00E-64 | <i>Nectria haematococca</i>          | 1  |   |
|                                             | vacuolar ATP synthase subunit H                           | EEY18316.1     | 4,00E-26 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1  | X |
| <b>Ciclo celular e processamento de DNA</b> | Mmc protein                                               | ACN92038.1     | 6,00E-14 | <i>Metarhizium anisopliae</i>        | 10 |   |
|                                             | histone H4                                                | XP_368084.1    | 9,00E-33 | <i>Magnaporthe grisea</i>            | 9  |   |
|                                             | cross-pathway control 1                                   | CAP20091.1     | 6,00E-43 | <i>Gibberella fujikuroi</i>          | 7  | X |
|                                             | histone H3                                                | XP_956003.1    | 1,00E-69 | <i>Neurospora crassa</i>             | 5  | X |
|                                             | HMG box-containing protein                                | EEU48659.1     | 2,00E-38 | <i>Nectria haematococca</i>          | 5  |   |
|                                             | histone H2B                                               | XP_361035.1    | 2,00E-36 | <i>Magnaporthe grisea</i>            | 3  | X |
|                                             | nuclear segregation protein (Bfr1), putative              | XP_002479253.1 | 3,00E-09 | <i>Talaromyces stipitatus</i>        | 3  |   |
|                                             | conidiation-specific protein 10                           | XP_962483.1    | 1,00E-25 | <i>Neurospora crassa</i>             | 2  |   |
|                                             | conidiation-specific protein, putative                    | XP_002146063.1 | 2,00E-22 | <i>Penicillium marneffeii</i>        | 2  |   |
|                                             | Histone H2A                                               | Q2HH37.2       | 5,00E-42 | <i>Hypocrea lixii</i>                | 2  |   |
|                                             | microtubule-associated protein                            | ACB47221.1     | 1,00E-59 | <i>Gibberella zeae</i>               | 2  |   |
|                                             | histone H4 arginine methyltransferase RmtA                | XP_002479941.1 | 2,00E-15 | <i>Talaromyces stipitatus</i>        | 1  |   |
|                                             | annexin ANXC3.2                                           | XP_002143275.1 | 6,00E-06 | <i>Penicillium marneffeii</i>        | 1  |   |

|                             |                                                             |                |          |                                      |   |   |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------|----------|--------------------------------------|---|---|
|                             | ARP2/3 complex 20 kDa subunit                               | EEY15855.1     | 6,00E-25 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 | X |
|                             | cell division control protein 54                            | XP_965670.1    | 2,00E-13 | <i>Neurospora crassa</i>             | 1 | X |
|                             | cell morphogenesis protein PAG1                             | EEY22190.1     | 5,00E-50 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 |   |
|                             | DNA damage checkpoint protein rad24                         | XP_363662.1    | 1,00E-29 | <i>Magnaporthe grisea</i>            | 1 | X |
|                             | DNA-binding protein                                         | EEY14514.1     | 5,00E-13 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 |   |
|                             | HET domain-containing protein                               | EEQ31190.1     | 7,00E-06 | <i>Microsporum canis</i>             | 1 |   |
|                             | Histone H1                                                  | XP_660369.1    | 4,00E-15 | <i>Aspergillus nidulans</i>          | 1 |   |
|                             | histone H2A.Z                                               | EEY19578.1     | 3,00E-11 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 |   |
|                             | homeoprotein                                                | EEY20424.1     | 3,00E-17 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 |   |
|                             | hypothetical protein (tropomyosin, putative)                | XP_387619.1    | 6,00E-16 | <i>Gibberella zeae</i>               | 1 | X |
|                             | nucleosome assembly protein                                 | EEU44608.1     | 9,00E-36 | <i>Nectria haematococca</i>          | 1 |   |
|                             | related to sporulation protein SPO72                        | CAD70986.1     | 7,00E-64 | <i>Neurospora crassa</i>             | 1 |   |
|                             | SNF2-family ATP dependent chromatin remodeling factor snf21 | XP_957128.1    | 4,00E-30 | <i>Neurospora crassa</i>             | 1 |   |
|                             | translin                                                    | EEY14523.1     | 8,00E-05 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 | X |
| <b>Síntese de proteínas</b> | 60S ribosomal protein L10a                                  | EEY20615.1     | 3,00E-28 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 4 | X |
|                             | glutamyl-tRNA synthetase                                    | XP_958832.1    | 1,00E-37 | <i>Neurospora crassa</i>             | 4 |   |
|                             | 40S ribosomal protein S25                                   | XP_002478408.1 | 2,00E-08 | <i>Talaromyces stipitatus</i>        | 3 |   |
|                             | 60S ribosomal protein L3                                    | XP_001228124.1 | 4,00E-17 | <i>Chaetomium globosum</i>           | 3 |   |
|                             | 30S ribosomal protein S9                                    | XP_002622587.1 | 5,00E-58 | <i>Ajellomyces dermatitidis</i>      | 2 | X |
|                             | 60S ribosomal protein L35                                   | XP_001728409.1 | 1,00E-32 | <i>Neurospora crassa</i>             | 2 | X |
|                             | glycyl-tRNA synthetase                                      | EEY20680.1     | 1,00E-24 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 2 |   |
|                             | 40S ribosomal protein S19                                   | XP_001598413.1 | 7,00E-09 | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>      | 1 |   |
|                             | 40S ribosomal protein S19-B                                 | XP_001941051.1 | 6,00E-27 | <i>Pyrenophora tritici-repentis</i>  | 1 |   |
|                             | 40S ribosomal protein S1-like protein                       | AAX07667.1     | 3,00E-09 | <i>Magnaporthe grisea</i>            | 1 |   |
|                             | 40S ribosomal protein S21                                   | EEY23842.1     | 3,00E-10 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 | X |
|                             | 40S ribosomal protein S24                                   | EEY16026.1     | 1,00E-51 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 | X |
|                             | 40S RIBOSOMAL PROTEIN S5                                    | XP_386195.1    | 6,00E-13 | <i>Gibberella zeae</i>               | 1 |   |
|                             | 40S ribosomal protein S5-B                                  | EEY19481.1     | 1,00E-47 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 |   |
|                             | 40S ribosomal protein S7                                    | XP_001230167.1 | 2,00E-46 | <i>Chaetomium globosum</i>           | 1 |   |
|                             | 40S ribosomal protein S9                                    | XP_389072.1    | 6,00E-52 | <i>Gibberella zeae</i>               | 1 |   |
|                             | 50S ribosomal protein L11                                   | EEH40371.1     | 1,00E-09 | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | 1 |   |
|                             | 50S ribosomal protein L12                                   | XP_001221825.1 | 6,00E-26 | <i>Aspergillus clavatus</i>          | 1 |   |
|                             | 60S ribosomal protein L10-A-like protein                    | AAW69346.1     | 3,00E-43 | <i>Magnaporthe grisea</i>            | 1 | X |
|                             | 60S ribosomal protein L19                                   | XP_001552208.1 | 3,00E-17 | <i>Botryotinia fuckeliana</i>        | 1 | X |
|                             | 60S ribosomal protein L21-A                                 | EEY15874.1     | 3,00E-36 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 |   |
|                             | 60S ribosomal protein L23a                                  | EEY22534.1     | 9,00E-06 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 |   |
|                             | 60S ribosomal protein L32                                   | P34040.1       | 3,00E-29 | <i>Hypocrea lixii</i>                | 1 | X |
|                             | 60S ribosomal protein L33                                   | XP_958318.2    | 3,00E-30 | <i>Neurospora crassa</i>             | 1 |   |
|                             | 60S ribosomal protein L37a                                  | XP_001261157.1 | 4,00E-22 | <i>Neosartorya fischeri</i>          | 1 |   |
|                             | 60S ribosomal protein L43                                   | EEY22830.1     | 6,00E-31 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 |   |
|                             | 60S ribosomal protein L8                                    | XP_002383008.1 | 2,00E-32 | <i>Aspergillus flavus</i>            | 1 |   |
|                             | 60S ribosomal protein L9, putative                          | XP_002480697.1 | 2,00E-21 | <i>Talaromyces stipitatus</i>        | 1 |   |
|                             | eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D        | EEY19944.1     | 1,00E-48 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 | X |

|                                                      |                |          |                                      |    |   |
|------------------------------------------------------|----------------|----------|--------------------------------------|----|---|
| hypothetical protein (40S ribosomal protein S8)      | XP_380807.1    | 2,00E-19 | <i>Gibberella zeae</i>               | 1  | X |
| hypothetical protein (60S ribosomal protein L21)     | XP_389071.1    | 4,00E-24 | <i>Gibberella zeae</i>               | 1  | X |
| large subunit ribosomal protein L3                   | XP_360650.2    | 2,00E-45 | <i>Magnaporthe grisea</i>            | 1  |   |
| lysyl-tRNA synthetase                                | EEH17401.1     | 7,00E-23 | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | 1  |   |
| nascent polypeptide-associated complex subunit alpha | XP_002624550.1 | 4,00E-05 | <i>Ajellomyces dermatitidis</i>      | 1  |   |
| Pc16g08430                                           | XP_002561164.1 | 5,00E-10 | <i>Penicillium chrysogenum</i>       | 1  |   |
| phenylalanyl-tRNA synthetase                         | XP_001543169.1 | 2,00E-28 | <i>Ajellomyces capsulatus</i>        | 1  |   |
| ribosomal protein S5                                 | NP_570148.1    | 4,00E-18 | <i>Hypocrea jecorina</i>             | 20 | X |
| 40S ribosomal protein S26                            | XP_001227903.1 | 7,00E-43 | <i>Chaetomium globosum</i>           | 13 |   |
| 40S ribosomal protein S3                             | XP_002542517.1 | 4,00E-60 | <i>Uncinocarpus reesii</i>           | 11 | X |
| ribosomal protein S28                                | ABE68883.1     | 2,00E-66 | <i>Stachybotrys elegans</i>          | 10 | X |
| 60S acidic ribosomal protein P2                      | XP_002625564.1 | 6,00E-16 | <i>Ajellomyces capsulatus</i>        | 9  |   |
| 40S ribosomal protein S6                             | XP_001557655.1 | 1,00E-57 | <i>Botryotinia fuckeliana</i>        | 8  | X |
| 60S ribosomal protein L12                            | XP_961403.1    | 3,00E-63 | <i>Neurospora crassa</i>             | 8  | X |
| 60S ribosomal protein L24                            | XP_001270287.1 | 1,00E-30 | <i>Aspergillus clavatus</i>          | 8  | X |
| 40S ribosomal protein S12                            | XP_387468.1    | 6,00E-51 | <i>Gibberella zeae</i>               | 7  |   |
| 60S ribosomal protein L15                            | XP_001406316.1 | 4,00E-32 | <i>Magnaporthe grisea</i>            | 7  | X |
| 60S ribosomal protein L17                            | XP_382047.1    | 6,00E-44 | <i>Gibberella zeae</i>               | 7  | X |
| 60S ribosomal protein L25                            | XP_001221925.1 | 3,00E-27 | <i>Chaetomium globosum</i>           | 7  |   |
| 60S ribosomal protein L31                            | XP_965247.1    | 4,00E-48 | <i>Neurospora crassa</i>             | 7  | X |
| 60S ribosomal protein L36                            | Q9HFR7.1       | 6,00E-44 | <i>Trichoderma hamatum</i>           | 7  | X |
| 40S ribosomal protein S1                             | C7YTD6.1       | 1,00E-57 | <i>Nectria haematococca</i>          | 6  |   |
| 40S ribosomal protein S11                            | XP_001560156.1 | 6,00E-65 | <i>Botryotinia fuckeliana</i>        | 6  | X |
| 40S ribosomal protein S17                            | EEY22142.1     | 8,00E-70 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 6  | X |
| 60S ribosomal protein L11                            | XP_965640.2    | 3,00E-71 | <i>Neurospora crassa</i>             | 6  |   |
| 60S ribosomal protein L14-B                          | EEY15944.1     | 6,00E-54 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 6  | X |
| 60S ribosomal protein L20                            | EEY17743.1     | 5,00E-75 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 6  | X |
| 60S ribosomal protein L27a                           | XP_388032.1    | 4,00E-74 | <i>Gibberella zeae</i>               | 6  | X |
| 60S ribosomal protein L9-A                           | EEY18314.1     | 7,00E-70 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 6  | X |
| 40S ribosomal protein S10b                           | XP_001268320.1 | 4,00E-52 | <i>Aspergillus clavus</i>            | 5  | X |
| 40S ribosomal protein S20                            | XP_959239.1    | 2,00E-13 | <i>Neurospora crassa</i>             | 5  | X |
| 60S acidic ribosomal protein P1                      | EEY14513.1     | 3,00E-18 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 5  | X |
| 60S ribosomal protein L18                            | EEY20932.1     | 8,00E-50 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 5  |   |
| 60S ribosomal protein L23                            | XP_965587.1    | 4,00E-52 | <i>Neurospora crassa</i>             | 5  | X |
| 60S ribosomal protein L26                            | XP_001240171.1 | 8,00E-28 | <i>Coccidioides immitis</i>          | 5  | X |
| 60S ribosomal protein L29                            | XP_001550019.1 | 2,00E-31 | <i>Botryotinia fuckeliana</i>        | 5  | X |
| eukaryotic translation initiation factor 5A-2        | CBF74882.1     | 6,00E-53 | <i>Aspergillus nidulans</i>          | 5  |   |
| 40S ribosomal protein S13                            | XP_002542354.1 | 1,00E-30 | <i>Uncinocarpus reesii</i>           | 4  |   |
| 40S ribosomal protein S15                            | XP_965164.1    | 2,00E-39 | <i>Neurospora crassa</i>             | 4  | X |
| 40S ribosomal protein S18                            | XP_001557449.1 | 2,00E-63 | <i>Botryotinia fuckeliana</i>        | 4  | X |
| 40S ribosomal protein S27                            | XP_366796.1    | 7,00E-41 | <i>Magnaporthe grisea</i>            | 4  | X |
| 60S ribosomal protein L30-2                          | EER29484.1     | 1,00E-39 | <i>Coccidioides immitis</i>          | 4  | X |
| 60S ribosomal protein L37                            | EEY15930.1     | 2,00E-34 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 4  | X |
| 60S ribosomal protein L5                             | XP_001264474.1 | 4,00E-34 | <i>Neosartorya fischeri</i>          | 4  | X |

|                                           |                                                    |                |          |                                      |   |   |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------|----------|--------------------------------------|---|---|
|                                           | 60S ribosomal protein L7                           | EEY20796.1     | 3,00E-68 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 4 |   |
|                                           | translation initiation factor eIF-2B subunit alpha | EEH40314.1     | 1,00E-23 | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | 4 |   |
|                                           | 40S ribosomal protein S22                          | XP_957322.1    | 1,00E-60 | <i>Neurospora crassa</i>             | 3 | X |
|                                           | 60S acidic ribosomal protein P0                    | XP_958183.1    | 6,00E-45 | <i>Neurospora crassa</i>             | 3 | X |
|                                           | 60S ribosomal protein L27                          | XP_956611.1    | 4,00E-61 | <i>Neurospora crassa</i>             | 3 | X |
|                                           | 60S ribosomal protein L6-2                         | EEY18715.1     | 3,00E-52 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 3 | X |
|                                           | ribosomal protein L39                              | XP_359800.2    | 1,00E-22 | <i>Magnaporthe grisea</i>            | 3 | X |
|                                           | 40S ribosomal protein S29                          | XP_961514.1    | 5,00E-23 | <i>Neurospora crassa</i>             | 2 | X |
|                                           | 60S ribosomal protein L13                          | EEH03339.1     | 3,00E-38 | <i>Ajellomyces capsulatus</i>        | 2 | X |
|                                           | 60S ribosomal protein L22                          | EEY14462.1     | 2,00E-29 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 2 |   |
|                                           | 60S ribosomal protein L44                          | EEY14332.1     | 3,00E-55 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 2 | X |
|                                           | Gim complex component GIM3-like protein            | AAQ73631.1     | 6,00E-12 | <i>Epichloe festucae</i>             | 2 | X |
|                                           | peroxiredoxin-6                                    | XP_001937596.1 | 1,00E-60 | <i>Pyrenophora tritici-repentis</i>  | 2 | X |
|                                           | valyl-tRNA synthetase                              | EER28575.1     | 2,00E-32 | <i>Coccidioides posadasii</i>        | 2 |   |
|                                           | probable serine-tRNA ligase, cytosolic             | CAD70981.1     | 1,00E-32 | <i>Neurospora crassa</i>             | 1 | X |
|                                           | ribosomal protein L32                              | XP_002626513.1 | 1,00E-35 | <i>Ajellomyces dermatitidis</i>      | 1 |   |
|                                           | ribosomal protein L34-like protein                 | AAK58051.1     | 2,00E-37 | <i>Ophiostoma novo-ulmi</i>          | 1 |   |
|                                           | ribosomal protein L38e                             | XP_370455.1    | 1,00E-14 | <i>Magnaporthe grisea</i>            | 1 |   |
|                                           | ribosomal protein S4                               | XP_001537815.1 | 8,00E-44 | <i>Ajellomyces capsulatus</i>        | 1 |   |
|                                           | tryptophanyl-tRNA synthetase                       | EEY22293.1     | 4,00E-25 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 | X |
| <b>Biogênese de componentes celulares</b> | septum-promoting GTP-binding protein 1             | XP_001549877.1 | 1,00E-04 | <i>Botryotinia fuckeliana</i>        | 2 |   |
|                                           | 1,3-beta-glucanosyltransferase gel1                | EEY14426.1     | 4,00E-06 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 |   |
|                                           | class V chitin synthase                            | ABF20219.1     | 4,00E-45 | <i>Neotyphodium lolii</i>            | 1 |   |
|                                           | chitin synthase activator (Chs3), putative         | XP_002384249.1 | 4,30E-03 | <i>Aspergillus flavus</i>            | 2 |   |
|                                           | glycosyltransferase family 17                      | EEU43183.1     | 6,00E-27 | <i>Nectria haematococca</i>          | 1 |   |
|                                           | woronin body major protein                         | EER41322.1     | 1,00E-06 | <i>Ajellomyces capsulatus</i>        | 9 |   |
|                                           | HEX1                                               | AAQ56234.1     | 2,00E-52 | <i>Hypocrea jecorina</i>             | 6 |   |
|                                           | extracellular matrix protein precursor             | AAL47843.1     | 5,00E-08 | <i>Fusarium oxysporum</i>            | 4 | X |
|                                           | integral membrane protein                          | XP_002485797.1 | 7,00E-16 | <i>Talaromyces stipitatus</i>        | 2 | X |
|                                           | plasma membrane protein Pth11-like                 | XP_748897.2    | 8,00E-07 | <i>Aspergillus fumigatus</i>         | 1 |   |
|                                           | actin                                              | ADB44905.1     | 1,00E-34 | <i>Paecilomyces lilacinus</i>        | 4 | X |
|                                           | alpha-actinin-1                                    | EEY16717.1     | 9,00E-54 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 2 |   |
|                                           | actin related protein 2/3 complex                  | XP_001547812.1 | 6,00E-17 | <i>Botryotinia fuckeliana</i>        | 1 | X |
|                                           | alpha-tubulin                                      | ABK41144.1     | 6,00E-36 | <i>Hypocrea lixii</i>                | 1 |   |
|                                           | myosin regulatory light chain cdc4                 | XP_962359.2    | 4,00E-25 | <i>Neurospora crassa</i>             | 1 | X |
|                                           | myosin-2                                           | EEH39428.1     | 1,00E-09 | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | 1 |   |
| <b>Função desconhecida</b>                | alpha/beta hydrolase fold family protein           | EER23742.1     | 7,00E-16 | <i>Coccidioides immitis</i>          | 3 | X |
|                                           | glucose repressible protein Grg1                   | XP_753236.1    | 3,00E-23 | <i>Aspergillus fumigatus</i>         | 2 | X |
|                                           | Bys1 family protein                                | EEY16319.1     | 8,00E-13 | <i>Magnaporthe grisea</i>            | 1 | X |
|                                           | cellulose signalling related protein OOC1          | AAY25948.1     | 3,00E-36 | <i>Hypocrea jecorina</i>             | 1 |   |
|                                           | DUF866 domain-containing protein                   | EEY15424.1     | 5,00E-33 | <i>Verticillium albo-atrum</i>       | 1 | X |

|                                  |                |          |                                |     |   |
|----------------------------------|----------------|----------|--------------------------------|-----|---|
| glucose-repressible gene protein | EEY18129.1     | 4,00E-08 | <i>Verticillium albo-atrum</i> | 1   | X |
| Pc22g18670                       | XP_002565772.1 | 7,00E-07 | <i>Penicillium chrysogenum</i> | 1   | X |
| progesterone binding protein     | EEY14242.1     | 5,00E-44 | <i>Verticillium albo-atrum</i> | 1   | X |
| hypothetical protein             | EEU48641.1     | 2,00E-17 | <i>Nectria hematococca</i>     | 605 | X |

---

## 6. Conclusões

- Um banco de cDNA de *Trichoderma harzianum* durante o crescimento com *Fusarium solani* foi contruído;
- Genes ainda não identificados (proteínas hipotéticas) foram os mais representativos. O que é um indicativo de que é necessário mais estudos no que diz respeito à caracterização de genes de fungos. Somente algumas espécies de interesse econômico e médico são bem estudados;
- Grande parte dos genes identificados fazem parte das vias de síntese de proteínas; metabolismo de aminoácidos, lipídeos e carboidratos; metabolismo de energia (fosforilação oxidativa). Isto era esperado devido ao nosso banco ser de mRNA total, sem nenhum tipo de subtração e normalização;
- Genes envolvidos com o micoparasitismo foram bem representativos. Principalmente hidrolases como quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases e proteases. Estes já bastante descritos na literatura como envolvidos no controle biológico. Genes envolvidos na síntese de toxinas também foram encontrados;

- O seqüenciamento de mais clones se faz necessário devido à baixa redundância ainda da maioria das ESTs.

## 7. Perspectivas

Este trabalho foi pioneiro em nosso grupo no que diz respeito a bancos de cDNA bem sucedidos. Nossa expectativa é contruir um banco de dados com sequencias de genes da interação de *Trichoderma* com vários fitopatógenos de importância econômica para a nossa região. Estes bancos poderão ser utilizados para análises proteômicas, que já estão encaminhadas em nosso laboratório. Como também clonar genes específicos e estudar suas funções durante o micoparasitismo. O próximo passo agora é construir bibliotecas utilizando seqüenciamento de segunda geração. Nesse tipo de seqüenciamento a quantidade de dados obtidos é sigficativamente maior, o que abre novas perspectivas no estudo da interação *Trichoderma*/Fitopatógeno.

Como perspectiva para este banco especificamente, precisamos seqüenciar mais clones para aumetarmos um pouco a redundância, devido a alta complexidade do banco. Temos ainda como idéia fazer um banco controle com o *Trichoderma* crescido em presença de glicose, para se obter genes diferencialmente expressos e podermos analisar sua expressão por PCR em tempo real. Principalmente durante a interação *in vivo*, que mostraria o que realmente acontece na natureza.

## 8. Referencias Bibliográficas

ADACHI, K. HAMER, J.E. (1998) Divergent cAMP signaling pathways regulate growth and pathogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Plant Cell 10: 1361–1374.

ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25, 3389–3402.

ASKOLIN, S., PENTTILA, M., WOSTEN, H.A., NAKARI-SETALA, T. (2005) The *Trichoderma reesei* hydrophobin genes hfb1 and hfb2 have diverse functions in fungal development. FEMS Microbiology Letters 253:281–288.

BAKER, R. (1987). Mycoparasitism: ecology and physiology. Canadian journal. of Plant Pathology 9: 370 – 379.

BARTNICKI-GARCIA, S. (1968) Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. Annual Reviews Microbiology 22:87-108.

BENHAMOU, N. & CHET, I. (1993). Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. Phytopathology 83 (10): 1062 – 1071.

BENÍTEZ, T., RÍNCON, A.M., LIMÓN, M.C., CÓDON, A.C. (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7(4):249-60.

BROUGHTON, W.J., HERNANDEZ G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., Vanderleyden, J. (2003) Beans (*Phaseolus* spp.): model food legumes. *Plant Soil* 252: 55–128.

CAFÉ FILHO, A. C. & LOBO JR., M. (2000). Manejo de fatores físicos e culturais para controle de patógenos do solo. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 8: 267-301.

CALLAN, N. W., MATHRE, D. E., MILLER, J. B. & VAVRINA, C. S. (1997) Biological seed treatments: factors involved in efficacy. *HortScience* 32:179-183.

CARPENTER, M.A., STEWART, A., HIDGWAY, H.J. (2005) Identification of novel *Trichoderma hamatum* genes expressed during mycoparasitism using subtractive hybridisation. *FEMS Microbiology Letters* 251: 105–112.

CARY, J.W., WRIGHT, M., BHATNAGAR, D., LEE, R., CHU F. (1996) Molecular characterization of an *Aspergillus parasiticus* dehydrogenase gene, *norA*, located on the aflatoxin biosynthesis gene cluster. *Applied Environment Microbiology* 62:360-366.

CHOQUER, M., LEE, M., BAU, H., CHUNG, K. (2007) Deletion of a MFS transporter-like gene in *Cercospora nicotianae* reduces cercosporin toxin accumulation and fungal virulence. *FEBS Letters* 581:489–494

DIENER, S.E., DUNN-COLEMAN, N., FOREMAN, P., HOUFEK, T.D., TEUNISSEN, P.J., VAN SOLINGEN, P., DANKMEYER, L., MITCHELL, T.K., WARD, M., DEAN, R.A. (2004) Characterization of the protein processing and secretion pathways in a comprehensive set of expressed sequence tags from *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiology Letters*. 230(2):275-282

EGGERT, K., HOLMANN, J., HILLER, B., KRUSE, H.P., RAWEL, H.M., PAWELZIC, E. (2010) Effects of Fusarium Infection on the Phenolics in Emmer and Naked Barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010 Feb 9. [Epub ahead of print]

EL-KATATNY, M.H.; GUDELJ, M.; ROBRA, K.H.; ELNAGHY, M.A.; GUBITZ, G.M. (2001) Caracterization of a chitinase and na Endo- $\beta$ -1,3-Glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 Involved in control of the Phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56:137-143.

EWING, B., GREEN, P. (1998) Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. Error probabilities. *Genome Research* 8: 186-194

FRAVEL, D. R., LEWIS, J.A. & CHITTAMS, J. L. (1995) Alginate prill formulations of *Talaromyces flavus* with organic carriers for biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 85:165-168.

GROSCH R.; SCHERWINSKI K.; LOTTMANN J. E BERG G. (2006) Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community. *Mycology Research* 110: 1464-74.

GULLINO, M. L.& KUIJPERS, A. M. (1994) Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32:559-79.

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

HARAN, S., SCHINCKLER, H. & CHET, I. (1996) Molecular mechanism of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 142: 2312-2331.

HARMAN, G.E., BJORKMAN, T. (1998) Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement, in: G.E. Harman, C.P. Kubicek (Eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium*: vol. 2, Enzymes, Biological Control and Commercial Application, Taylor & Francis, London, UK, pp. 229–265.

HARMAN, G. E. (1991) Seed treatment for biological control of plant disease. *Crop Protection* 10:166-171.

HARMAN, G. E. (2000) Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* 84:377-393.

HARMAN, G.E., PETZOLDT, R., COMIS, A., CHEN, J. (2004) Interactions Between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and Maize Inbred Line Mo17 and Effects of These Interactions on Diseases Caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*. 94(2):147-53.

HERRERA-ESTRELLA, A. & CHET, I (1998). Biocontrol of bacteria and phitopathogenic fungi. In *Agriculture Biotechnology*. Ed. Arien Altman. Marcel Dekker, Inc. New York. Pp. 263-282.

HJELJORD, L. & TRONSMO, A. (1998) *Trichoderma and Gliocladium* in biological control: an overview. In: KUBICEK, P. & HARMAN, G. E. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium: basic biology, taxonomy and genetics*, vol. 2. Taylor & Francis, London, p.131-151.

HUANG, X., MADAN, A., (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, 9(9):868-77.

INBAR, J. & CHET, I. (1992). Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers. *Journal of Bacteriology* 174 (3): 1055-1059.

INBAR, J. & CHET, I. (1994). A newly isolated lectin from the plant pathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*: purification, characterization and role in mycoparasitism. *Microbiology* 140: 651-657.

JIANG, H., KANG, D.C., ALEXANDRE, D., FISHER, P.B. (2000) RaSH, a rapid subtraction hybridisation approach for identifying and cloning differentially expressed genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:12684– 12689

LIMA, A. L., Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de *Trichoderma* spp isolados de solo do cerrado brasileiro, Brasília – DF. UnB. IB / Departamento de Fitopatologia. Imprensa Universitária. 2002. 73p. (Tese de Doutorado).

LIU, P.G., YANG, Q. (2005) Identification of genes with a biocontrol function in *Trichoderma harzianum* mycelium using the expressed sequence tag approach. *Research Microbiology*, 156(3):416-423.

LOBO JR. (2002). Plant Pathogens in Brazil. In: Pimentel, D. Biological Invasions: Economic and Environmental Costs of Alien Plant, Animal, and Microbe Species. CRC Press, 69-88.

MARCELLO, C.M., STEINDORFF, A.S., SILVA, R.N., BATAUS, L.A.M., SILVA, S.P., ULHOA, C.J. (2008) Expression analysis of the exo-beta-1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. Microbiological Research.

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

MORISSETTE, D.C., DAUCH, A., BEECH, R., MASSON, L., BROUSSEAU, R., JABAJI-HARE, S. (2008) Isolation of mycoparasitic-related transcripts by SSH during interaction of the mycoparasite *Stachybotrys elegans* with its host *Rhizoctonia solani*. Current Genetics 53:67–80.

OARD, S.; RUSH, M.C. & OARD, J.H. (2004) Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*. Journal of Applied Microbiology, 97:169-180.

OLMEDO-MONFIL, V., MENDOZA, A., GOMEZ, I., CORTES, C., HERRERA-ESTRELLA, A. (2002) Multiple environmental signals determine the transcriptional activation of the mycoparasitism related gene *prb1* in *Trichoderma atroviride*. Molecular Genetics and Genomics 267:703–712

OMERO, C., INBAR, J., ROCHA-RAMIREZ, J., HERRERA-ESTRELLA, A., CHET, I. & HORWITZ, B.A. (1999). G-Proteins activators and cAMP promote

mycoparasitic behaviour in *Trichoderma harzianum*. Mycological Research 103(12): 1637-1642.

OZCENGİZ, G., ALAEDDINOĞLU, N.G., DEMAİN, A.L. (1990) Regulation of biosynthesis of bacilysin by *Bacillus subtilis*. Journal of Industrial Microbiology. 6(2):91-100.

ÖZCENGİZ, G., & ALAEDDINOĞLU, N.G. (1991) Bacilysin production and sporulation in *Bacillus subtilis*. Current Microbiology 23(2):61-64

PAPAVIZAS, G.C. (1985). *Trichoderma* and gliocadium: biology, ecology, and potential for biocontrol. Annual Review of Phitopatology 23: 23-54.

POLETO, I., MUNIZ, M. F. B., SECONI, D. E., SANTIN, D., WEBER, M. N. D., BLUME, E. (2006) Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*ilex paraguariensis* a. st.-hil.) na região do vale do Taquarí, RS. Ciência Florestal, Santa Maria, v. 16, n. 1, p. 1-10.

POZO, M.J., BAEK, J.M., GARCIA, J.M., KENERLEY, C.M. (2004) Functional analysis of *tvsp1*, a serine protease-encoding gene in the biocontrol agent *Trichoderma virens*. Fungal Genetics and Biology 41:336–348.

RAGSDALE, N. N. & SISLER, H. D. (1994) Social and political implications of managing plant diseases with decreased availability of fungicides in the United States. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32:545-57.

REY, R., OHNO, S., PINTOR-TORO, J.A., LLOBELL, A., BENITEZ, T. (1998) Unexpected homology between inducible cell wall protein QID74 of filamentous fungi and BR3 salivary protein of the insect *Chironomus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 6212-6216.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. (2001). *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SANZ, L., MONTERO, M., REDONDO, J., LLOBELL, A., MONTE, E. (2004) Expression of an  $\alpha$ -1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*. *FEBS Journal* 272: 493–499.

SCHERM, B., SCHMOLL, M., BALMAS, V., KUBICEK, C.P., MIGHELI, C. (2008) Identification of potential marker genes for *Trichoderma harzianum* strains with high antagonistic potential against *Rhizoctonia solani* by a rapid subtraction hybridization approach. *Current Genetics* 55(1):81-91.

SCHMOLL, M., KUBICEK, C.P. (2005) ooc1, a unique gene expressed only during growth of *Hypocrea jecorina* (anamorph: *Trichoderma reesei*) on cellulose. *Current Genetics* 48(2):126-33.

SCHMOLL, M., ZEILINGER, S., MACH, R.L., KUBICEK, C.P. (2004) Cloning of genes expressed early during cellulase induction in *Hypocrea jecorina* by a rapid subtraction hybridisation approach. *Fungal Genetics and Biology* 41:877–887.

SCHOFFELMEER, E.A.M., KLIS, F.M., SIETSMA, J.H., CORNELISSEN, B.J.C. (1999) The Cell Wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology* 27, 275–282.

SEIDL, V., SONG, L., LINDQUIST, E. GRUBER, S., KOPTCHINSKIY, A., ZEILINGER, S., SCHMOLL, M., MARTINEZ, P., SUN, J., GRIGORIEV, I., HERRERA-ESTRELLA, A., BAKER, E.S., KUBICEK, C.P. (2009) Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. *BMC Genomics* 10:567.

SILVA, R.N., DA SILVA, S.P., BRANDÃO, R.L. ULHOA, C.J. (2004). Regulation of Nacetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase produced by *Trichoderma harzianum*: evidence that cAMP controls its expression. *Research in Microbiology*. 155:667–71.

THRANE, C.; TRONSMO A.; JENSEN, D.F. (1997) Endo- $\beta$ -1,3-glucanase and cellulose from *Trichoderma harzianum*: Purification and partial characterization, induction of and biological activity against plant pathogenic *Pythium* spp. *European Journal of Plant Pathology* 103, p. 331-344.

VIAUD, M.C., BALHADERE P.V., TALBOT, N.J. (2002) A *Magnaporthe grisea* cyclophilin acts as a virulence determinant during plant infection. *Plant Cell* 14:917–930.

VITERBO, A., RAMOT, O., CHERNIN, L., CHET, I. (2002) Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Anton Leeuw Int J G* 81:549–556.

VIZCAÍNO, J.A., GONZÁLES, F.J., SUÁREZ, M.B., REDONDO, J., HEINRICH, J., DELGADO-JARANA, J., HERMOSA, R., GUTIÉRREZ, R., MONTE, E., LLOBELL, A., REY, M. (2006) Generation, annotation and analysis of ESTs from *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *BMC Genomics*, 7:193.

VIZCAÍNO, J.A., REDONDO, J. SUÁREZ, M.B., CARDOZA, R.E., HERMOSA, R., GONZÁLEZ F.J., REY, M., MONTE, E. (2007) Generation, annotation, and analysis of ESTs from four different *Trichoderma* strains grown under conditions related to biocontrol. *Applied Microbiology Biotechnology*, 75:853–862.

WANG, P., HEITMAN, J. (2005) The cyclophilins. *Genome Biology* 6:226.

WEINDLING, R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* 22:837-845, 1932.

ZACCARDELLI, M., VITALE, S., LUONGO, L., MERIGHI, M., CORAZZA, L. (2008) Morphological and Molecular Characterization of *Fusarium solani* Isolates. *Journal of Phytopathology* 156, 534–541.

ZEILINGER, S., & OMMAN, M. (2007) *Trichoderma* Biocontrol: Signal Transduction Pathways Involved in Host Sensing and Mycoparasitism. *Gene Regulation and Systems Biology*. 1: 227–234.

ZHANG, S., XIA, Y. (2008) Identification of genes preferentially expressed during microcycle conidiation of *Metarhizium anisopliae* using suppression subtractive hybridization. *FEMS Microbiology Letters* 286(1):71-7.

**Produção bibliográfica durante o mestrado:****- Artigos publicados em periódicos:**

1. Marcello, César Marcos ; Steindorff, Andrei Stecca ; da Silva, Silvana Petrofeza ; Silva, Roberto do Nascimento ; Mendes Bataus, Luiz Artur ; Ulhoa, Cirano José . Expression analysis of the exo-beta-1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiological Research*, v. 165, p. 75-81, 2010.
2. Nascimento Silva, Roberto ; Steindorff, Andrei Stecca ; Ulhoa, Cirano José ; Félix, Carlos Roberto . Involvement of G-alpha protein GNA3 in production of cell wall-degrading enzymes by *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) during mycoparasitism against *Pythium ultimum*. *Biotechnology Letters*, v. 31, p. 531-536, 2009.
3. Valdirene Neves Monteiro, Roberto do Nascimento Silva, Andrei Stecca Steindorff, Fabio Teles Costa, Eliane Ferreira Noronha, Carlos André Ornelas Ricart, Marcello Vale de Sousa, Marilene Henning Vainstein, Cirano José Ulhoa. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. *Current Microbiology* (Aceito para publicação)

- **Trabalhos apresentados em congressos:**

1. STEINDORFF, A. S.; Nascimento Silva, Roberto; NORONHA, E. F.; Coelho, A.S.G.; Ulhoa, Cirano José. Construção e análise de uma biblioteca de cDNA durante a interação de *Trichoderma harzianum* e *Fusarium solani*. In: VI Seminário de Pós-Graduação - COMPEEX, 2009, Goiânia. Anais do VI COMPEEX, 2009.
2. STEINDORFF, A. S.; Siqueira, S.J.L.; RAMADA, M. H. S.; C. J. Ulhoa. Crescimento e produção enzimática dos fungos *Trichoderma asperellum* (T-00) e *Trichoderma harzianum* (ALL-42) durante interação com *Rhizoctonia solani*. 2008. (Apresentação oral).