



Universidade de Brasília

Instituto de Biologia

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

**Análise Fenotípica de mutantes de *Trichoderma harzianum* TR274 na busca por genes com papel em seu crescimento e micoparasitismo**

Discente: Gabrielle Rosa Silva

Orientadora: Dra. Eliane Ferreira Noronha

Brasília, março de 2019

Universidade de Brasília  
Instituto de Biologia  
Departamento de Biologia Celular  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

**Análise Fenotípica de mutantes de *Trichoderma harzianum* TR274 na busca por genes com papel em seu crescimento e micoparasitismo**

Discente: Gabrielle Rosa Silva  
Orientadora: Dra. Eliane Ferreira Noronha

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

Brasília, março de 2019

Trabalho realizado no laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Banca examinadora:

Dra. Valdirene Neves Monteiro (UEG) – Membro externo

Dra. Janice Lisboa De Marco (UnB) – Membro interno

Dra. Eliane Ferreira Noronha (UnB) – Orientadora

Membro Suplente:

Dr. Ricardo Henrique Kruger (UnB)

## **Agradecimentos**

Agradeço imensamente à minha orientadora Dra. Eliane Ferreira Noronha que me deu a oportunidade de estar e trabalhar em uma instituição com uma proposta que englobava moléculas de interação entre dois organismos diferentes; que me recebeu de braços abertos e que com paciência me guiou nesta fase de amadurecimento, de aprendizagens e de transformação da minha vida.

Ao professor Dr. Cirano José Ulhoa (Universidade Federal de Goiás) e Dra. Valdirene Monteiro Neves (Universidade Estadual de Goiás) por terem me acolhido, apoiarem e apresentado esse universo tão lindo que é a ciência desde o ensino médio. Agradeço à eles por me apresentar a minha lindíssima orientadora que hoje faz parte da minha linha do tempo.

À minha avó, Maria, que sempre me apoiou nos estudos e que sempre me dizia para não parar de estudar. À minha mãe que também me apoiou e auxiliou psicologicamente, financeiramente nesta fase da minha vida.

À Marcus Vinícius que só me trouxe alegrias e felicidades, sempre me recebendo de sorriso aberto e que me trouxe suporte, carinho e atenção quando eu mais precisei.

Agradeço à todos do laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília, especialmente à Fran, ao Pedro, por me ajudar com análises, ao Jovane, Alonso, Sadia, Jéssica, Raul, Débora, Mário, Carol, Diandra, Helder.

Ao Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, principalmente aos professores, funcionários e colegas dos demais laboratórios.

À todos os amigos, colegas e pessoas que de maneira direta ou indireta contruíram para a realização desse trabalho.

# Sumário

<b>Resumo</b>	<b>i</b>
<b>Abstract</b>	<b>ii</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>iii</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>vi</b>
<b>Lista de Material Suplementar</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de Abreviatura</b>	<b>vii</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 Antagonismo de espécies de <i>Trichoderma</i> .....	3
1.2 Transformação genética aleatória de fungos mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	7
1.3 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e controle de doenças fúngicas em plantas.....	10
<b>2. Objetivos Geral e Específicos.....</b>	<b>12</b>
<b>3. Metodologia .....</b>	<b>13</b>
3.1 Microrganismos e manutenção dos fungos .....	13
3.2 Taxa de crescimento e esporulação.....	14
3.3 Análise morfológica das hifas e estruturas de reprodução.....	15
3.4 Atividade antagônica:	
3.4.1 Teste de confronto em placa.....	15
3.4.2 Análise da interação entre <i>T. harzianum</i> TR274, T25, T26, T40 e <i>S. sclerotiorum</i> em microscopia eletrônica de varredura.....	17
3.4.3 Análise da interação entre <i>T. harzianum</i> TR274, T25, T26, T40 com escleródios em microscopia eletrônica de varredura.....	17
3.5 Dosagem da atividade de hidrolases de parede celular fúngica .....	18
3.6 Identificação da modificação genética nos mutantes T25, T26 e T40.....	19
<b>4. Resultados e Discussões.....</b>	<b>23</b>
<b>5. Conclusão e Perspectivas.....</b>	<b>37</b>
<b>6. Referências Bibliográfica.....</b>	<b>38</b>

## RESUMO

Fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* possuem capacidade de parasitar fungos fitopatogênicos de solo e promover o crescimento e resistência a estresses bióticos e abióticos em plantas hospedeiras. Estas espécies já são vendidas comercialmente como biofertilizantes e bioprotetores, no entanto pouco se sabe dos mecanismos envolvidos neste processo. No presente trabalho, foram gerados mutantes de *T. harzianum* através da técnica de transformação aleatória mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para identificar genes com papel no crescimento e atividade antagônica desta espécie. Foram gerados 168 mutantes e destes T25, T26 e T40 apresentaram menor taxa de crescimento e esporulação em comparação com o isolado parental. As modificações genéticas nos mutantes também diminuíram a sua atividade antagônica, observada pelo teste de confronto em placas. No entanto, não foram visualizadas diferenças no padrão de enovelamento de hifas dos mutantes sobre as hifas de *Sclerotinia sclerotiorum* comparando-se com o fungo selvagem. A mutação no genoma dos mutantes T25 e T26 foi identificada em genes codificadores de proteínas hipotéticas, porém para o mutante T40, a mutação ocorreu no gene codificador da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, GAPDH. Os dados gerados neste trabalho mostraram que o padrão de crescimento e esporulação afetaram a interação dos fungos mutantes com o fungo *S. sclerotiorum*, porém testes adicionais deverão ser realizados para que se possa concluir este trabalho e entender o processo de interação entre *Trichoderma spp* e seus hospedeiros.

Palavras chave: *Trichoderma harzianum*; micoparasitismo; biocontrole

## ABSTRACT

Filamentous fungi of the genus *Trichoderma* have the ability to parasitize soil phytopathogenic fungi and promote growth and resistance to biotic and abiotic stresses in host plants. These species are already sold commercially as biofertilizers and bioprotectors, however little is known of the mechanisms involved in this process. In the present work, mutants of *T. harzianum* were generated through the random transformation technique mediated by *Agrobacterium tumefaciens* to identify genes with role in the growth and antagonistic activity of this species. 168 mutants were generated and of these T25, T26 and T40 showed lower growth rate and sporulation compared to the parent isolate. Genetic modifications in the mutants also decreased their antagonistic activity, as observed by the plaque confrontation test. However, no differences were observed in the pattern of mutant hyphae mutants on the hyphae of *Sclerotinia sclerotiorum* compared to wild fungus. The mutation in the T25 and T26 mutant genomes was identified in genes encoding hypothetical proteins, but for the T40 mutant, the mutation occurred in the gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH. The data generated in this work showed that the pattern of growth and sporulation affected the interaction of the mutant fungi with the *S. sclerotiorum* fungus, but additional tests should be performed in order to conclude this work and to understand the interaction process between *Trichoderma* spp and its hosts.

Keywords: *Trichoderma harzianum*; mycoparasitism; biocontrol

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 Morfologia característica de crescimento de *Trichoderma harzianum*. Colônia crescendo em meio BDA (A). Conidióforo (B). Conídios uninucleados (C) (Samuels et al., 2006). **Página 1.**

Figura 2. Mecanismo do micoparasitismo de *Hypocrea* / *Trichoderma* spp com seus hospedeiros. Figura alterada de (Druzhinina et al., 2011). **Página 5.**

Figura 3. Diagrama de Venn dos 3396 genes diferencialmente expressos, com expressão diminuída e aumentada em *T. harzianum* antes de estabelecer o contato com *Sclerotinia sclerotiorum* (BC), durante o contato (C) e após o contato (AC) (Steindorf, 2016). **Página 6.**

Figura 4 Plasmídeo Ti de *A.tumefaciens*. RB e LB, *right e left board* ou bordas direita e esquerda, são as regiões de flanqueamento do T-DNA, dos oncogenes e inseridas em um vetor binário. A região *vir* codifica as proteínas de transferência. Está confuso ainda. **Página 8.**

Figura 5. Um resumo do processo de transformação de fungos por *A.tumefaciens*. No passo (a), a molécula acetoseringona presente no meio de transformação é reconhecida pela bactéria, desencadeando (b) a expressão de genes dentro do DNA cromossômico. No estágio (c), o T-DNA é retirado do plasmídeo. Secreção do T-DNA (d). Na etapa (e), entrada do T-DNA na célula do fungo. No evento final (f), o T-DNA se insere no DNA cromossômico do fungo (Idnurm et al., 2017). **Página 9.**

Figura 6. Mapa do vetor pFAT-gfp utilizado na transformação de *Trichoderma harzianum* TR274. (RB) Borda direita do T-DNA. (LB) (em vermelho) borda esquerda do T-DNA (em verde). (*hph*) Gene de resistência a higromicina B de *E. coli*. (*trpC* 3') Sinal de terminação transcricional do gene *trpC* de *A. nidulans*.(Na p-gpd) Promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato de *A. nidulans*. (Gc p-gpd) promotor do gene gpd de *G. cingulata*. (Gc gpd 3') Sinal de terminação transcricional do gene *gpd* de *G. cingulata*. (Sp<sup>R</sup>) Gene de resistência a espectionomicina. (RK2 *oviV*) origem de replicação vegetativa rk2. (RL2 *oriI*) Origem de tranferêcnia RK2. (322 *ori*) Origem de replicação de pBR322. (*trfA*) Gne



de replicação de *trfA* de Rk2. (*gfp*) Gene da proteína verde fluorescente pGreen Lantern (Life Technologies). Fonte Fávaro, (2009). **Página 14.**

Figura 7. Esquema do método de Bell D. K., Wells H. D., (1982) para classificar linhagens de fungos antagônicos em ensaios de atividade antagônica em placa. ANT: Linhagens de fungos antagônicos, alterar por micoparasita. PAT: linhagens de patógenos. **Página 16.**

Figura 8. Mapa do vetor pCR 4-TOPO 4.0 kb. Figura obtida do manual fornecido pelo fabricante. **Página 21.**

Figura 9. Mapa do vetor pCR<sup>TM</sup>4-TOPO fechado com produto de PCR. Figura obtida do manual pelo fabricante. **Página 22.**

Figura 10. Linhagem parental TR274 (A) e os mutantes T25 (B), T26 (C) e T40 (D) após 10 dias de crescimento em meio BDA. **Página 23.**

Figura 11. Fotomicrografias dos fungos TR274 (A e B), T25 (C e D), T26 (E) e T40 (F). Estruturas morfológicas com a presença de hifas (H), septos (S), conídios (Co), filetes (F), clamidiósporos (Cl) e conidióforo (Cn). Aumento de 40x. **Página 24.**

Figura 12. Diâmetro de crescimento (8,5 cm de diâmetro) dos fungos TR274, T25, T26 e T40 nas horas de crescimento de 24, 48, 72 e 96 horas em crescimento em meio BDA (A) e meio mínimo (B). (<sup>a, b, c, d, e</sup>). As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado pelo acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = <0.001$ ). Todos os procedimentos de comparação múltipla emparelhados (Teste Tukey). **Página 26.**

Figura 13. Contagem de de conídios para o isolado parental TR274 e mutantes T25, T26 e T40. **Página 27.**

Figura 14. Teste de confronto em placa dos fungos TR274, T25, T26 e T40 (lado direito da placa) contra *Sclerotinia sclerotiorum* (lado esquerdo da placa) nos tempos de 7, 14 e 21 dias. **Página 28.**

Figura 15. Análise enzimática de  $\beta$  1,3-Glucanase (A) e Protease (B) nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas durante do crescimento em micélio autoclavado de *S. sclerotiorum*. (<sup>a</sup>

b, c, d, e, f, g). As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado pelo acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = <0.001$ ). Todos os procedimentos de comparação múltipla emparelhados (Teste Tukey). **Página 30.**

Figura 16. Eletromicrografia de varredura da região de contato entre as hifas (H) dos fungos TR274 (A; HTh), e mutantes T25 (B), T26 (C) e T40 (D) com o *S. sclerotiorum* (HSs) após 72 horas de interação. **Página 31.**

Figura 17. Eletromicrografia de varredura dos escleródios de *S. sclerotiorum* inoculados com o isolado selvagem e TR274 (A) e os mutantes, T25 (B), T26 (C) e T40 (D). (HTh=hifa *Trichoderma harzianum* TR274; HT25=hifa T25; HT26=hifa T26; HT40=hifa T40). **Página 33.**

Figura 18. Análise das sequências geradas dos mutantes T25 (A), T26 (B) e T40 (C) localizadas entre os sítios de EcoR1 (azul). **Página 34.**

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado BLASTn para os mutantes T25, T26 e T40. **Página 34.**

## LISTA DE ARQUIVO SUPLEMETAR

Tabela Suplementar 1. Primers utilizados na TAIL-PCR.  $T_m^{\circ}$ , temperatura de anelamento. **Página 49.**

Tabela Suplementar 2. Reagentes utilizados na reação de TAIL-PCR. \*Dados mostrados na tabela 3. **Página 49.**

Tabela Suplementar 3. Concentrações e volumes utilizados de cada primers aleatórios e degenerados utilizados **Página 50.**

Tabela Suplementar 4. Ciclagem da reação TAIL-PCR primária (Liu e Whittier, 1995). **Página 50.**

Tabela Suplementar 5. Ciclagem da reação TAIL-PCR secundária (Liu e Whittier, 1995). **Página 51.**

Tabela Suplementar 6. Ciclagem da reação TAIL-PCR terciária (Liu e Whittier, 1995). **Página 51.**

Arquivo suplementar 1: Crescimento Em Meio Mínimo- Análise Estatística **Página 52.**

Arquivo Suplementar 2: Crescimento em meio BDA- Análise Estatística **Página 56.**

Arquivo suplementar 3: Atividade De  $\beta$  1,3-Glucanase - Análise Estatística **Página 60.**

Arquivo suplementar 4: Atividade De Protease- Análise Estatística **Página 64.**

Arquivo Suplementar 5: Mutante T25 Primers Ad3 e Ad3 Liu **Página 67.**

Arquivo Suplementar 6: Mutante T26 Primers Ad5 e Ad5 Par **Página 71.**

Arquivo Suplementar 7: Mutante T40 Primers Ad3 e Ad2 Tsu **Página 75.**

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ATMT** – Agrobacterium tumefaciens Mediated Transformation

**BDA** – Batata Dextrose Ágar

**BLAST** - Basic Local Alignment Search Tool (Ferramenta básica de pesquisa por alinhamento local)

**GFP** – Green Fluorescent Protein (proteína verde fluorescente)

**JA** – Ácido Jasmônico

**LB** – Left Border (borda esquerda)

**MM**- Meio mínimo

**PCR** – Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)

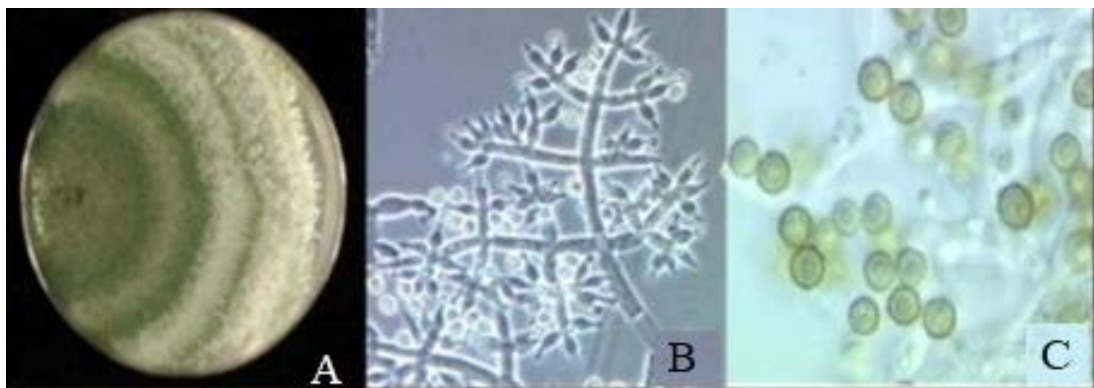
**ROS**- espécies reativas de oxigênio

**RB** – Right Border (borda direita)

**TAIL – PCR** - Thermal asymmetric interlaced PCR

## 1. INTRODUÇÃO

Fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* pertencem à família Hypocreaceae, da ordem Hypocreales, do filo Ascomycota. Quanto à morfologia a maioria das espécies dentro deste gênero se caracteriza pela alta produção de conídios, geralmente de coloração verde ou amarelada (Figura 1A), uninucleados e ovóides (Figura 1C). Em espécies de *Trichoderma*, a conidiação envolve a diferenciação do ápice nos conidióforos (Figura 1B) em uma célula reprodutiva especializada chamada de fiálide, que passa pelo processo de sucessivas divisões mitóticas formando os conídios (Betina & Zajacová 1978). Outro tipo de célula encontrada é o clamidósporo, que é um tipo de conídio resistente, com paredes espessas que pode sobreviver em condições ambientais desfavoráveis, como ausência de nutrientes, pH desfavorável e baixas temperaturas. Os clamidósporos são unicelulares, globosos a subglobosos, sendo formados dentro das hifas ou nas suas pontas (Staib & Morschhause 2007).



**Figura 1.** Morfologia característica de crescimento de *Trichoderma harzianum*. Colônia crescendo em meio BDA (A). Conidióforo (B). Conídios uninucleados (C) (Samuels et al., 2006).

As espécies deste gênero caracterizam-se ainda por utilizarem uma grande variedade de compostos como fonte de carbono e nitrogênio, serem resistentes a inibidores produzidos por outros microrganismos e tolerantes a diferentes tipos de fungicidas (Almeida et al, 2007). Além disto, tem alta taxa de crescimento e capacidade de degradar carboidratos estruturais e não estruturais. Estas características ecológicas os possibilitam competir e colonizar de forma eficiente diferentes biomas (Seidl et al, 2009).

Este gênero inclui fungos de solo, que podem ser saprófitas, micoparasitas ou simbiontes de plantas. As espécies micoparasitas tais como *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma harzianum* parasitam fungos fitopatogênicos de solo, por exemplo, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, inibindo seu crescimento ou levando o hospedeiro à morte (Nawrocka et al., 2017; Herrera-Téllez et al., 2019). A atividade micoparásita destas espécies e seu potencial de utilização como agentes de controle biológico foi reconhecido primeiramente por Weindling no começo da década de 1930, quando este autor descreveu a ação micoparásita de *Trichoderma* contra fungos do gênero *Rhizoctonia* e *Sclerotinia* e seus efeitos benéficos no controle das patologias causadas por estes fungos. (Rubio, M. B. et al., 2014; Waghunde, R. R. et al., 2016; Contreras-Cornejo et al., 2016).

Este trabalho pioneiro estimulou pesquisas nesta área e hoje produtos comerciais à base de *Trichoderma*, em sua maioria *T. harzianum* já são utilizados no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* (Benítez et al., 2004; Shores et al., 2010). Estes produtos representam uma alternativa sustentável para os tratamentos químicos poluentes, largamente utilizados no controle de doenças fúngicas em culturas no Brasil e no mundo (Błaszczuk et al. 2014; Ramada et al., 2015; Steindorff et al., 2012).

As espécies micoparasitas acima descritas se caracterizam também por estabelecer relações simbióticas com plantas hospedeiras colonizando o tecido radicular ou até mesmo o tecido vascular (Błaszczuk, L. et al. 2014; Druzhinina, et al. 2011; Guzmán-Guzmán, P. et al. 2017). A associação entre espécies de *Trichoderma* e plantas é benéfica para as hospedeiras, tendo como efeitos positivos, a promoção de crescimento, aumento da captação de nutrientes e indução de resistência a estresses bióticos e abióticos (Guzmán-Guzmán, P. et al., 2017; Rubio, M. B. et al., 2014; Błaszczuk, L. et al. 2014). Desta forma, além de sua aplicação como agentes de biocontrole *T. atroviride*, *T. virens*, *T. asperellum* e *T. harzianum* são estudadas para utilização como biofertilizadores e biofortificantes de plantas (Mukherjee et al., 2012). Assim como, visando a sua utilização na indução de resistência de plantas hospedeiras a agentes patogênicos (Guzmán-Guzmán, P. et al., 2017; Freitas, et al., 2013; Harman, G. E. et al, 2006).

O controle biológico ou biocontrole envolve o uso de organismos benéficos e seus produtos, para reduzir os efeitos negativos dos fitopatógenos e promover efeitos benéficos para a planta. Este é um processo dinâmico no qual organismos vivos são utilizados para inibir ou evitar o crescimento e proliferação de outros organismos (Pal et al., 2006). Foi primeiramente utilizado para controlar insetos, ácaros e ervas daninhas, posteriormente, sua aplicação tornou-se mais ampla e outros invertebrados, patógenos de plantas e mesmo alguns vertebrados são agora considerados alvos (Gal-Hemed et al., 2011).

A efetividade de um agente de biocontrole depende de sua habilidade de se estabelecer no bioma no qual será introduzido, e, portanto, é influenciada por fatores climáticos, por sua habilidade em competir por nutrientes e espaço, de resistir a efeitos inibitórios dos microrganismos que estão no mesmo ambiente, assim como, de se propagar (Gal-Hemed et al., 2011). Também é importante que o agente de biocontrole não afete a estrutura da comunidade microbiana nativa associada na região da rizosfera benéfica à planta hospedeira. Desta forma, ainda é necessária a busca por agentes de biocontrole mais eficientes e que atendam estas exigências. Em alternativa à busca por novos agentes de biocontrole, agentes com aplicação consolidada podem ser utilizados no desenvolvimento de novas linhagens.

### **1.1 Antagonismo de espécies de *Trichoderma***

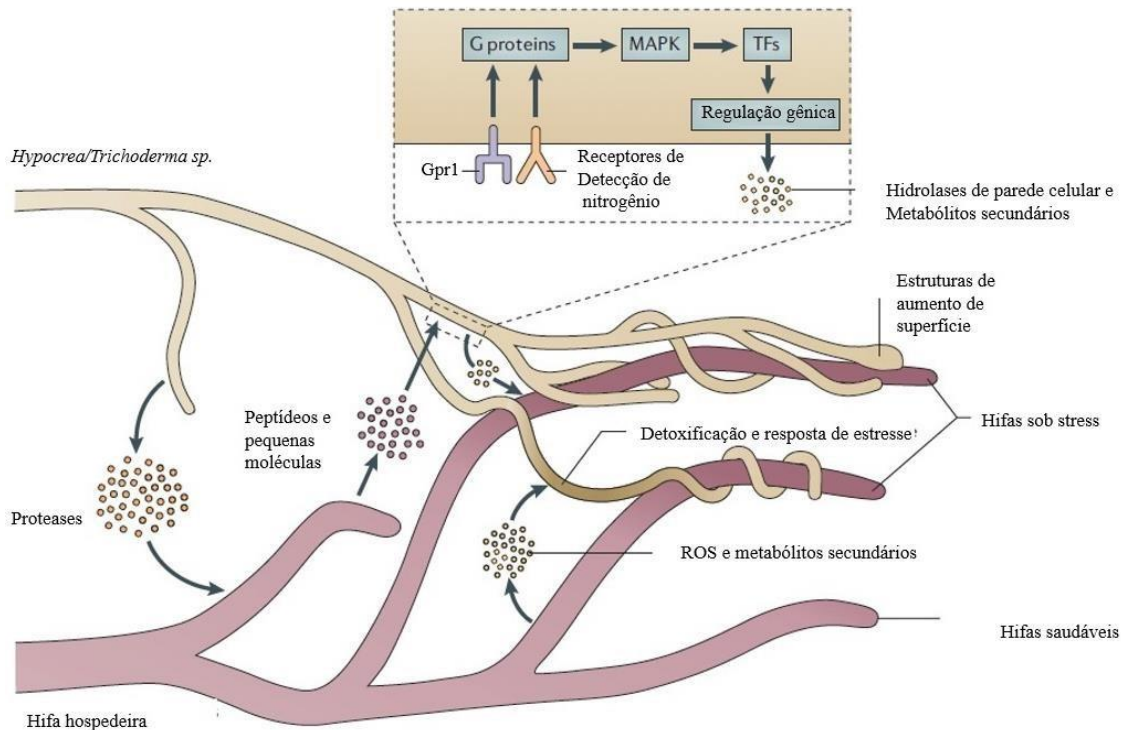
A atividade micoparasita ou antagonismo de *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. virens*, e *T. asperellum* contra seus hospedeiros envolve a combinação de diferentes mecanismos como competição, antibiose e micoparasitismo (Li et al., 2016). A competição pode ser pelo espaço, mas também por nutrientes. Seu crescimento rápido, alta taxa de conidiação e produção de sideróforos faz com que sejam eficientes competidores por espaço e nutrientes, limitando os fungos fitopatogênicos na rizosfera.

A antibiose é caracterizada pela produção de compostos com atividade antimicrobiana, dentro os quais, espécies reativas de oxigênio (ROS), peptídeos, policetídeos, pironas, terpenos voláteis e não voláteis que inibem o crescimento de microrganismos na rizosfera (Medina *et al.*, 2001; Stoppacher *et al.*, 2010; Atanasova et al. 2013; Li et al., 2016).



O micoparasitismo é um processo complexo que envolve eventos sequenciais, incluindo reconhecimento, contato entre micoparasita e hospedeiro, penetração das hifas hospedeiras por meio de degradação das estruturas celulares e morte do hospedeiro (Elad, 1995; Benitez et al., 2004; Druzhinina et al., 2011). Foi demonstrado para a espécie *T. atroviride* que receptores do tipo GPCRs, moléculas receptoras acopladas a proteínas G, tem papel no reconhecimento dos fungos hospedeiros por este micoparasita. Estes receptores interagem com moléculas sinalizadoras produzidas pelo hospedeiro e esta interação desencadeia uma série de eventos relacionados ao micoparasitismo, como: o crescimento do micoparasita em direção ao seu hospedeiro, aumento da expressão de genes que codificam enzimas para a biossíntese de metabólitos secundários e de hidrolases de parede celular fúngica (Harman et al., 2004; Xue et al., 2008; Omann et al., 2012). Mutantes de *T. atroviride* silenciados para o gene *gpr1* se tornam avirulentos em ensaios de confronto, sendo incapazes de se ligar e lisar as hifas de fungos hospedeiros (Omann et al., 2012).

O fungo micoparasita, portanto, reconhece o seu hospedeiro cresce em sua direção e estabelece o contato. Uma vez estabelecido o contato, as hifas dos micoparasitas se enrolam em torno das hifas dos fungos hospedeiros, formando estruturas denominadas apresoria, que aumentam a superfície de contato e favorecem a sua penetração direta na parede celular da hifa do hospedeiro (Rocha-Ramirez et al., 2002; Howell, 2003; Harman et al., 2004). Este contato também desencadeia uma cascata de sinalização mediada por proteínas G levando à atividade de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), que modulam as atividades de fatores de transcrição (TFs) e conseqüentemente desencadeiam a expressão de genes que codificam enzimas para a biossíntese de metabólitos secundários e de lise da parede celular, as hidrolases de parede celular fúngica, quitinases, proteases,  $\beta$ -glucanase, N-acetilglicosaminidase que levam ao rompimento da parede celular, resultando na morte das células hospedeiras (Figura 2) (Druzhinina et al., 2011; Omann et al., 2012; Mukherjee et al., 2012; Yao et al., 2016; Atanasova et al., 2018).



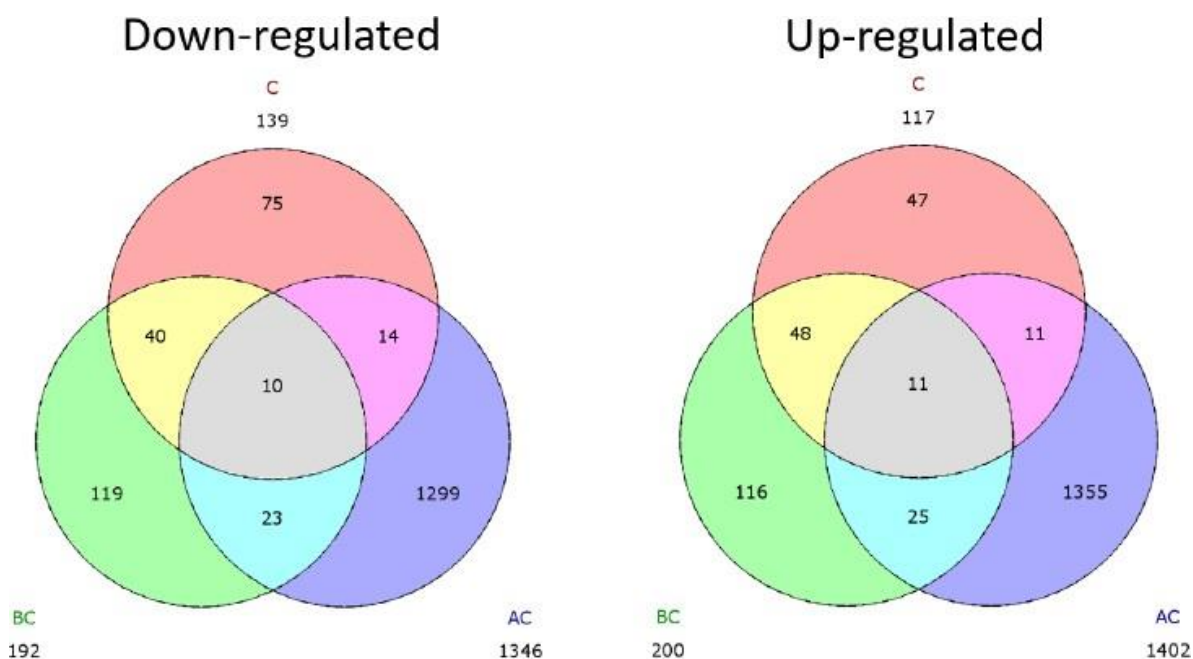
**Figura 2.** Mecanismo do micoparasitismo de *Hypocrea / Trichoderma* spp com seus hospedeiros. Figura alterada de (Druzhinina et al., 2011).

As quitinases, proteases,  $\beta$ -1,3glucanases,  $\beta$ -1,6glucanases e N-acetilglicosaminidases favorecem a penetração das hifas hospedeiras por sua ação na hidrólise da parede celular (Vinale et al., 2008; Druzhinina et al., 2011). A hidrólise da parede celular também favorece a ação dos peptídeos e metabólitos secundários com atividade antifúngica facilitando o acesso ao interior da hifa hospedeira (Atanasova et al., 2018).

A produção destas enzimas durante o micoparasitismo de espécies de *Trichoderma* já foi relatada na interação com diferentes fungos fitopatogênicos. Como por exemplo, no secretoma de *T. harzianum* cultivado na presença de parede celular de *Fusarium solani*, *S. sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani* (Almeida et al., 2007; Qualhato et al., 2013; Ramada et al., 2016).

Steindorff e colaboradores (2014) também demonstraram o aumento na expressão dos genes que codificam hidrolases de parede celular em *T. harzianum* cultivado na presença de parede celular do fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum*. Neste trabalho, foram mapeados 3396

genes diferencialmente expressos antes, durante e depois do contato do fungo micoparasita com as hifas de patógeno *S. sclerotiorum*, destes 392 foram antes do contato, 256 durante o contato e 2748 depois do contato (Figura 3) (Steindorf, 2016). Genes exclusivos também foram identificados em cada um dos estágios da interação. Além dos genes que codificam as hidrolases de parede celular fúngica, genes que codificam proteases, como a Peptidase S8, Peptidase C14, transportadores, *small cysteine rich proteins* e enzimas do metabolismo secundário também foram detectados como diferencialmente expressos (Steindorf, 2016).



**Figura 3.** Diagrama de Venn dos 3396 genes diferencialmente expressos, com expressão diminuída e aumentada em *T. harzianum* antes de estabelecer o contato com *Sclerotinia sclerotiorum* (BC), durante o contato (C) e após o contato (AC) (Steindorf, 2016).

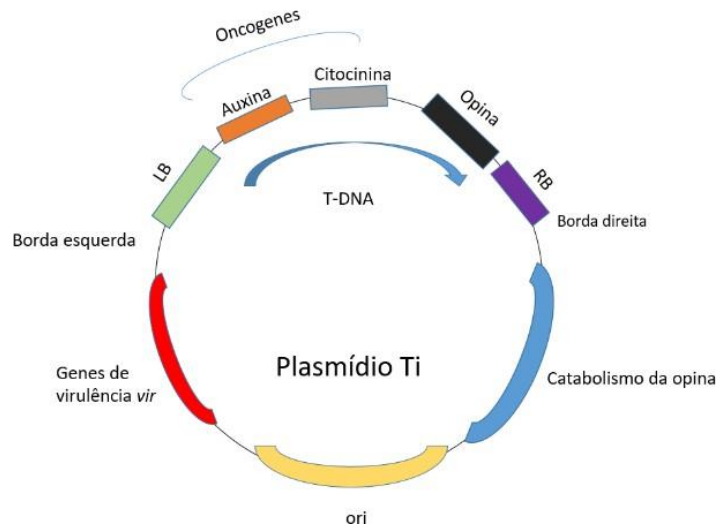
Apesar da disponibilidade na literatura de uma série de genes e proteínas diferencialmente expressos na interação entre espécies de *Trichoderma* e seus hospedeiros, ainda é necessário a validação de seu papel nestes processos e a completa elucidação dos mecanismos pelos quais estas espécies parasitam seus hospedeiros ou estabelecem relações benéficas com plantas hospedeiras. A identificação e validação de genes críticos nestes

processos também tem impacto na utilização comercial de espécies de *Trichoderma*, podendo ser utilizados para o desenvolvimento de linhagens mais efetivas no controle de fitopatógenos, na promoção de crescimento e bioproteção de plantas hospedeiras.

A validação de genes com papel nas interações acima mencionadas pode ser realizada pela supressão da expressão dos genes que se pretende estudar, podendo ser utilizadas as técnicas de recombinação homóloga de genes, RNA interferente, CRISPR-CAS 9 e transformação genética aleatória. A transformação genética aleatória diferente das demais não se baseia na escolha prévia do gene a ser estudado e segue descrita abaixo.

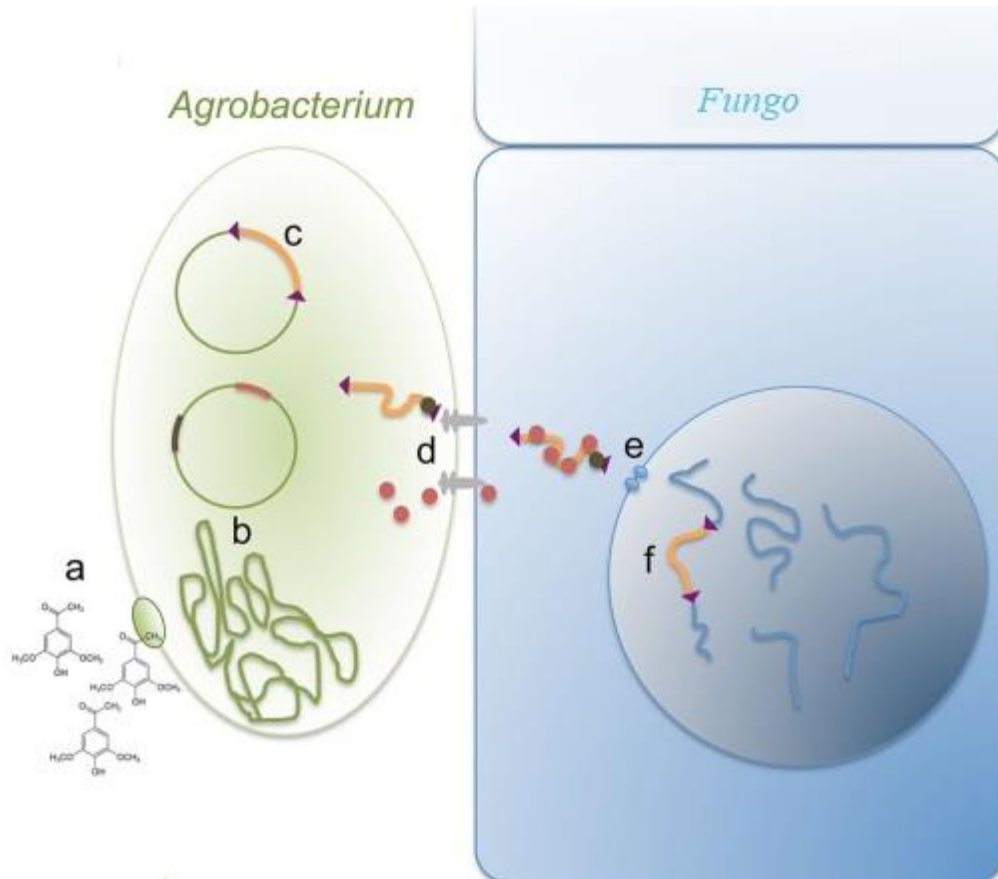
## **1.2 Transformação genética aleatória de fungos mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

A técnica de transformação mediada por *A. tumefaciens* (ATMT) se utiliza da estratégia de virulência desta bactéria que integra o DNA plasmidial chamado Ti (tumor inducing), mais especificamente a região de transferência de DNA, chamada T-DNA, de forma aleatória no genoma de hospedeiros. O T-DNA contém genes que codificam os hormônios vegetais, auxina e citocinina e genes codificadores de opinas sendo flanqueados por regiões com 25 pares de bases repetidas chamadas borda esquerda (left border – LB) e borda direita (right border – RB) (Gelvin, 2003; Michielse et al., 2005; Pitzschke, 2010), como mostrado na figura 4. Para utilização na ATMT o plasmídeo Ti precisa ser “desarmado”, que consiste na remoção dos oncogenes e dos genes de metabolização de opinas do T-DNA (HIEI et al., 1997). Os genes removidos são substituídos por genes que codificam resistência para serem utilizados como marca de seleção durante a transformação e um gene repórter que serão inseridos no genoma da célula hospedeira.



**Figura 4.** Plasmídeo Ti de *A. tumefaciens*. RB e LB, *right e left board* ou bordas direita e esquerda, são as regiões de flanqueamento do T-DNA, dos oncogenes e inseridas em um vetor binário. A região *vir* codifica as proteínas de transferência. Está confuso ainda.

Para a transformação de fungos com *A. tumefaciens* estes são cultivados em um mesmo meio de cultura, co-cultivo, contendo acetosiringona. Esta molécula é reconhecida pela bactéria por receptor específico levando à transcrição de genes de proteínas com papel na excisão do T-DNA do plasmídeo Ti, seu transporte e integração no genoma do fungo alvo. O T-DNA linear se liga à proteína VirD2 que é reconhecida pelo sistema de secreção do tipo IV na membrana da célula bacteriana e este material é exportado. O T-DNA linear associado à proteínas Vir, que contém sequências sinalizadoras para que sejam transportadas ao núcleo da célula hospedeira, alcançam o núcleo da célula hospedeira e o T-DNA é integrado no DNA cromossoma de forma aleatória (Forsburg et al., 2001; Silva, et al., 2004; Bhadauria, et al. 2009; Idnurm et al., 2017). (Figura 5).



**Figura 5.** Um resumo do processo de transformação de fungos por *A. tumefaciens*. No passo (a), a molécula acetossiringona presente no meio de transformação é reconhecida pela bactéria, desencadeando (b) a expressão de genes dentro do DNA cromossômico. No estágio (c), o T-DNA é retirado do plasmídeo. Secreção do T-DNA (d). Na etapa (e), entrada do T-DNA na célula do fungo. No evento final (f), o T-DNA se insere no DNA cromossômico do fungo (Idnurm et al., 2017).

Para identificar a região de inserção do T-DNA no genoma do fungo Liu e Whittier (1995) desenvolveram a técnica *Thermal Asymmetric Interlaced PCR* (TAIL-PCR). Esta técnica emprega três ciclos de PCR com três primers específicos (SP) que possuem alta temperatura de Melting ( $T_m$ ) a partir das sequências conhecidas das regiões da borda esquerda (LB) e direita (RB) e primers degenerados arbitrários (AD) que possuem  $T_m$  baixa para ligação às sequências desconhecidas. Este método utiliza a especificidade da PCR através do aumento da eficiência de ligação dos primers específicos e diminuindo a eficiência de ligação dos primers AD a temperaturas elevadas a partir das reações secundárias e terciárias. O produto da reação primária

é utilizado como molde para a reação secundária. Assim, o mesmo acontece para a reação terciária, onde se utiliza como molde o produto da reação secundária. O produto da reação terciária pode ser usado para análise de identificação do local de inserção do T-DNA no genoma do hospedeiro (Liu et al., 1995; Fujimoto et al., 2016; Li et al., 2017).

### **1.3 *Sclerotinia sclerotiorum* e controle de doenças fúngicas em plantas**

O patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* é o agente causal da doença conhecida como mofo-branco, podridão da haste de esclerotínia ou podridão branca de esclerotínia. Esse fungo é cosmopolita e polífago, de ampla ocorrência mundial, com aproximadamente 408 espécies de plantas hospedeiras (Boland & Hall, 1994). Este patógeno pode se desenvolver nas regiões produtoras de feijão comum do país e ao longo de todo o período vegetativo e reprodutivo da cultura (Bolton et al., 2006; Meyer et al., 2017). Dados de produção de soja no estado de Goiás mostram que os principais problemas de perda estão ligados à ocorrência de mofo branco, sendo estimado que cerca de 10 milhões de hectares da área brasileira de cultivo de soja estejam infestados pelo patógeno (CONAB, 2017). Na China, a colza (*Brassica napus*) é uma das principais culturas de plantas oleaginosas e *S. sclerotiorum*, é o responsável pelas maiores perdas produção anualmente (Wang et al., 2014).

Este patógeno pertencente ao filo *Ascomycota*, classe *Discomycetes*, ordem *Helotiales* e família *Sclerotiniaceae*, já foi muito bem caracterizado do ponto de vista morfológico e ciclo de vida. É constituído por hifas hialinas, septadas, multinucleadas e ramificadas, caracteriza-se também por produzir escleródios, estruturas de resistência formadas inicialmente pelo enovelamento de hifas e que se tornam escuras e muito rígidas. Esta estrutura é uma característica importante para sua sobrevivência durante condições ambientais adversas, podendo sobreviver no solo na forma de escleródios por vários anos.

O mofo branco causado por *S. sclerotiorum* é de difícil controle. Como para outras doenças fúngicas a principal forma de controle é através do uso de fungicidas químicos, porém

esse processo além de ocasionar impactos ao meio ambiente, pode levar ao surgimento de patógenos resistentes e pragas secundárias (Pires et al, 2003; Carvalho et al., 2015). Os principais fungicidas de controle de *S. sclerotiorum* são fenilpiridinilaminas (fluazinam), carboxamidas (fluopyram e procimidona) sendo que a taxa de controle pode variar entre 67%-85% (Meyer et al., 2017).

A resistência a fungicidas em populações de fitopatógenos possui três fases: emergência, seleção e ajuste. O surgimento de adaptação ao agente químico envolve a geração de uma deformação de resistência via mutação, também chamada de resistência adquirida, e nesta fase a seleção resulta em um aumento da proporção que é resistente na população (Milgroom et al., 1988). Uma vez que a população resistente atingiu um nível intermediário na fase de ajuste, uma mudança na dose do fungicida ou no modo de ação é necessária para alcançar o controle da doença. Quando isso ocorre, os fungicidas químicos podem ainda eliminar microrganismos já estabelecidos no solo que são benéficos às plantas e inespecíficos ao agente químico aumentando assim, sua suscetibilidade aos patógenos de solo (Milgroom et al., 1988; Pires et al, 2003).

O controle biológico surge como uma estratégia complementar ao tratamento químico, podendo contribuir para a redução de seu uso e assim, pode evitar contaminações no solo por agroquímicos, a contaminação de fontes de água superficiais e subterrâneas, como rios lagos e lençóis freáticos em adição aos problemas acima mencionados. De fato já existe o interesse em adequar o sistema de controle de doenças e produção na agricultura brasileira, como o Projeto de Lei N° 6.670/16 que institui a Política Nacional de Redução de Agrotóxicos que institui medidas para o fortalecimento para produção de produtos orgânicos, a agricultura agroecológica e o controle biológico (FAPESP, 2018).



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

O presente trabalho teve como objetivo a análise de de mutantes de *Trichoderma harzianum* TR274 visando identificar genes com papel na biologia desta espécie e que estejam relacionados com sua atividade antagônica.

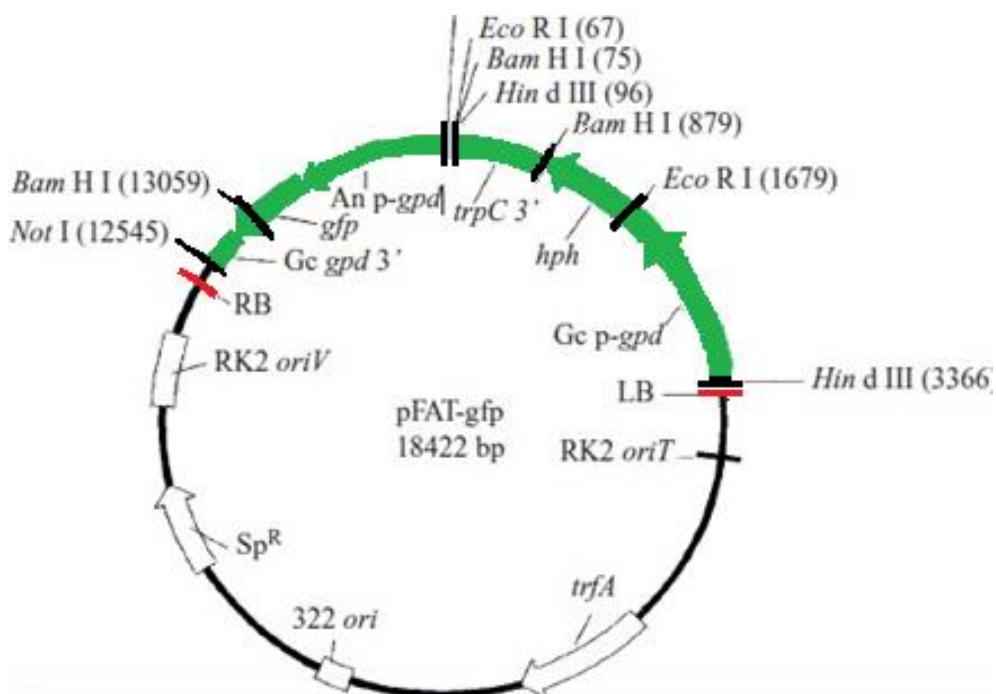
### 2.2 Específicos

- Caracterizar os mutantes T25, T26 e T40 quanto ao crescimento e produção de conídios em diferentes meios de cultura;
- Analisar a interação da linhagem parental de *T. harzianum* e mutantes T25, T26 e T40 com *S. sclerotiorum* e escleródios;
- Identificar a modificação genética nos mutantes T25, T26 e T40.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Microrganismos e sua manutenção

Neste estudo, foram utilizados como microrganismos modelo o fungo parental selvagem *T. harzianum* TR274 e o fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum* mantidos na coleção de fungos do Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília. A biblioteca de mutantes do *T. harzianum* TR274 foi construída e cedida pela Dra. Leila Cecília de Lima Fávaro do Laboratório de Biologia Energética, Embrapa Agropecuária, Parque Estação Biológica S/N. Para a manutenção dos fungos estes foram cultivados em meio BDA (10% [m/v] de batata, 2% (m/v) de glicose e 2% [m/v] de ágar) a 28° C por 7 dias, e posteriormente estocados em ultrafreezer a -80°C. Para obtenção da biblioteca de *T. harzianum* foi utilizada a técnica de transformação mediada por *Agrobacterium* utilizando o vetor pFAT-gfp (Figura 2). Este vetor contém o T-DNA desarmado, no qual os oncogenes foram substituídos pelo gene de resistência à higromicina. A biblioteca obtida contém 168 transformantes que foram nomeados de T1 a T168. Em uma triagem inicial 3 mutantes denominados T25, T26 e T40 apresentaram diminuição em sua atividade proteolítica, taxa de crescimento e de esporulação quando comparados ao isolado parental *T. harzianum* TR274 e por isto foram selecionados para as caracterizações posteriores.



**Figura 6.** Mapa do vetor pFAT-gfp utilizado na transformação de *Trichoderma harzianum* TR274. (RB) Borda direita do T-DNA. (LB) (em vermelho) borda esquerda do T-DNA (em verde). (*hph*) Gene de resistência a higromicina B de *E. coli*. (*trpC* 3') Sinal de terminação transcricional do gene *trpC* de *A. nidulans*. (Na p-gpd) Promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato de *A. nidulans*. (Gc p-gpd) promotor do gene *gpd* de *G. cingulata*. (Gc *gpd* 3') Sinal de terminação transcricional do gene *gpd* de *G. cingulata*. (*Sp<sup>R</sup>*) Gene de resistência a espectionomicina. (RK2 *oriV*) origem de replicação vegetativa rk2. (RK2 *oriI*) Origem de transferência RK2. (322 *ori*) Origem de replicação de pBR322. (*trfA*) Gene de replicação de *trfA* de Rk2. (*gfp*) Gene da proteína verde fluorescente pGreen Lantern (Life Technologies). Fonte Fávoro, (2009).

### 3.2 Taxa de crescimento e esporulação

O crescimento dos fungos foi realizado em placas de Petri contendo os meios de cultura, Ágar-Batata-Glicose (BDA: 20 g/L (m/v) de caldo de batata com percentual de 20% de caldo (v/v), 2% (m/v) de ágar e 2% (m/v) de dextrose) e meio mínimo (MM: NaNO<sub>3</sub> 0,6% (m/v), KCl 0,05 % (m/v), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,15% (m/v), ZnSO<sub>4</sub> 0,001% (m/v) e FeSO<sub>4</sub> 0,001% (m/v) (Pontecorvo et al., 1953; Vargas et al., 2009. Um disco da cultura do isolado parental e mutantes foi inoculado em uma placa contendo meio BDA ou meio mínimo, as placas inoculadas foram incubadas a 28°C e os diâmetros de crescimento dos

fungos medidos após 24, 48, 72 e 96 horas. Este experimento foi realizado em duplicata. Foram calculadas as médias dos diâmetros do crescimento dos mutantes e isolado parental obtidos dos dois experimentos. A análise estatística foi realizada no software SigmaPlot. Utilizando a média e os valores e desvio padrão de cada amostra, foi realizado o teste Anova Two Way. As amostras foram comparadas para análise de diferenças significativas (Teste Tukey) a cada ponto de crescimento nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas.

Para a quantificação de conídios, discos das culturas de cada um dos mutantes e do isolado selvagem cultivados em meio BDA foram coletados e inoculados em frascos erlenmeyer contendo arroz parboilizado previamente hidratado e autoclavado. Após 10 dias de crescimento a temperatura de 28°C sem agitação, adicionou-se a cada um dos frascos 100 mL de água destilada autoclavada e a suspensão obtida foi utilizada na contagem de conídios. A contagem foi realizada utilizando câmara de Newbauer e microscópio óptico Primo Star Zeiss.

### **3.3 Análise morfológica das hifas e estruturas de reprodução**

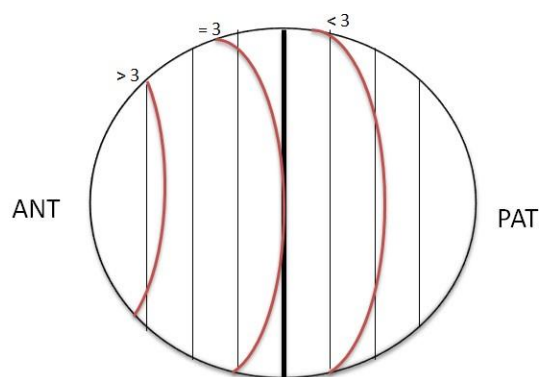
Em placas de petri contendo cultura do isolado parental e mutantes foram adicionados 1 mL de água destilada autoclavada e realizada raspagem para obtenção de material para análise em microscópio óptico Primo Star Zeiss acoplado à câmera Canon G10. Os materiais coletados foram transferidos para lâminas e selado com lamínulas. As imagens foram observadas com aumentos 40 vezes e registradas.

### **3.4 Atividade antagônica:**

#### **3.4.1 Teste de confronto em placas**

Em placas de Petri de 8,5 cm de diâmetro contendo meio BDA, foi inoculado em um dos extremos um disco de cultura dos fungos *T. harzianum* TR274 ou T25 ou T26 ou T40 e no extremo oposto foi inoculado um disco de cultura do fungo *S. sclerotiorum*. Após 7 dias de crescimento, com base no crescimento dos fungos foi feita a classificação antagônica baseada na escala de Bell D. L., Wells H. D. (1982). Esta classificação é feita

em notas de 1 a 5 de acordo com o crescimento do fungo: para notas menores que 3, a classificação é dada como eficiente; para notas iguais a 3, o fungo antagonístico é classificado como moderado; e para pontuações acima de 3, o fungo antagonístico é ineficiente (figura 7). Para atribuição destas notas, a placa de Petri é dividida em 8 partes iguais. A nota 1 é dada quando fungo antagonístico cresce sobre o patógeno ocupando toda a placa; a nota 2 é dada quando o fungo antagonístico cresce 7/8 da placa. Para nota 2,5, o fungo antagonístico cresceu 5/8 da placa. Para a nota 3, o fungo cresceu 4/4 da placa. Nota 3,5 o fungo antagonístico cresceu sobre 3/8 da placa. Nota 4 caso o fungo antagonístico cresceu sobre 1/8 da superfície da placa. Nota 5 caso o fungo antagonístico não cresceu e sim o patógeno.



Pontuação	Classificação
Pontuação < 3	Eficiente
Pontuação = 3	Moderado
Pontuação > 3	Ineficiente

**Figura 7.** Esquema do método de Bell D. K., Wells H. D., (1982) para classificar linhagens de fungos antagonísticos em ensaios de atividade antagonística em placa. ANT: Linhagens de fungos antagonísticos, alterar por micoparasita. PAT: linhagens de patógenos.

### **3.4.2 Análise da interação entre *T. harzianum* TR274, T25, T26, T40 e *S. sclerotiorum* por microscopia eletrônica de varredura**

Discos de 5 mm dos meios destas culturas foram retirados das áreas de contato entre *S. sclerotiorum* e *T. harzianum* TR274 e os mutantes T25, T26 e T40. Estes foram fixados em solução Karnovsky (paraformaldeído a 8%; glutaraldeído 25% em tampão fosfato na concentração. Após a fixação os materiais foram lavados por 4 vezes com tampão cacodilato 0,05M pH 7,2 e pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio e tampão cacodilato em uma proporção 1:1 por 1 hora. Em seguida, foi realizada uma série de quatro lavagens com tampão cacodilato 0,05M pH 7,2 e desidratação em série aquosa de acetona em concentrações de 30, 50, 70, e 100% por 15 minutos nas três primeiras concentrações, e duas vezes por 10 min na concentração final de 100%. Logo após a desidratação foi feita a secagem ao ponto crítico com dióxido de carbono CO<sub>2</sub> de 30 a 37°C no equipamento CPD 030-Balzers e metalização com ouro no equipamento Sputter Coater 050, para posterior visualização no microscópio eletrônico de varredura modelo JSM 840 empresa JEOL Company. As análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas no laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília – UnB.

### **3.4.3 Teste de interação com escleródios**

Para análise da interação dos fungos mutantes e do selvagem com escleródios de *S. sclerotiorum*, primeiramente foi realizado três lavagens com solução NaCl 2% autoclavada durante 7 minutos dos escleródios contendo micélio dos fungos na superfície da estrutura de resistência. Em placas de Petri contendo meio BDA foram colocados três escleródios e em seguida nas extremidades foram colocados disco das culturas contendo conídios dos fungos mutantes e parental. As placas foram incubadas a 28°C e o tempo de interação foi contado a partir do crescimento dos fungos sobre os escleródios. Após 72 horas de interação, os escleródios foram retirados com pinças estéreis, colocados em tubos de 2 mL e armazenados em temperatura ambiente para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram fixadas em solução Karnovsky (paraformaldeído a 8%; glutaraldeído 25% em tampão fosfato na concentração. Após a fixação os materiais foram lavados por 4 vezes com tampão

cacodilato 0,05M pH 7,2 e pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio e tampão cacodilato em uma proporção 1:1 por 1 hora. Em seguida, foi realizada uma série de quatro lavagens com tampão cacodilato 0,05M pH 7,2 e desidratação em série aquosa de acetona em concentrações de 30, 50, 70, e 100% por 15 minutos nas três primeiras concentrações, e duas vezes por 10 min na concentração final de 100%. Logo após a desidratação foi feita a secagem ao ponto crítico com dióxido de carbono CO<sub>2</sub> de 30 a 37°C no equipamento CPD 030-Balzers e metalização com ouro no equipamento Sputter Coater 050, para posterior visualização no microscópio eletrônico de varredura modelo JSM 840 empresa JEOL Company. As análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas no laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília – UnB.

### **3.5 Dosagem da atividade de hidrolases de parede celular fúngica**

A atividade de  $\beta$ -1,3-glicanases foi realizada conforme descrito em Ramada et al. (2010). O ensaio enzimático foi realizado utilizando-se 10  $\mu$ L de amostra, 20  $\mu$ L do substrato laminarina (Sigma) 0,75% (m/v) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. Este foi incubado a 50 °C por 10 minutos, a reação foi parada pela adição de 100  $\mu$ L do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (aDNS) e os tubos de reação fervidos por 5 minutos. A absorbância foi lida a 550 nm utilizando-se o aparelho Soft Max. a unidade específica (U/mg) de  $\beta$ -1,3-glucanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a produção de 1  $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto (1  $\mu$ mol/ min) por mg de proteínas do sobrenadante.

A atividade proteolítica foi realizada conforme descrito em Ramada et al. (2010). O ensaio enzimático foi realizado utilizando-se 10  $\mu$ L de amostra foram incubados em 40  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0 e 40  $\mu$ L de azocaseína 0,25% (m/v) por 30 minutos em temperatura de 37°C um termociclador. A reação foi parada com adição de 100  $\mu$ L de ácido tricloroacético 10% (m/v) em 4 °C por 10 minutos. A reação foi centrifugada a 10000 g por 15 minutos e 100  $\mu$ L da reação foram transferidos para uma placa de ELISA seguida pela adição de 100  $\mu$ L de NaOH 1 M. A absorbância foi

determinada à 450 nm em um leitor de microplacas Soft Max. A absorbância obtida foi considerada a atividade enzimática.

A concentração de proteínas foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão. A leitura da absorbância foi realizada a 595 nm em espectrofotômetro Soft Max 6.2.2 GxP a 595 nm.

As análises estatísticas foram realizadas com as médias das atividades específicas dos mutantes e isolado parental obtidos nas induções para cada enzima. A análise estatística foi realizada no software SigmaPlot. Utilizando a média dos valores das atividades específicas e o desvio padrão de cada amostra, foi realizado o teste Anova Two Way. As amostras foram comparadas para análise de diferenças significativas (Teste Tukey) a cada ponto de crescimento nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas na presença de micélio autoclavado de *S. sclerotiorum*.

### **3.6 Identificação da modificação genética nos mutantes T25, T26 e T40**

Um disco da cultura em meio BDA dos isolados selvagem *T. harzianum* TR274 e mutantes T25, T26 e T40 foram inoculados em frascos cônicos erlenmeyer contendo 200 mL de meio líquido MYG 2% (m/v), (2% m/v) Glicose, 0,75% (m/v) Extrato de Malte, e estes foram incubados a 28°C e 120 rpm. Após 7 dias de cultivo, as culturas foram filtradas e os micélios recuperados utilizados na extração de DNA genômico a ser utilizados nas reações de amplificação da TAIL-PCR. A extração de DNA genômica foi realizada utilizando o método caseiro Fenol-Clorofórmio (Barker 1998). Os micélios foram congelados com nitrogênio líquido e macerados para lise. O material resultante foi coletado e colocado em tubos cônicos de 2 mL, e a estes foram adicionados 10 µL de β-metcaptoetanol e 16 µL de RNase em 800 µL de tampão de extração (Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 contendo NaCl 1,4 M, e EDTA 5mM). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e os tubos incubados a 65°C. Após 20 minutos os tubos foram transferidos para o gelo e a cada um destes adicionados 400 µL de fenol e 400 µL da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (49:1). Foi realizada a transferência do

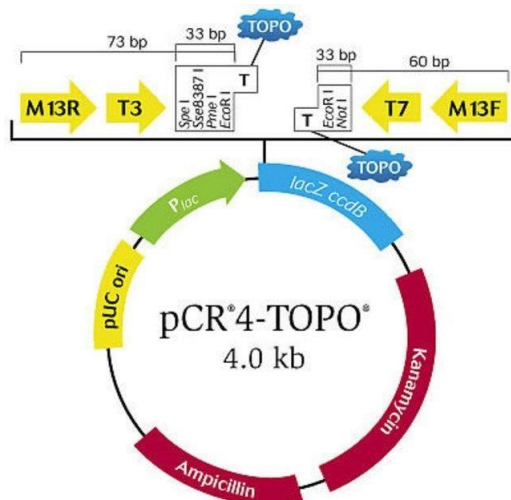


sobrenadante para outro tubo contendo 800  $\mu\text{L}$  de clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de concentração(49:1), em seguida dos tubos foram agitados vigorosamente e centrifugadas por 10 minutos à 20000 e 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo cônico de 2 mL contendo 800  $\mu\text{L}$  de isopropanol, a amostra foi misturada gentilmente e os tubos e incubados em gelo. Após 5 minutos, os tubos foram centrifugados por 30 minutos à 20000 g e 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol a 70%. O DNA precipitado foi ressuspendido com 100  $\mu\text{L}$  de água deionizada autoclavada (Milli-Q), a concentração de DNA das amostras e sua integridade foram analisados em gel agarose a 12% (m/v) e armazenados em ultrafreezer -80°C até sua utilização nas reações de TAIL-PCR.

As reações da TAIL-PCR foram realizadas como descrito por Mullins et al., 2001. Foram realizadas 7 reações de PCR para 7 primers aleatórios e degenerados diferentes na reação primária (Tabela suplementar 2,3,4,5 e 6). Os volumes utilizados nas reações de cada primer foram de 0,6  $\mu\text{L}$  AD2\_Ses; 2  $\mu\text{L}$  AD5\_Par; 2  $\mu\text{L}$  AD11\_Par; 0,26  $\mu\text{L}$  AD6\_Ama; 0,26  $\mu\text{L}$  AD7\_Ama; 0,8  $\mu\text{L}$  AD1\_Liu; 0,4  $\mu\text{L}$  AD3\_Liu (Tabela suplementar 3). O volume de DNA genômico usado foi de 4  $\mu\text{L}$  com concentração de 10 ng de material genômico, sendo o volume final da reação de 20  $\mu\text{L}$ . O volume de enzima utilizado na reação foi de 0,16  $\mu\text{L}$  em todas as reações primárias (Tabela suplementar 2). O produto da reação primária foi utilizado como molde genético para a reação secundária. Na reação secundária foi utilizado 0,36  $\mu\text{L}$  AD2\_Ses; 2  $\mu\text{L}$  AD5\_Par; 2  $\mu\text{L}$  AD11\_Par; 0,26  $\mu\text{L}$  AD6\_Ama; 0,26  $\mu\text{L}$  AD7\_Ama; 0,4  $\mu\text{L}$  AD1\_Liu; 0,3  $\mu\text{L}$  AD3\_Liu; 0,12  $\mu\text{L}$  de enzima Taq Polimerase e 1  $\mu\text{L}$  do produto da reação primária (Tabela suplementar 2 e 3). Na reação terciária, o volume final da reação foi de 50  $\mu\text{L}$  (Tabela suplementar 2). O volume de primer utilizado 0,9  $\mu\text{L}$  AD2\_Ses; 5  $\mu\text{L}$  AD5\_Par; 5  $\mu\text{L}$  AD11\_Par; 0,3  $\mu\text{L}$  AD6\_Ama; 0,3  $\mu\text{L}$  AD7\_Ama; 1  $\mu\text{L}$  AD1\_Liu; 0,75  $\mu\text{L}$  AD3\_Liu (Tabela suplementar 3); 0,12  $\mu\text{L}$  de enzima Taq Polimerase e 1  $\mu\text{L}$  do produto da reação primária (Tabela suplementar 2 e 3).

Os produtos das ampliações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,7% (m/v) para a reação secundária e 1,2% (m/v) para a reação terciária e a corrida eletroforética foi realizada sob a voltagem de 100 Volts. Para visualização dos produtos das reações de PCR e marcador de tamanho, os géis resultantes foram corados

com solução de brometo de etídio a 0,5 µL /200mL irradiado com luz ultravioleta a 312 nm em transiluminador UV T4941 (Sigma Aldrich, Estados Unidos da América). Os produtos da PCR da reação terciária foram eluídos do gel e purificados utilizando o kit Wizard SV (Promega Co., Estados Unidos da América) seguindo instruções do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram ligados no vetor pCR4 TOPO e clonado em *E.coli* Top 10 (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts - Estados Unidos da América) utilizando o dkit TOPO TA Cloning seguindo as instruções do fabricante (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts - Estados Unidos da América) (Figura 7).



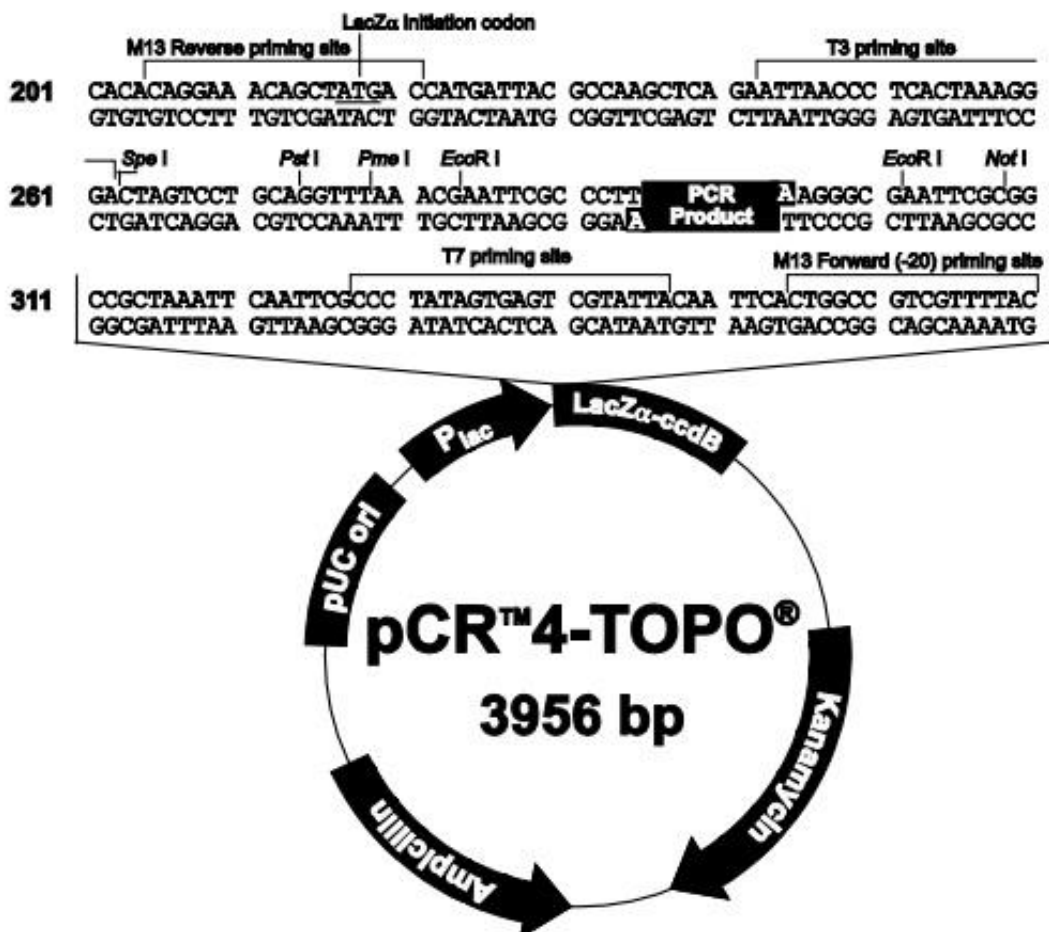
**Figura 8.** Mapa do vetor pCR 4-TOPO 4.0 kb. Figura obtida do manual fornecido pelo fabricante.

Os clones contendo resistência a canamicina foram coletados e, inoculados em frascos cônicos contendo meio LB-líquido adicionado de canamicina (50 µg/ml). Os frascos foram incubados por 37°C sob agitação de 200 rpm e após 12 horas de cultivo, as culturas foram centrifugadas à 10000 g e as células coletadas utilizadas na extração de DNA plasmidial utilizando o kit Wizard SV plus Miniprep (Promega Corporation, Wisconsin – Estados Unidos da América), seguindo as orientações do fabricante.

A confirmação da clonagem do material genético das células competentes foi realizada por PCR utilizando os primers M13: forward (5'-

GTAAAACGACGGCCAG-3)' e *reverse* (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). A amplificação foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1,2 % (m/v) com voltagem de 100 Volts por 40 minutos de corrida. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction (Qiagen) conforme o manual do fabricante. Após a purificação, o material foi quantificado em nanodrop e 15 ng do produto purificado enviado para sequenciamento na empresa Eurofins (São Paulo – Brasil) pelo método de Sanger.

As sequências geradas foram analisadas em Software Geneious versão R11 (Biomatters, Auckland –Nova Zelândia) A sequência região flanqueada pelos sítios de *EcoRI* (5'-GAATTC-3') dos vetores fechados foram A análise foi feita entre as regiões de sítios de inserção das *EcoRI*, como exemplificado na figura 9.

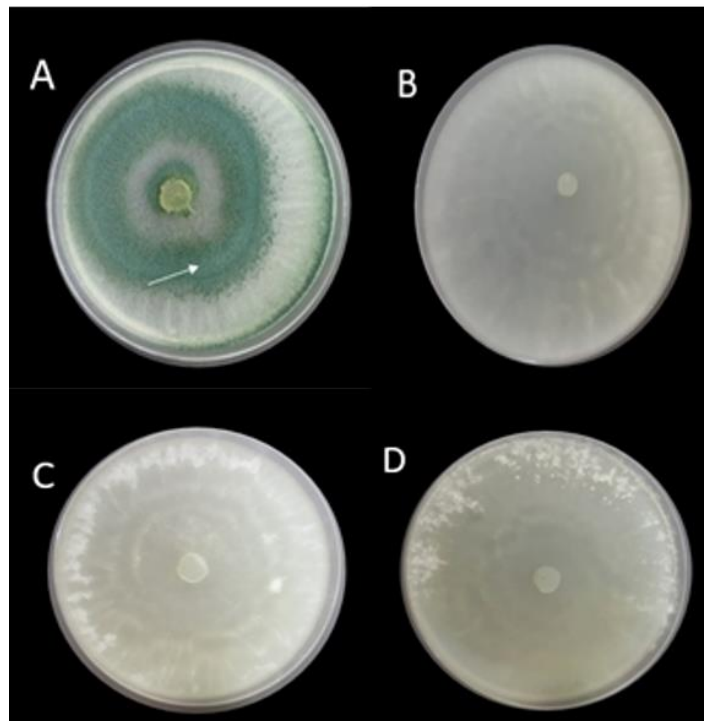


**Figura 9.** Mapa do vetor pCR™4-TOPO fechado com produto de PCR. Figura obtida do manual pelo fabricante.

As sequências entre os sítios de restrição de *EcoRI* (5'-GAATTC-3') do vetor de clonagem foram utilizadas para comparação com sequências depositadas nos bancos de dados do NCBI por meio das ferramentas online Basic alignment search tool, BLAST e BLASTx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Esta análise também foi realizada na plataforma online JGI MycoCosm (<https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>) utilizando o banco de dados de *Trichoderma harzianum* TR274 como referência (Steindorff et al., 2016).

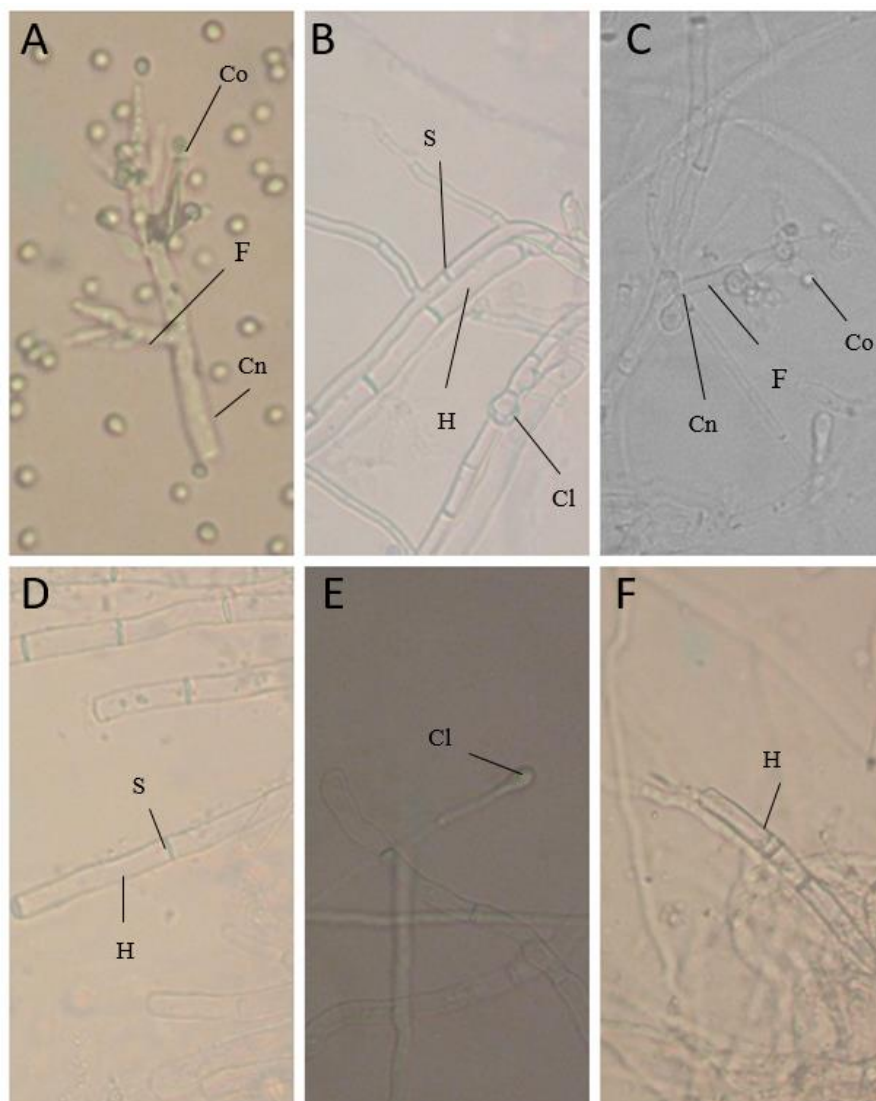
#### 4.Resultados e discussão

O fungo *T. harzianum* possui como uma de suas características morfológicas o crescimento radial com zonas de crescimento e esporulação, como mostrado na figura 10. Este padrão de crescimento não foi observado para os mutantes T25, T26 e T40, assim como a pigmentação verde correspondente à esporulação (Figura 10, B, C e D respectivamente).



**Figura 10.** Linhagem parental TR274 (A) e os mutantes T25 (B), T26 (C) e T40 (D) após 10 dias de crescimento em meio BDA.

Os mutantes também apresentaram diferenças morfológicas quanto a formação do conidióforo, visualizado no isolado parental com sua estrutura típica como é o conidióforo para espécies de *Trichoderma harzianum* (Figura 11A), esta estrutura não foi visualizada nos mutantes T26 e T40, assim como a presença de conídios.

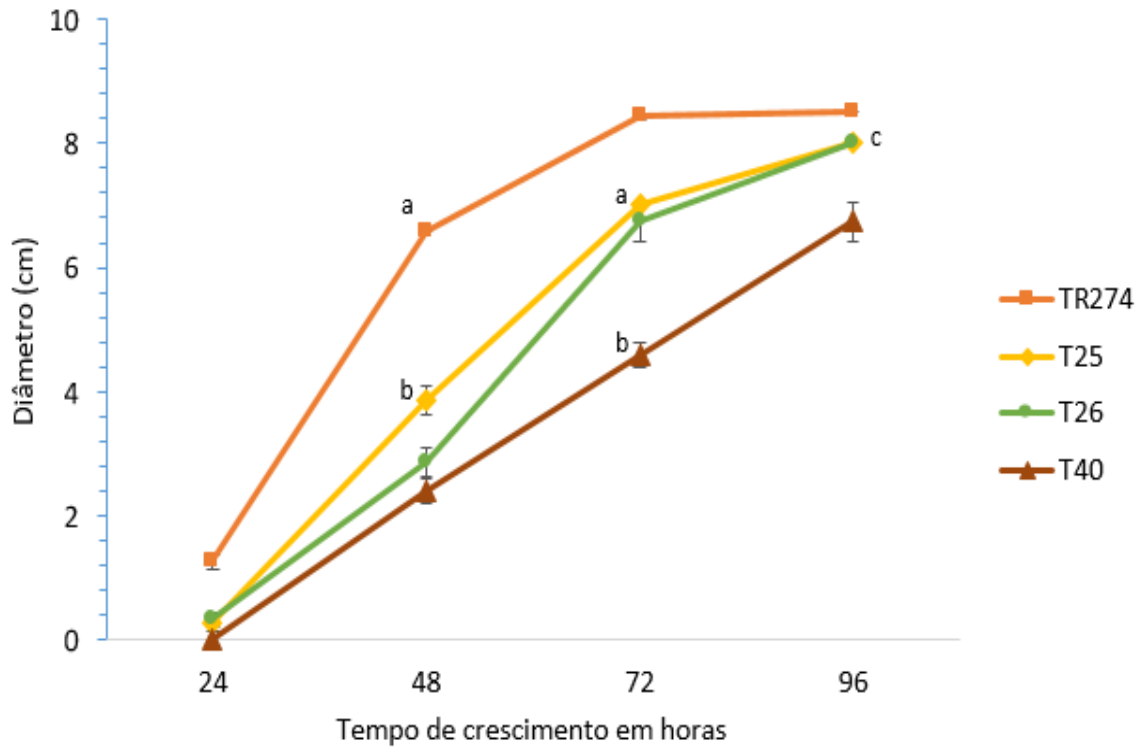


**Figura 11.** Fotomicrografias dos fungos TR274 (A e B), T25 (C e D), T26 (E) e T40 (F). Estruturas morfológicas com a presença de hifas (H), septos (S), conídios (Co), filetes (F) e conidióforo (Cn). Aumento de 40x.

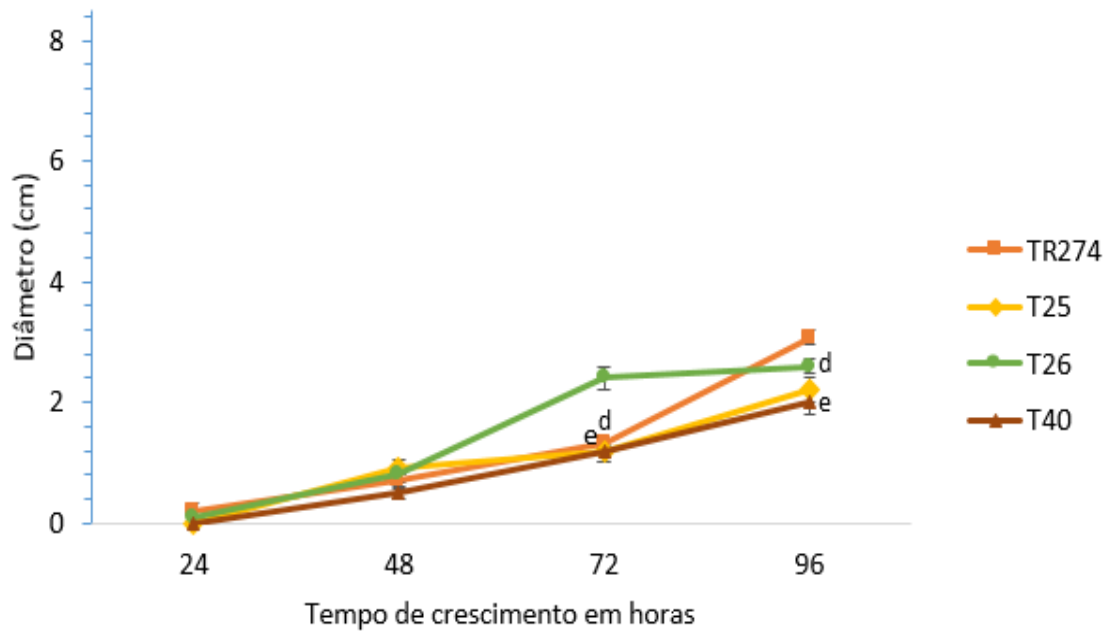
Quanto ao crescimento, a linhagem parental *T. harzianum* TR274 cresceu e ocupou toda a placa de Petri após 72 horas de crescimento em meio BDA, os mutantes,

no entanto, apresentaram diâmetro de crescimento inferior ao do isolado parental após 72 horas e destes o mutante T40 foi o que apresentou os menores valores de diâmetro de crescimento (Figura 12A). O mutante T25 em 72 horas teve o mesmo crescimento que o selvagem em 48 horas no meio BDA. Já para o mutante T40 foi observado o mesmo crescimento em placa em 72 horas que o mutante T25 em 24 horas. Para o tempo de 96 horas de crescimento, foi observado o mesmo diâmetro de crescimento para os mutantes T25 e T26, sendo o o valor do diâmetro de crescimento menor que o obtido para o fungo parental e maior que o obtido para o mutante T40. Desta forma, sugere-se que a modificação genética destes mutantes leva a um atraso no seu crescimento, sendo este efeito mais crítico para o mutante T40. Para o crescimento em meio mínimo não foi observada diferença significativa quanto ao crescimento dos mutantes e isolado parental (Figura 12A). Rubio et al. (2009) também demonstraram fenótipo de crescimento irregular e lento de mutantes de *T. harzianum* T34 para o gene *Thcf1* que codifica o fator de transcrição THCTF1.

A

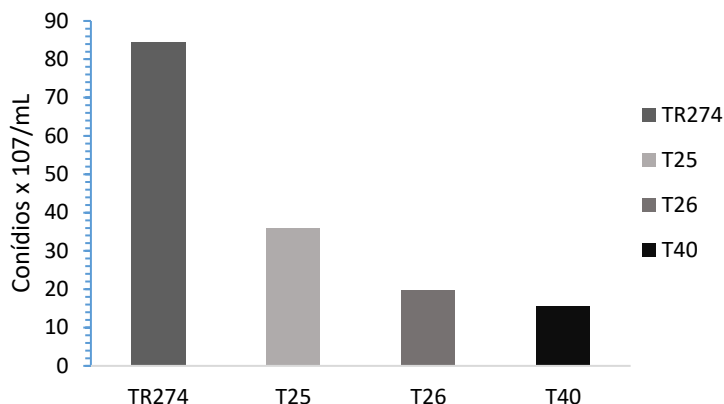


B



**Figura 12.** Diâmetro de crescimento (8,5 cm de diâmetro) dos fungos TR274, T25, T26 e T40 nas horas de crescimento de 24, 48, 72 e 96 horas em crescimento em meio BDA (A) e meio mínimo (B). (a, b, c, d, e). As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado pelo acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = <0.001$ ). Todos os procedimentos de comparação múltipla emparelhados (Teste Tukey).

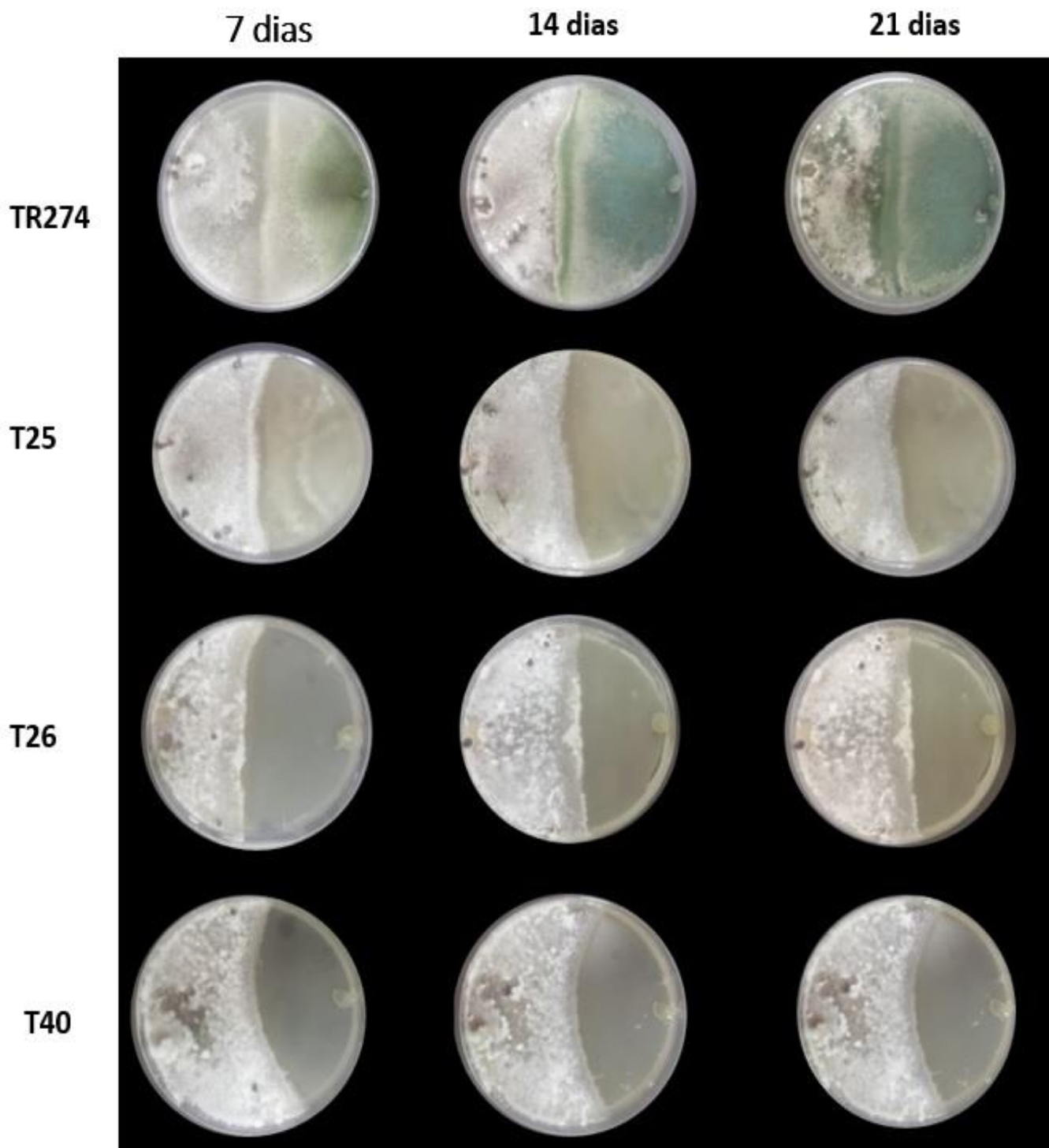
Os mutantes T25, T26 e T40 produziram quantidade de conídios até 4 vezes menor relação à linhagem parental, sendo que o menor valor foi obtido para o mutante T40 (Figura 13).



**Figura 13.** Contagem de conídios para o isolado parental TR274 e mutantes T25, T26 e T40.

No teste de confronto o isolado parental *T. harzianum* TR274 cresceu sobre o micélio de *S. sclerotiorum* após 21 dias de crescimento, sendo pontuado com nota 1 na escala de Bell e portanto classificado como eficiente. Os mutantes por sua vez não cresceram sobre o micélio de *S. Sclerotiorum*, mesmo após 21 dias de crescimento (Figura 14). Para os mutantes T25, T26 e T40 foi observada uma área de delimitação entre seu crescimento e de *S. Sclerotiorum* (Figura 14). Os mutantes T25 e T26 foram pontuados com nota 3 e classificados como antagonistas moderados na escala de Bell, o mutante T40 com nota 5 sendo classificado como ineficiente. Estes resultados sugerem que a modificação genética nestes mutantes afetou a capacidade antagônica de *T. harzianum* com efeito maior para o mutante T40 quando se utiliza este critério para avaliação da atividade antagônica. Este resultado, no entanto, pode estar relacionado à limitação causada pela modificação genética no crescimento dos mutantes e na sua esporulação.

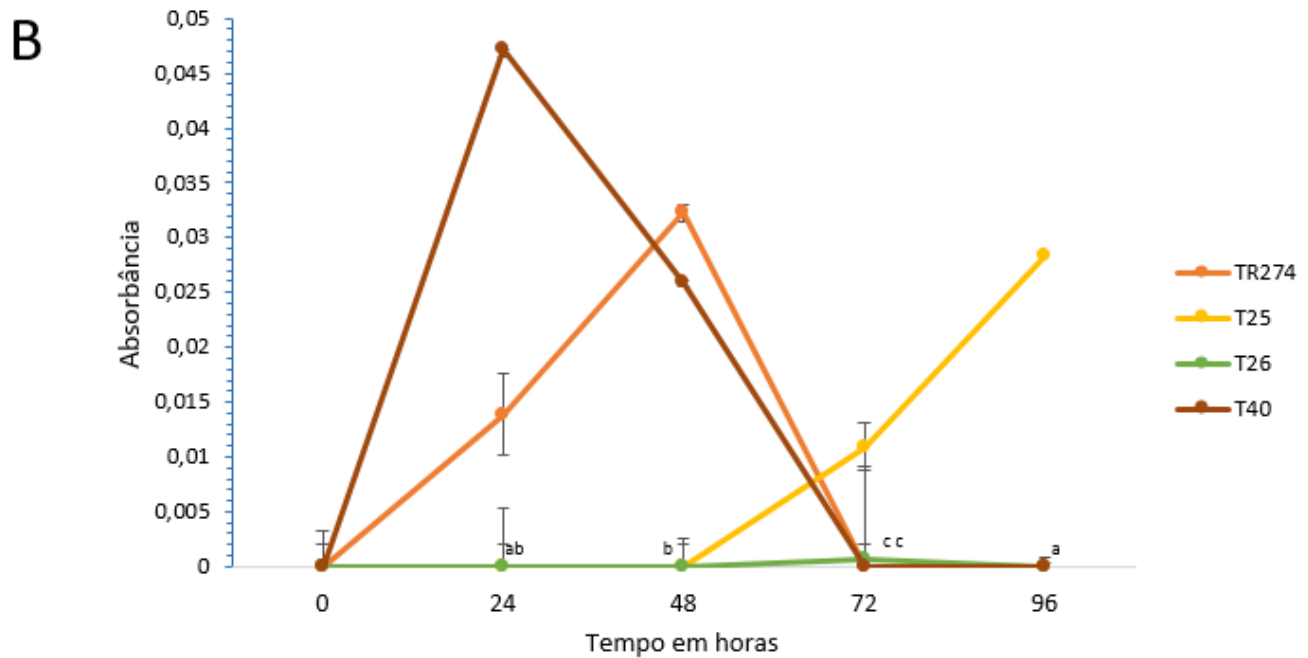
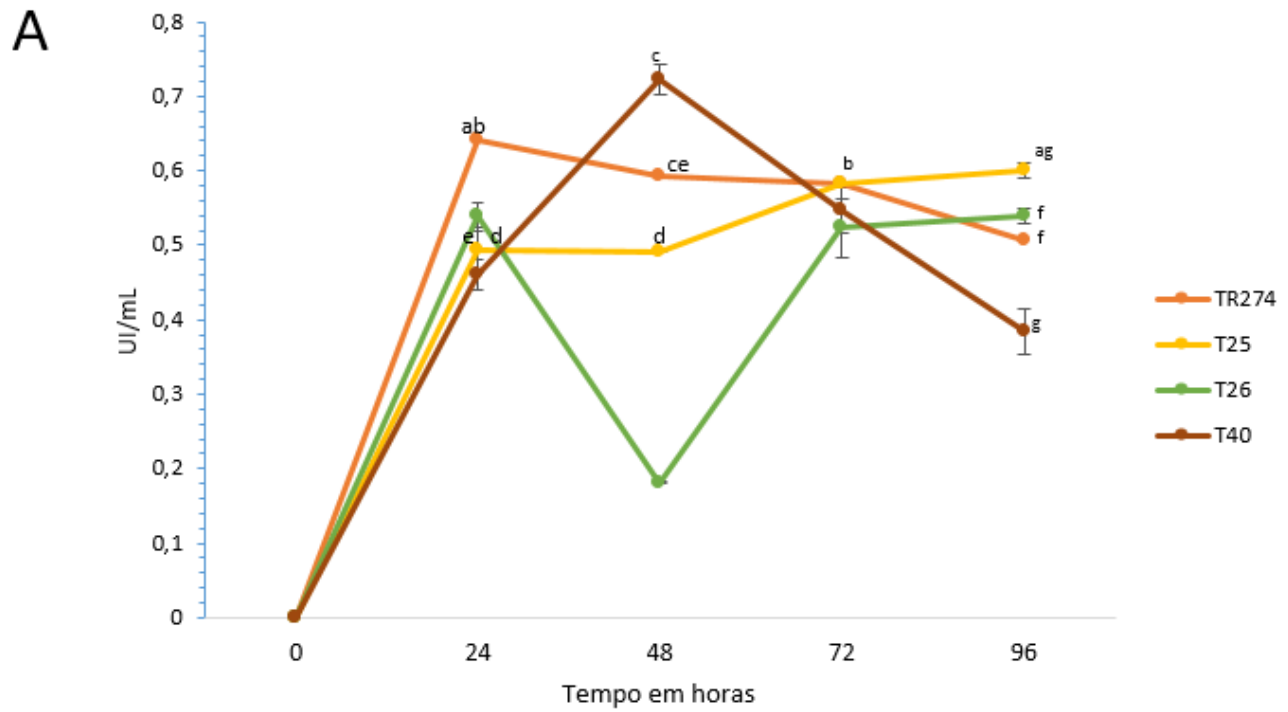




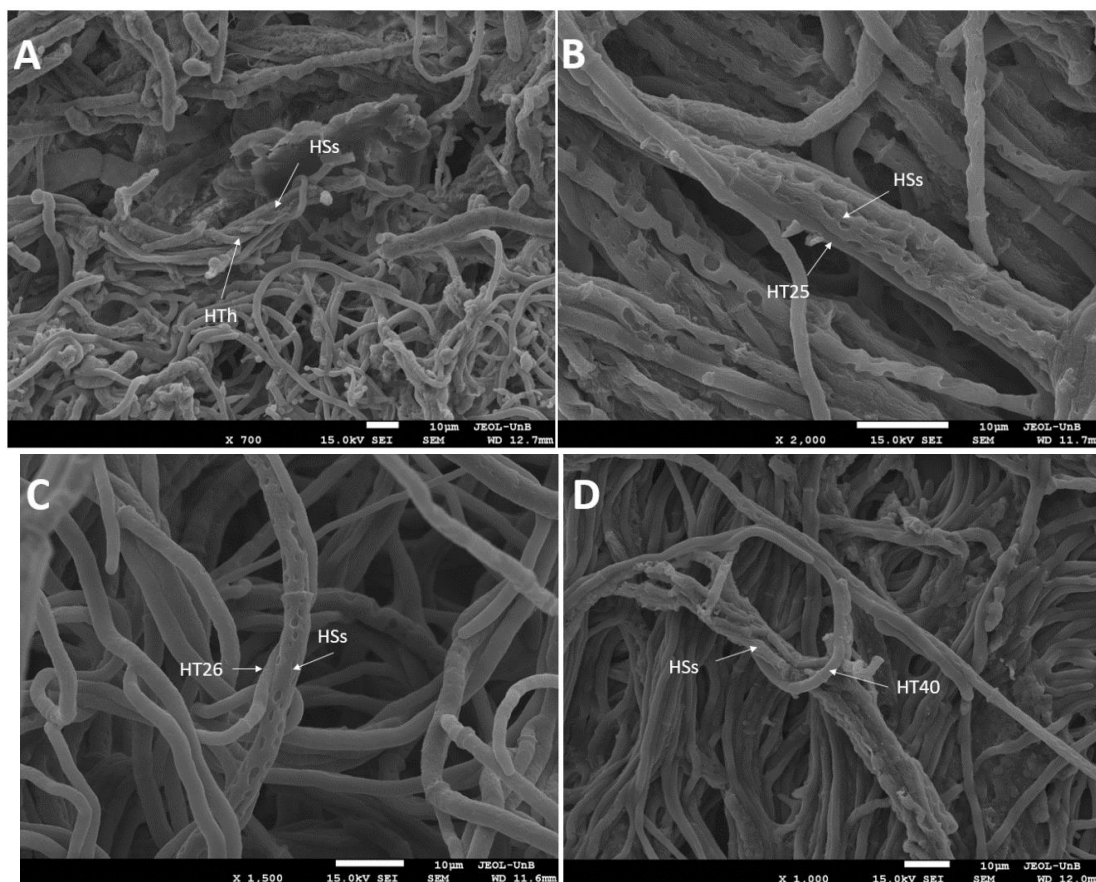
**Figura14.** Teste de confronto em placa dos fungos TR274, T25, T26 e T40 (lado direito da placa) contra *Sclerotinia sclerotiorum* (lado esquerdo da placa) nos tempos de 7, 14 e 21 dias.

Wu et al. (2017) demonstraram a correlação entre taxa de crescimento, esporulação e atividade antagônica para a espécie *T. asperellum* GDFS1009. Este isolado apresenta alta taxa de crescimento e esporulação que correlaciona de forma positiva com a inibição do crescimento dos patógenos causadores da murcha do fusário do pepino e podridão do colmo do milho. Mutantes de *T. atroviride* para os genes *tg1* e *tg3* que codificam a subunidade *G $\alpha$*  de proteínas G acopladas com receptores de membrana, por sua vez, tem diminuição de sua taxa de crescimento e conidiação associados à menor atividade antagônica contra os fungos fitopatogênicos *R. solani*., *Botrytis cinerea* e *S. sclerotiorum* durante o confronto direto em placa (Rocha-Ramirez et al. 2002; Reithner et al. 2005). Os dados de valores de atividade de hidrolases de parede celular fúngica não foram conclusivos, por isto, não foram apresentados. Será necessária a repetição do experimento.

Apesar dos mutantes T25, T26 e T40 serem avaliados no presente trabalho com eficiência moderada ou ineficientes no antagonismo contra *S. sclerotiorum* não foi observada diferença no padrão de envelhecimento de suas hifas sobre as hifas do hospedeiro por MEV em comparação com o isolado parental (Figura 16). As hifas de *S. sclerotiorum* da região de interação com o isolado parental e mutantes apresentaram sulcos, sendo que este tipo de modificação já foi mostrada anteriormente quando hifas de *S. sclerotiorum* foram tratadas com compostos com atividade antifúngica (Ma et al., 2015).

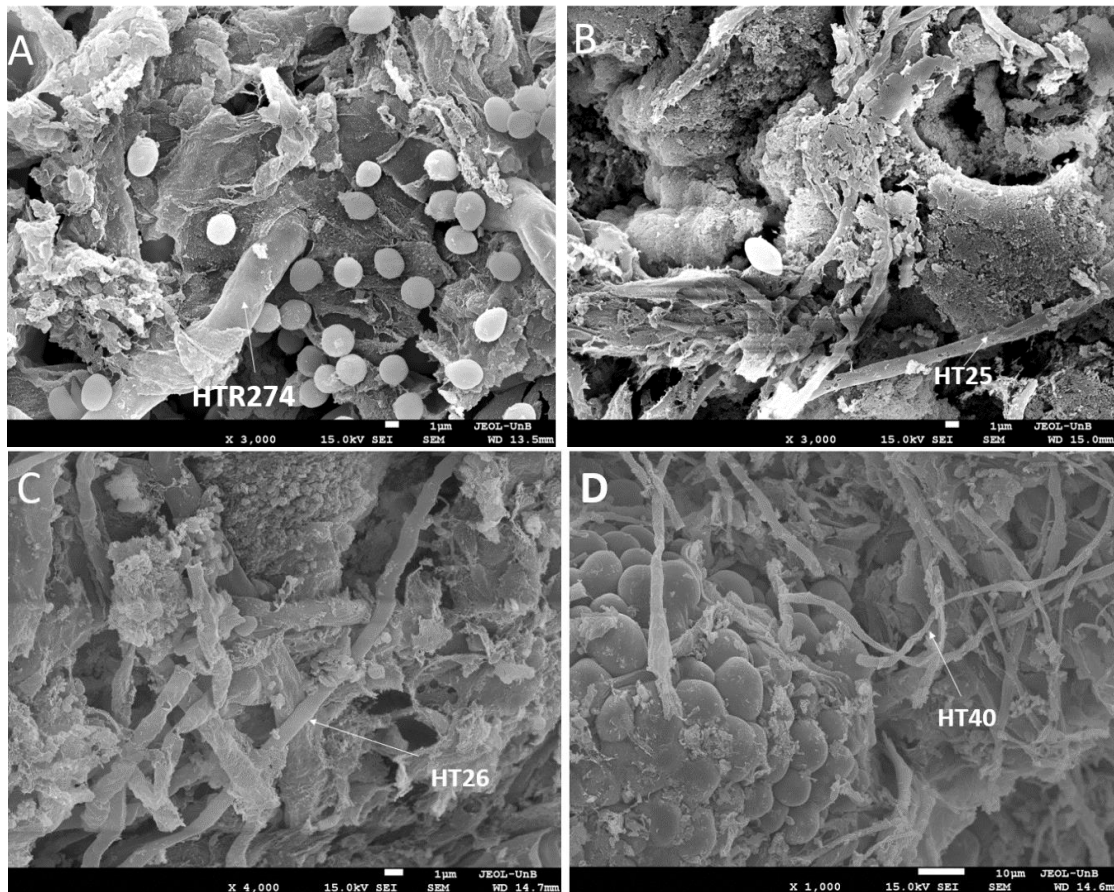


**Figura 15.** Análise enzimática de  $\beta$  1,3-Glucanase (A) e Protease (B) nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas durante do crescimento em micélio autoclavado de *S. sclerotiorum*. (a,b,c,d,e,f,g). As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado pelo acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = <0.001$ ). Todos os procedimentos de comparação múltipla emparelhados (Teste Tukey).



**Figura 16.** Eletromicrografia de varredura da região de contato entre as hifas (H) dos fungos TR274 (A; HTh), e mutantes T25 (B), T26 (C) e T40 (D) com o *S. sclerotiorum* (HSs) após 72 horas de interação.

No experimento de interação de *T. harzianum* com escleródios de *S. sclerotiorum* não se observou a penetração desta estrutura pelas de hifas dos mutantes, sendo observado apenas hifas na sua superfície (17B, 17C e 17D). Ao contrário, para o isolado selvagem observa-se a penetração da hifa no escleródio (Figura 17A). Novas análises deverão ser feitas para visualizar a interação dos mutantes com escleródios.



**Figura 17.** Eletromicrografia de varredura dos escleródios de *S. sclerotiorum* inoculados com o isolado selvagem e TR274 (A) e os mutantes, T25 (B), T26 (C) e T40 (D). (HTh=hifa *Trichoderma harzianum* TR274; HT25=hifa T25; HT26=hifa T26; HT40=hifa T40).

As sequências dos produtos da reação da TAIL-PCR dos mutantes (Figura 18) T25 e T26 apresentaram identidade com sequências de *T. harzianum* CBS226.95 anotadas como proteínas hipotéticas (M431DRAFT\_50935 acesso XM\_024918723.1 e M431DRAFT\_63966 acesso XM\_024921650.1, respectivamente) com cobertura entre 54-55% (Tabela 1). A sequência para o isolado T40 (Figura18) apresentou identidade com uma sequência de *T. harzianum* CBS226.95 anotada gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, com cobertura de 10% (Tabela 1).

**A**

```

NNNNNNNNNNNNNNNNNCCNCNTANNGGGACTAGTCTGCAGGTTAAACGAATCGCCCTTCGTCGGCAATGTGTATTAAAGTGTCTAAGCGTCAATTTGTTACACCACAA
1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 114
ATATCCTGCCACCAGCCAGCCCAACAGCTCCCGACCGGCAGCTCGGCACAAAATCACCCTCGATACAGGCAGCCCATTAATAGCCCTCAAAGTTAGTTTGTGTATAA
115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 228
AGTACTATAGCATCGTAGATTGATGCTATTGCCAGATTGACAGCATAACAACCCAAACCGCTGAGTTGTGTGCCTACCACAGACCTTGATATATACCGAAAGCAGCAGG
229 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 342
TATCTAAGTAACTTTTCATTTTTCATTTTAAAAATGGTGGGTACTTGTATAATGAGCTGAATGCCGTCGTGTTGATTGGACATCCAGATACACCTCCGATGGGTTGGTG
343 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 466
TTGCAGCATTCGCCCTTTCCTCCGCAATCTGCGACGACTTCCCTGGTCGGTACTCTGTGTCCAGAAGTCTCTCCCTCCTCCGTAAGAAGGTTATTCATCTTTCCAACAATG
457 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570
CGCCATTCCTGTTGTAGATGTTGCCGGCCCGTCAATCTTCCAGCCGCCCTCCAGGTCGTCAGAGTCGGCCTCGTGGTTCCTGACACATAACCCACCACCTCCCGGCTG
571 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 684
TGTCTAAGATCTCGCCGACTCAGACACAGCCGTCACCACATGGAGGGCAGATCGCTTCCCGGACCCAGCCTAACACCTGTAAGGGCGAATCGCGCCGCTAAATTCA
585 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 796

```

**B**

```

NNNNNNNNNNNNNNNNNCCNCNTAAAGGACTAGTCTGCAGGTTAAACGAATCGCCCTTCGTCGGCAATGTGTATTAAAGTGTCTAAGCGTCAATTTGTTACACCAC
1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 114
AATATATCCTGCCACCAGCCAGCCCAACAGCTCCCGACCGGCAGCTCGGCACAAAATCACCCTCGATACAGGCAGCCCATTAATAGCCCTCAAAGTTAGTTTATTGTA
115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 228
AATAGTACTATAGCATCGTAGATTGATGCTATTGCCAGATTGACAGCATAACAACCCAAACCGCTGAGTTGTGTGCCTACCACAGACCTTGATATATACCGAAAGCAGG
229 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 342
AGCTATCTAAGTAACTTTTCATTTTTCATTTTAAAAATGGTGGGTACTTGTATAATGAGCTGAATGCCGTCGTGTTGATTGGACATCCAGATACACCTCCGATGGGCTT
343 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 466
CTGTTGCAGCATTCGCCCTTTCCTCCGCAATCTGCGACGACTTCCCTGGTCGGTACTCTGTGTCCAGAAGTCTCTCCCTCCTCCGTAAGAAGGTTATTCATCTTTCCAACA
457 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570
TGTCGCCATTCCTGTTGTAGATGTTGCCGGCCCGTCAATCTTCCAGCCGCCCTCCAGGTCGTCAGAGTCGGCCTCGTGGTTCCTGACACATAACCCACCACCTCCCGG
571 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 684
TGATGCTAAGATCTCGCCGACTCAGACACAGCCGTCACCACATGGAGGGCAGATCGCTTCCCGGACCCAGCCTAACACCTGTAAGGGCGAATCGCGCCGCTAAATT
585 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 796

```

**C**

```

NNNNNNNNNNNNNNNNNCGGCGATTGATTAGCGGCGCGGAATCGCCCTTCCTCGTTACATCAGCTCGCAGCTACCTTATCCTGTCTGACATCTGACGACCCAACTGTCTTTTC
1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 114
TTGTCAATGCCCAAAGGTCGCCGCTCCACGTGCTGAAAAAGCTTAGAGAGGCATAAGACGGCGGAACCAATCCCGCGCACTGCCGATCGGTCGATATTGACTCCACTTC
115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 228
ACGAGCTGCCAACTCTGTACAAGTTGGGAAACAAAAGCCGGAACACAAACACATGGTGGTAGCGCAGGCGCAGGCACAGGCTCAGCTGGGCCGTCAAGCAACATTGAAGC
229 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 342
CAGGGTGGCAAAGCCGCTGTAACGTACAGATAGAGAGAGTGCAGTGTGCCAATGCTCTACCTTACATATTTCTCCCTTTTTTGATATTCGATAGTCATATCC
343 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 466
CGCCCTCTAAACTGACAAATCGGCTGCATCTGTGCGGCGCAGTAGCTCGGAGGCGTGCTTACAACCTCTCATTAAACAACAGCATCTTATGCAAGCCACATGTTCCAA
457 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570
CCGACCCACCTGGCCTGACGTTTTTCCGTCGTCTGCGGTGCGAGTATTCTATCCGCCACTCACACCATTGCTCCGTTGCATCGATCGGTGACAGGCGCTCGGGAT
571 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 684
ATATTGGTGCAAAACAAATGACGCTAGACAACTTAATAACACATTCGGGACGTTTTTAACTGACTGAATTGCCCGCGCCAGGCGGCAAGAGCTTTGGCGTGGCCATTGTG
585 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 796
CATGTTGCGAGTGGTGTCCGACATTGTTGATGTCGACAGGGGGGTAGTGCAGCTGATGTAACGAGGAAGGCGAATCGGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTGA
799 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 912

```

**Figura 18.** Análise das sequências geradas dos mutantes T25 (A), T26 (B) e T40 (C) localizadas entre os sítios de EcoRI (azul).



Tabela 1. Resultado BLASTn para os mutantes T25, T26 e T40.

	Descrição	Primer	Max Cover	Total score	Cobertura	E Value	Ident.	Acesso	Fragmento (pb)
T25	<i>Trichoderma harzianum</i> CBS226.95 hypothetical protein (M431DRAFT_50935).partial mRNA	AD3 Liu	122	122	55%	0	100%	<a href="#">XM_024918723.1</a>	721
T26	<i>Trichoderma harzianum</i> CBS226.95 hypothetical protein (M431DRAFT_63966).partial mRNA	AD5 Par	715	715	53%	0	100%	<a href="#">XM_024921650.1</a>	723
T40	<i>Colletotrichum gloeosporoides</i> glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gpd).gene, complete cds	AD2 Tsug	152	152	10%	2,00E-32	98%	<a href="#">M93427.1</a>	833

As proteínas hipotéticas representam uma fração das proteínas anotadas nos genomas de diferentes isolados de *T. harzianum*, assim como, já foram mapeadas em análises de secretomas e transcritomas de espécies de *Trichoderma* em interação com plantas hospedeiras e na interação com fungos fitopatogênicos (Steindorff et al,2014; Silva, F. L. 2017). Estas proteínas podem constituir, portanto uma família de proteínas espécie-específicas com papel na interação de espécies de *Trichoderma* com seus hospedeiros. No entanto, mais estudos são necessários para que sejam descritas as suas funções na biologia destes fungos.

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase faz parte da via glicolítica e tem papel chave na oxidação de açúcares para produção de energia e intermediários para vias anabólicas em fungos. No entanto, Pachauri et al., (2018) demonstraram em *T. virens* a associação do gene que codifica uma gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase com o *cluster* gênico *vir* que codifica enzimas da via de biossíntese de sesquiterpenos voláteis, já descritos como moléculas com atividade antifúngica e com papel na interação com plantas hospedeiras (Pachauri et al., 2018). Neste mesmo trabalho os autores demonstraram que mutantes de *T. virens* knockout para este gene em comparação com a linhagem parental tem a síntese de sesquiterpenos voláteis diminuída. Estabelecendo, portanto, um papel adicional para a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase em *T. virens*.

## 5. Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho foram identificados genes com papel no crescimento e esporulação de *T. harzianum*, no entanto, não foi possível obter a sua sequência e conseqüentemente a sua anotação funcional. Em uma análise preliminar a modificação genética além de afetar o crescimento de *T. harzianum* também afetou a sua atividade antagônica. Mais experimentos serão necessários para demonstrar a relação entre as mutações geradas os processos acima citados, assim como será necessário repetir as reações de TAIL-PCR e sequenciamento para identificação do gene mutado.



## 5. Referências Bibliográficas

- ABDEL-FATTAH, G. M., SHABANA, Y. M., ISMAIL, A. E., & RASHAD, Y. M. (2007). *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. *Mycopathologia*, 164(2), 81–89.
- ALMEIDA, F. B. DOS R., CERQUEIRA, F. M., SILVA, R. DO N., ULHOA, C. J., & LIMA, A. L. (2007). Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 29(8), 1189–1193
- ALKOORANEE, J. T., ALEDAN, T. R., ALI, A. K., LU, G., ZHANG, X., WU, J., ... LI, M. (2017). Detecting the Hormonal Pathways in Oilseed Rape behind Induced Systemic Resistance by *Trichoderma harzianum* TH12 to *Sclerotinia sclerotiorum*. *PLOS ONE*, 12(1), e0168850.
- ANDO, H., KURATA, A., AND KISHIMOTO, N. (2015). Antimicrobial properties and mechanism of volatile isoamyl acetate, a main flavour component of Japanese sake (Ginjo-shu). *J. Appl. Microbiol.* 118, 873–880.
- AKILANDESWARI, P., & PRADEEP, B. V. (2015). Exploration of industrially important pigments from soil fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(4), 1631–1643.
- ATANASOVA L, LE CROM S, GRUBER S, ET AL (2013). Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC Genomics*. 2013;14:121. Published 2013 Feb 22.
- ATANASOVA, L., SABINE GRUBER, ALEXANDER LICHIOUS, et al., (2018). The Gpr1-regulated Sur7 family protein Sfp2 is required for hyphal growth and cell wall stability in the mycoparasite *Trichoderma atroviride* *Sci Rep.*; 8: 12064.
- BAE ET AL.(2017) Molecular Identification, Enzyme Assay, and Metabolic Profiling of *Trichoderma* spp.*J. Microbiol. Biotechnol.* (2017), 27(6), 1157–1162
- BAEK, J.M., HOWELL, C.R. AND KENERLEY, C.M. (1999) The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics* 35, 41–50.

- BASSINELLO, P. Z. (2007). Qualidade dos grãos. Brasília: Embrapa Arroz e Feijão. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia4/AG01/arvore/AG01\\_2\\_28102004161635.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia4/AG01/arvore/AG01_2_28102004161635.html)>. Acesso em: 10/04/2018.
- BALATBAT, A. B.; JORDAN, G. W.; TANG, Y. J.; SILVA, J. J. (1996). Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. V. 34, p. 1769-1772.
- BARBETTI M. J., BANGA S. K., FU T. D., LI Y. C., SINGH D., LIU S. Y., ET AL. (2014). Comparative genotype reactions to *Sclerotinia sclerotiorum* within breeding populations of *Brassica napus* and *B. juncea* from India and China. *Euphytica* 197, 47–59.
- BARKER Phenol-Chloroform Isoamyl Alcohol (PCI) DNA Extraction; 1998.
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72(4):379-382
- BERNARD, M.; LATGÈ, J.P. *Aspergillus fumigatus* cell wall: Composition and biosynthesis. *Med. Mycol.* 2001, 39, 9–17.
- BENÍTEZ, T., A M. RINCÓN M. CARMEN LIMÓN; ANTONIO C. CODÓN (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains *International Microbiology* 7:249-260.
- BHATIA, R., JOE A. GALLAGHER, LEONARDO D. GOMEZ, MAURICE BOSCH (2017). Genetic engineering of grass cell wall polysaccharides for biorefining *Plant Biotechnol J.* 2017 Sep; 15(9): 1071–1092.
- BHADAURIA, V., BANNIZA, S., WEI, Y., PENG, YOU-LIANG. (2009). Reverse Genetics for Functional Genomics of Phytopathogenic Fungi and Oomycetes. *Comparative and Functional Genomics*. Article ID 380719, 11 pages.
- BŁASZCZYK, L.; SIWULSKI, M.; SOBIERALSKI, K.; LISIECKA, J.; JĘDRYCZKA, M. (2014). *Trichoderma* spp. – application and prospects for use in organic farming and industry. *Journal of Plant Protection Research* 54 (4).
- BŁASZCZYK, L. ET AL. (2017). Suppressive Effect of *Trichoderma* spp. on Toxigenic *Fusarium* Species *Polish Journal of Microbiology*. Vol. 66, No 1, 85–100
- BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

- BOLTON MD, THOMMA BP, NELSON BD (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Mol Plant Pathol.* Jan 1; 7(1):1-16.
- BROETTO, L., DA SILVA, W. O. B., BAILÃO, A. M., DE ALMEIDA SOARES, C., VAINSTEIN, M. H., & SCHRANK, A. (2010). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: cell-surface localization and role in host adhesion. *FEMS Microbiology Letters*, 312(2), 101–109.
- BURDON, J. J.; JAROSZ, A. M. (1988). The ecological genetics of plant–pathogen interactions in natural communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 321:349–363.
- BRUNNER K, OMANN M, PUCHER ME, DELIC M, LEHNER SM, DOMNANICH P, KRATOCHWILL K, DRUZHININA I, DENK D, ZEILINGER S (2008) *Trichoderma* G protein-coupled receptors: functional characterisation of a cAMP receptor-like protein from *Trichoderma atroviride*. *Curr Genet.* Dec; 54(6):283-99.
- CABRAL, C.M., CHERQUI, A., PEREIRA, A., SIMÕES, N. (2004). Purification and characterization of two distinct metalloproteases secreted by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus* sp. strain Az29. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3831-3838.
- CARDOZA, R.E., VIZCAINO, J.A., HERMOSA, M.R., SOUSA, S., GONZALEZ, F.J., LLOBELL, A., MONTE, E. AND GUTIERREZ, S. (2006) Cloning and characterization of the *erg1* gene of *Trichoderma harzianum*: effect of the *erg1* silencing on ergosterol biosynthesis and resistance to terbinafine. *Fungal Genetics and Biology* 43, 164–178.
- CARVALHO DDC, GERALDINE AM, JUNIOR ML, DE MELLO SCM. 2015. Biological control of white mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 50: 1220–1224.
- CRAY, J. A. ET AL. (2016). Biocontrol agents promote growth of potato pathogens, depending on environmental conditions. *Microbial Biotechnology* (2016) 9(3), 330–354
- CONTRERAS-CORNEJO, H.A., MACIAS-RODRIGUEZ, L., CORTES-PENAGOS, C. AND LOPEZ-BUCIO, J. (2009) *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 149, 1579–1592.

- CONTRERAS-CORNEJO, H.Á.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; DEL-VAL, E.; LARSEN, J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* V. 92(4)
- CONAB- (2017).COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Perspectivas para a agropecuária. Vol. 5, safra 2017/2018, Produtos de Verão. Brasília.
- COTTON P, KASZA Z, BRUEL C, RASCLE C, FÈVRE M Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiol Lett.* 2003 Oct 24; 227(2):163-9.
- DE GROOT MJ, BUNDOCK P, HOOYKAAS PJ, BEIJERSBERGEN AG (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol* 16:839–842.
- DEBBI, A., HOUDA BOUREGHDA, ENRIQUE MONTE, ROSA HERMOSA (2018). Distribution and Genetic Variability of *Fusarium oxysporum* Associated with Tomato Diseases in Algeria and a Biocontrol Strategy with Indigenous *Trichoderma* spp. *Front Microbiol.* 2018;
- Do NASCIMENTO, M. O., DE ALMEIDA SARMENTO, R., DOS SANTOS, G. R., DE OLIVEIRA, C. A., & DE SOUZA, D. J. (2017). Antagonism of *Trichoderma* isolates against *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. *Journal of Basic Microbiology*, 57(8), 699–704.
- DRUZHININA, I.S., SEIDL-SEIBOTH, V., HERRERA-ESTRELLA, A., HORWITZ, B.A., KENERLEY, C.M., MONTE, E., MUKHERJEE, P.K.,ZEILINGER, S., GRIGORIEV, I.V. AND KUBICEK, C.P. (2011) *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success *Nature Reviews Microbiology* 9, 749–759.
- El-Debaiky, S.A. (2017). Antagonistic studies and hyphal interactions of the new antagonista *Aspergillus piperis* against some phytopathogenic fungi in vitro in comparison with *Trichoderma harzianum* *Microbial Pathogenesis* 113 (2017) 135
- ELAD, Y.; CHET, I.; KATAN, J. (1980). *Trichoderma harzianum*: A Biocontrol Agent Effective Against *Sclerotium rolfii* and *Rhizoctonia solani*. *Disease Control and Pest Management*. Vol. 70, No. 2.
- ELAD, Y. (1995). Mycoparasitism. In: Kohmoto, K., Singh, U.S. and Singh, R.P. (eds) *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases. Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Basis, Eukaryotes*, Vol. II. Pergamon, Elsevier Science, Oxford, pp. 289–307.
- FÁVARO, L.C.L. (2009). Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. Com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

- FERNANDO W.G.D., NAKKEERAN S., ZHANG Y., SAVCHUK S. (2007): Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. *Crop Protection*, 26: 100 – 107
- FRANSEN, R. J. N. (2011). A guide to binary vectors and strategies for targeted genome modification in fungi using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Journal of Microbiological Methods*, 87(3), 247–262.
- FRANCO-OROZCO, B., BEREPIKI, A., RUIZ, O., GAMBLE, L., GRIFFE, L. L., WANG, S., ... AVROVA, A. (2017). A new proteinaceous pathogen-associated molecular pattern (PAMP) identified in Ascomycete fungi induces cell death in Solanaceae. *New Phytologist*, 214(4), 1657–1672. doi:10.1111/nph.14542
- FREITAS, R. S.; STEINDORFF, A. S.; RAMADA, M. H. S.; SIQUEIRA, S. J. L.; NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. (2014). Cloning and characterization of a protein elicitor Sm1 gene from *Trichoderma harzianum*. *Biotechnol Lett* 36:783–788
- FUJIMOTO, S., MATSUNAGA, S., & MURATA, M. (2016). Mapping of T-DNA and Ac/Ds by TAIL-PCR to Analyze Chromosomal Rearrangements. *Chromosome and Genomic Engineering in Plants*, 207–216.
- GAL-HEMED, I., ATANASOVA, L., KOMON´ZELAZOWSKA, M., DRUZHININA, I.S., VITERBO, A. AND YARDEN, O. (2011) Marine isolates of *Trichoderma* spp. as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 5100–5109.
- GARCÍA-GUZMÁN, G.; MORALES, E. (2007). Life-history strategies of plant pathogens: distribution patterns and phylogenetic analysis. *Ecological Society of America Ecology*, 88(3), pp. 589–596.
- GUIMARÃES RL, STOTZ HU (2004).Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. *Plant Physiol.* 2004 Nov; 136(3):3703-11
- GUZMÁN-GUZMÁN, P.; ALEMÁN-DUARTE, M. I.; DELAYE, L.; HERRERA-ESTRELLA, A.; OLMEDO-MONFIL, V. (2017). Identification of effector-like proteins in *Trichoderma* spp. and role of a hydrophobin in the plant-fungus interaction and mycoparasitism. *BMC Genetics*
- HARMAN G.E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* 84 (4): 377–393.

- HARMAN G.E., HOWELL C.R., VITERBO A., CHET I., LORITO M. (2004). *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (1): 43–56.
- HARMAN G.E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96 (2): 190–194.
- HERMOSA, R., VITERBO, A., CHET, I., & MONTE, E. (2011). *Plant-beneficial effects of Trichoderma and of its genes. Microbiology, 158(1), 17–25.*
- HERMOSA, R., VITERBO, A., CHET, I. AND MONTE, E. (2012) Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158, 17–25.
- HOWELL, C.R. (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87, 4–10.
- IDNURM, A., BAILEY, A. M., CAIRNS, T. C., ELLIOTT, C. E., FOSTER, G. D., IANIRI, G., & JEON, J. (2017). A silver bullet in a golden age of functional genomics: the impact of *Agrobacterium*-mediated transformation of fungi. *Fungal Biology and Biotechnology*, 4(1).
- IQBAL, M., DUBEY, M., MCEWAN, K., MENZEL, U., FRANKO, M. A., VIKETOFT, M., KARLSSON, M. (2018). Evaluation of *Clonostachys rosea* for Control of Plant-Parasitic Nematodes in Soil and in Roots of Carrot and Wheat. *Phytopathology*, 108(1), 52–59..
- JENKINS, J. L., TANNER, J. J. High-resolution structure of human D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62 290-301. (2006).
- KARIMI AGHCHEH R, DRUZHININA IS, KUBICEK CP. (2013). The putative protein methyltransferase LAE1 of *Trichoderma atroviride* is a key regulator of asexual development and mycoparasitism. *PLoS One.*; 8(6):e67144
- KASHYAP, P. L., RAI, P., SRIVASTAVA, A. K., & KUMAR, S. (2017). *Trichoderma* for climate resilient agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(8).
- KIM, S.; et al.(2005). MHP1, a Magnaporthe grisea hydrophobin gene, is required for fungal development and plant colonization. *Mol Microbiol.* 57:1224–37
- LEONETTI, P., ZONNO, M. C., MOLINARI, S., & ALTOMARE, C. (2017). Induction of SA-signaling pathway and ethylene biosynthesis in *Trichoderma harzianum*-treated tomato plants after infection of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant Cell Reports*, 36(4), 621–631.

- LI, YAQIAN ET AL.,(2016). Antagonistic and Biocontrol Potential of *Trichoderma asperellum* ZJSX5003 Against the Maize Stalk Rot Pathogen *Fusarium graminearum* . *Indian J Microbiol.*56(3):318–327
- LI, D., TANG, Y., LIN, J., & CAI, W. (2017). *Methods for genetic transformation of filamentous fungi. Microbial Cell Factories, 16(1).*
- LIMON, M.C., PINTOR-TORO, J.A. AND BENITEZ, T. (1999) Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. *Phytopathology* 89, 254–261.
- LIMON, M.C., CHACON, M.R., MEJIAS, R., DELGADO-JARANA, J., RINCON, A.M., CODON, A.C. AND BENITEZ, T. (2004) Increased antifungal and chitinase specific activities of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 by addition of a cellulose binding domain. *Applied Microbiology and Biotechnology, 64, 675–685.*
- LIU, Yao-Guang et al. (1995). Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal, v. 8, n. 3, p. 457-463,*
- MA, B; BAN X, HUANG B, HE J, TIAN J, ZENG H, et al. (2015). Interference and Mechanism of Dill Seed Essential Oil and Contribution of Carvone and Limonene in Preventing *Sclerotinia* Rot of Rapeseed. *PLoS ONE 10(7): e0131733.*
- MARSCHALL R., TUDZYNSKI P. (2016). Reactive oxygen species in development and infection processes. *Semin. Cell Dev. Biol.* 57138–146.
- MARTÍNEZ-MEDINA, A., VAN WEES, S. C. M., & PIETERSE, C. M. J. (2017). Airborne signals from *Trichoderma* fungi stimulate iron uptake responses in roots resulting in priming of jasmonic acid-dependent defences in shoots of *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum* . *Plant, Cell & Environment, 40(11), 2691–2705.*
- MEDINA-ROMERO, Y. M., ROQUE-FLORES, G., AND MACÍAS-RUBALCAVA, M. L. (2017). Volatile organic compounds from endophytic fungi as innovative postharvest control of *Fusarium oxysporum* in cherry tomato fruits. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 8209–8222.
- MEYER, et al., (2017). Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2016/17: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. *Circular Técnica, 133.* 2017.

- MIAO, F. P., LI, X. D., LIU, X. H., CICHEWICZ, R. H., AND JI, N. Y. (2012). Secondary metabolites from an algicolous *Aspergillus versicolor* strain. *Mar Drugs* 10, 131–139.
- MILGROOM MG, FRY WE. (1988). A simulation analysis of the epidemiological principles for fungicide resistance management in pathogen populations. *Phytopathology*;78: 565–570.
- MONTEIRO, V. N., DO NASCIMENTO SILVA, R., STEINDORFF, A. S., COSTA, F. T., NORONHA, E. F., RICART, C. A. O., ULHOA, C. J. (2010). New Insights in *Trichoderma harzianum* Antagonism of Fungal Plant Pathogens by Secreted Protein Analysis. *Current Microbiology*, 61(4), 298–305.
- MORENO FRÍAS M, JIMÉNEZ TORRES M, GARRIDO FRENICH A, MARTÍNEZ VIDAL JL, OLEA-SERRANO F, OLEA N Determination of organochlorine compounds in human biological samples by GC-MS/MS. *Biomed Chromatogr. 2004 Mar; 18(2):102-11.*
- MUKHERJEE, M., MUKHERJEE, P.K., HORWITZ, B.A., ZACHOW, C., BERG, G. AND ZEILINGER, S. (2012) *Trichoderma*–plant–pathogen interactions: advances in genetics of biological control. *Indian Journal of Microbiology*52, 522–529.
- MULLINS, E. D. et al. (2001). Agrobacterium-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*, v. 91, n. 2, p. 173-180, 2001.
- NIMCHUK, Z., EULGEM, T., HOLT, B.F., III AND DANGL, J.L. (2003) Recognition and response in the plant immune system. *Annual Reviews of Genetics* 37, 579–609.
- NORONHA, E. F., KIPNIS, A., JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P., & ULHOA, C. J. (2000). Regulation of 36-kDa  $\beta$ -1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*, 188(1), 19–22.
- OLIVER RP, SOLOMON OS New developments in pathogenicity and virulence of necrotrophs. *Curr Opin Plant Biol. 2010 Aug; 13(4):415-9.*
- OMANN MR, LEHNER S, ESCOBAR RODRÍGUEZ C, BRUNNER K, ZEILINGER S, (2012) The seven-transmembrane receptor Gpr1 governs processes relevant for the antagonistic interaction of *Trichoderma atroviride* with its host. *Microbiology*. 2012 Jan; 158(Pt 1):107-18.
- PACHAURI, S., CHATTERJEE, S., KUMAR, V., & MUKHERJEE, P. K. (2018). A dedicated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in the biosynthesis of volatile sesquiterpenes in *Trichoderma virens*—evidence for the role of a fungal GAPDH in secondary metabolism. *Current Genetics*.



- PITZSCHKE, ANDREA; HIRT, HERIBERT. (2010). New insights into an old story: *Agrobacterium* induced tumour formation in plants by plant transformation. *The EMBO Journal*, v. 29, n. 6, p. 1021-1032.
- PIRES CSS, FONTES EMG, SUJII ER. (2003). Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas: O algodão como estudo de caso. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.; HEMMONS, L.H.; MCDONALD, BUFTON, W. J. (1953) The Genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5:141-238.
- QUALHATO, T. F., LOPES, F. A. C., STEINDORFF, A. S., BRANDÃO, R. S., JESUINO, R. S. A., & ULHOA, C. J. (2013). Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 35(9), 1461–1468.
- RAMADA, M.H. S., LOPES, F. Á. C., ULHOA C. J., SILVA, R. N. (2010). Optimized microplate  $\beta$ -1,3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. screening. *Journal of Microbiological Methods* volume 81, issue 1. pages 6-10.
- RAMADA, M. H. S.; STEINDORFF, B. J. A. S.; ULHOA, C. J. (2015). Secretome analysis of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivated in different media supplemented with *Fusarium solani* cell wall or glucose. *Proteomics*. Volume 16, Issue 3.
- RAMADA, M. H. S., STEINDORFF, A. S., BLOCH, C., & ULHOA, C. J. (2016). Secretome analysis of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivated in different media supplemented with *Fusarium solani* cell wall or glucose. *PROTEOMICS*, 16(3), 477–490.
- RAN, H. LIJIANG LIU, BO LI, JIASEN CHENG, YANPING FU, DAOHONG JIANG, JIATAO XIE. (2016). Co-infection of a hypovirulent isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* with a new botybirnavirus and a strain of a mitovirus *Virologica Sinica* 2016; 39: 92. Published online 2016 Jun 6.
- REITHNER, B., BRUNNER, K., SCHUHMACHER, R., PEISSEL, I., SEIDL, V., KRŠKA, R., & ZEILINGER, S. (2005). The G protein  $\alpha$  subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genetics and Biology*, 42(9), 749–760.

- ROCHA-RAMIREZ, V., OMER, C., CHET, I., HORWITZ, B.A. AND HERRERA-ESTRELLA, A. (2002) *Trichoderma atroviride* G-protein  $\alpha$ -subunit gene *tgal* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. *Eukaryotic Cell* 1, 594–605.
- RUBIO MB, HERMOSA R, REINO JL, COLLADO IG, MONTE E (2009). Thctf1 transcription factor of *Trichoderma harzianum* is involved in 6-pentyl-2H-pyran-2-one production and antifungal activity. *Fungal Genet Biol.* 2009 Jan; 46(1):17-27.
- RUBIO, M.B.; QUIJADA, N. M.; PÉREZ, E.; DOMÍNGUEZ, S.; MONTE, E.; HERMOSA, R. (2014) Identifying Beneficial Qualities of *Trichoderma parareesei* for Plants. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 80 N. 6 p. 1864–1873.
- ROBIEN, M. A., BOSCH, J., BUCKNER, F. S., et al., (2006). Crystal structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* at 2.25 Å resolution reveals intriguing extra electron density in the activesite. *Proteins* 62 570-7.
- SAMUELS, G. J., 2006. *Trichoderma*: Systematics, the Sexual State, and Ecology. *Phytopathology*, 96, pp. 195-206.
- SEGARRA, G.; DAVID E. C. (2007). Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34 *Proteomics* 2007, 7, 3943–3952
- SESSIONS, A., et al. (2002). A High-Throughput Arabidopsis Reverse Genetics System. *The Plant Cell*, Vol. 14, 2985–2994.
- SHORESH, M.; HARMAN, E.; MASTOURI, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu Rev Phytopathol.*;48:21–43.
- SILVA J.; CHANG, K.; HANNON, G. J.; RIVAS, F. V. (2004). RNA-interference-based functional genomics in mammalian cells: reverse genetics coming of age. *Oncogene* 23, 8401–8409
- SILVA, O. F. (2013). O feijão-comum no Brasil: passado, presente e futuro - Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão.
- SOYLU S, YIGITBAS H, SOYLU EM, KURT S (2007) Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. *J Appl Microbiol* 103: 1021–1030.
- STEINDORFF, A. S.; SILVA, R. N.; COELHO, A. S. G.; NAGATA, T.; NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. (2012). *Trichoderma harzianum* expresses sequence tags for identification of genes with putative roles in mycoparasitism against *Fusarium solani*. *Biological Control*, v. 61, p. 1-10.

- STEINDORFF ET AL. (2014). Identification of mycoparasitism related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. BMC Genomics.
- STEINDORFF, Andrei Stecca. (2016). Genômica estrutural e funcional de fungos do gênero *Trichoderma*. Tese de doutorado.
- SINGH, V., UPADHYAY, R. S., SARMA, B. K., & SINGH, H. B. (2016). *Trichoderma asperellum* spore dose depended modulation of plant growth in vegetable crops. Microbiological Research. 2016.
- SCOTT B. (2015). Conservation of fungal and animal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase complexes. Mol. Microbiol. 95 910–913.
- SZEKERES A, KREDICS L, ANTAL Z, KEVEI F, MANCZINGER L (2004). Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiol Lett. Apr 15; 233(2):215-22.
- TAKEMOTO D., TANAKA A., SCOTT B. (2007). NADPH oxidases in fungi: diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation. Fungal Genet. Biol. 44 1065–1076.
- TROIAN, R. F., STEINDORFF, A. S., RAMADA, M. H. S., ARRUDA, W., & ULHOA, C. J. (2014). Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. Biotechnology Letters, 36(10), 2095–2101.
- VARGAS, W. A.; MANDAWA J. C.; KENERLEY C. (2009).M. Plant-Derived Sucrose Is a Key Element in the Symbiotic Association between *Trichoderma virens* and Maize Plants. Plant Physiology. Vol. 151, pp. 792–808
- VIEIRA, P. M., COELHO, A. S. G., STEINDORFF, A. S., DE SIQUEIRA, S. J. L., SILVA, R. DO N., & ULHOA, C. J. (2013). Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma harzianum* during growth on cell wall of *Fusarium solani* as a tool for biotechnological application. BMC Genomics, 14(1), 177.
- VINALE, F., SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E.L., MARRA, R., WOO, S.L. AND LORITO, M (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. Soil Biology and Biochemistry 40, 1–10.

- VITERBO A, WIEST A, BROTMAN Y, CHET I, KENERLEY C (2007). The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. *Mol Plant Pathol.* 2007 Nov; 8(6):737-46.
- XUE C, HSUEH YP, HEITMAN J. (2008) Magnificent seven: roles of G protein-coupled receptors in extracellular sensing in fungi. *FEMS Microbiol Rev.* 2008 Nov; 32(6):1010-32..
- WAGHUNDE, R. R.; SHELAKI, R. M.; SABALPARA, A. N. (2016) .*Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. *Afr. J. Agric. Res.*
- WANG K, HERRERA-ESTRELLA A, VAN MONTAGU M (1990) Overexpression of virD1 and virD2 genes in *Agrobacterium tumefaciens* enhances T-complex formation and plant transformation. *J Bacteriol.* Aug; 172(8):4432-40.
- WANG Y, HOU Y, CHEN C, ZHOU M. (2014). Detection of resistance in *Sclerotinia sclerotiorum* to carbendazim and dimethachlon in Jiangsu province of China. *Australas Plan Pathol.* ;43:307–12.
- WOO, S. L.; SCALA, F.; RUOCCO, M.; LORITO, M. (2006) .The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., pathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* 96:181-185.
- WU, Q., SUN, R., NI, M., YU, J., LI, Y., YU, C., DOU, K., REN, J., ... CHEN, J. (2017). Identification of a novel fungus, *Trichoderma asperellum* GDFS1009, and comprehensive evaluation of its biocontrol efficacy. *PloS one*, 12(6), e0179957. doi:10.1371/journal.pone.0179957
- YAO, L., TAN, C., SONG, J., YANG, Q., YU, L., & LI, X. (2016). Isolation and expression of two polyketide synthase genes from *Trichoderma harzianum* 88 during mycoparasitism. *Brazilian journal of microbiology: publication of the Brazilian Society for Microbiology*, 47(2), 468-79.
- YIN, Y., WU, S., CHUI, C., MA, T., JIANG, H., HAHN, M., & MA, Z. (2018). The MAPK kinase BcMkk1 suppresses oxalic acid biosynthesis via impeding phosphorylation of BcRim15 by BcSch9 in *Botrytis cinerea*. *PLOS Pathogens*, 14(9), e1007285.
- ZACHOW, C., BERG, C., MÜLLER, H., MONK, J., & BERG, G. (2016). Endemic plants harbour specific *Trichoderma* communities with an exceptional potential for biocontrol of phytopathogens. *Journal of Biotechnology*, 235, 162–170

- ZHANG, W.M., WANG, H.-F., GAO, K., WANG, C., LIU, L., & LIU, J.-X. (2015). *Lactobacillus reuteri* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase functions in adhesion to intestinal epithelial cells. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(5), 373–380
- ZONNEVELD, B.J.M. (1973) Inhibitory Effect of 2-deoxyglucose on cell-wall  $\alpha$ -1,3-glucan synthesis and cleistothecium development in *Aspergillus nidulans*. *Dev. Biol.*, 34, 1–8

## Arquivo Suplementar 1

### Tabelas de reações e reagentes presentes na TAIL-PCR

Tabela Suplementar 1. Primers utilizados na TAIL-PCR. T<sub>m</sub><sup>o</sup>, temperatura de anelamento (Mullins et al., 2011).

Primer	Sequência	Correspondência	Referência	T <sub>m</sub> <sup>o</sup>
<b>LB1</b>	GTCAGCTCCGGCACCTTATCCTTG	T-DNA border	Favaro,2009	63,3°C
<b>LB2</b>	CCTCGTTACATCAGCTCGCAGCTAC	T-DNA border	Favaro,2009	67°C
<b>LB3</b>	CGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC	T-DNA border	Favaro,2009	61,4°C
<b>AD11 Pari</b>	NCASGAWAGNCSWCAA	Aleatório	Parinov <i>et al</i> (1999)	51,1 °C
<b>AD5 Pari</b>	WGCNAGTNAGWANAAG	Aleatório	Parinov <i>et al</i> (1999)	50,2 °C
<b>AD2 Ses</b>	TGWNAGSANCASAGA	Aleatório	Sessions <i>et al</i> (2002)	49 °C
<b>AD3 Liu</b>	WGTGNAGWANCANAGA	Aleatório	Liu e Whittier, 1995	43,7 °C
<b>AD1Liu</b>	NGTCGASWGANAWGAA	Aleatório	Liu e Whittier, 1995	39,9 °C
<b>AD6 Ama</b>	WGCNAGTNAGWANAAG	Aleatório	Meinke <i>et al.</i> , 2009	44 °C
<b>AD7 Ama</b>	AWGCANGNCWGANATA	Aleatório	Meinke <i>et al.</i> , 2009	47,7 °C

Tabela Suplementar 2. Reagentes utilizados na reação de TAIL-PCR (Mullins et al, 2011). \*Dados mostrados na tabela 3.

Reagentes	Concentração na reação primária	Concentração na reação Secundária	Concentração na reação terciária
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	-	-
Tampão	1 X	1 X	1 X
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	2 mM	2 mM
dNTP	200 µM	200 µM	200 µM
Primer Epecífico	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM
Primer AD	*Variável	*Variável	*Variável
Taq polimerase	0,8 U	0,6 U	0,6 U
Material genético	20 ng de DNA genômico	Produto da reação anterior diluído 1:10	Produto da reação anterior diluído 1:10
Volume total da reação	20 µL	20 µL	50 µL

Tabela Suplementar 3. Concentrações e volumes utilizados de cada primers aleatórios e degenerados utilizados

Primer AD	Concentração Reação primária	Volume na reação Primária	Concentração Reação Secundária	Volume na reação secundária	Concentração Reação Terciária	Volume na reação secundária
AD2_Ses	3 µM	0,6 µL	1,8 µM	0,36 µL	1,8 µM	0,9 µL
AD5_Par	10 µM	2,0 µL	10 µM	2,0 µL	10 µM	5 µL
AD11_Par	10 µM	2,0 µL	10 µM	2,0 µL	10 µM	5 µL
AD6_Ama	1,3 pMol/ µL	0,26 µL	1,3 pMol/ µL	0,26 µL	0,6 pMol/µl	0,3 µl
AD7_Ama	1,3 pMol/ µL	0,26 µL	1,3 pMol/ µL	0,26 µL	0,6 pMol/µl	0,3 µl
AD1_Liu	4,0 µM	0,8 µL	2,0 µM	0,4 µL	2 mM	1 µl
AD3_Liu	2,0 µM	0,4 µL	1,5 µM	0,3 µL	1,5 mM	0,75 µl

Tabela Suplementar 4. Ciclagem da reação TAIL-PCR primária (Mullins et al., 2011).

Etapa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação inicial	1	92	2 min
Desnaturação		94	30 s
Anelamento	5	66	1 min
Elongação		72	2 min
Desnaturação		94	30 s
Anelamento	1	35	3 min
Elongação		72	3 min
Elongação		72	2 min
Desnaturação		94	5 s
Anelamento	10	48	1 min
Elongação		72	2 min
Desnaturação		94	5 s
Anelamento	15	66	1 min
Elongação		72	2 min
Desnaturação		94	5 s
Anelamento	15	66	1 min
Elongação		72	2 min
Desnaturação		94	5 s
Anelamento	15	48	1 min
Elongação		72	2 min
Elongação final	1	72	5 min

Tabela Suplementar 5. Ciclagem da reação TAIL-PCR secundária (Mullins et al., 2011).

Etapa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação		94	5 s
Anelamento	15	63	1 min
Elongação		72	2 min
Desnaturação		94	5 s
Anelamento	15	63	1 min
Elongação		72	2 min
Desnaturação		94	10 s
Anelamento	15	44	1 min
Elongação		72	2 min
Elongação final	1	72	5 min

Tabela Suplementar 6. Ciclagem da reação TAIL-PCR terciária (Mullins et al., 2011).

Etapa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação inicial	1	94	10 s
Desnaturação		94	15 s
Anelamento	20	48	15 s
Elongação		72	2 min
Elongação final	1	72	5 min



# Arquivo Suplementar 1

## Crescimento em meio mínimo- Análise Estatística

### Análise de variância One Way

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
TR274 MM 24	3	0	0.133	0.115	0.0667
TR274 MM 48	3	0	0.667	0.115	0.0667
TR274 MM 72	3	0	1.333	0.0577	0.0333
TR274 MM 96	3	0	3.067	0.115	0.0667
T25 MM 24	3	0	0.000	0.000	0.000
T25 MM 48	3	0	0.933	0.115	0.0667
T25 MM 72	3	0	1.200	0.200	0.115
T25 MM 96	3	0	2.200	0.200	0.115
T26 MM 24	3	0	0.133	0.115	0.0667
T26 MM 48	3	0	0.933	0.115	0.0667
T26 MM 72	3	0	2.400	0.200	0.115
T26 MM 96	3	0	2.667	0.115	0.0667
T40 MM 24	3	0	0.000	0.000	0.000
T40 MM 48	3	0	0.533	0.115	0.0667
T40 MM 72	3	0	1.200	0.200	0.115
T40 MM 96	3	0	2.000	0.200	0.115

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	15	44.273	2.952	152.335	<0.001
Residual	32	0.620	0.0194		
Total	47	44.893			

As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado pelo acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = <0.001$ ).

Amplitude do teste executado com alfa = 0.050: 1.000

Todos os procedimentos de comparação múltipla emparelhados (Teste Tukey):

Comparisons for factor:	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
TR274 MM 96 vs. T40 MM 24	3.067	16	38.160	<0.001	Yes
TR274 MM 96 vs. T25 MM 24	3.067	16	38.160	<0.001	Yes
TR274 MM 96 vs. TR274 MM 24	2.933	16	36.501	<0.001	Yes
TR274 MM 96 vs. T26 MM 24	2.933	16	36.501	<0.001	Yes
TR274 MM 96 vs. T40 MM 48	2.533	16	31.523	<0.001	Yes
TR274 MM 96 vs. TR274 MM 48	2.400	16	29.864	<0.001	Yes
TR274 MM 96 vs. T26 MM 48	2.133	16	26.546	<0.001	Yes
TR274 MM 96 vs. T25 MM 48	2.133	16	26.546	<0.001	Yes
TR274 MM 96 vs. T25 MM 72	1.867	16	23.228	<0.001	Yes
TR274 MM 96 vs. T40 MM 72	1.867	16	23.228	<0.001	Yes
TR274 MM 96 vs. TR274 MM 72	1.733	16	21.569	<0.001	Yes
TR274 MM 96 vs. T40 MM 96	1.067	16	13.273	<0.001	Yes
TR274 MM 96 vs. T25 MM 96	0.867	16	10.784	<0.001	Yes
TR274 MM 96 vs. T26 MM 72	0.667	16	8.296	<0.001	Yes
TR274 MM 96 vs. T26 MM 96	0.400	16	4.977	0.077	No
T26 MM 96 vs. T40 MM 24	2.667	16	33.182	<0.001	Yes
T26 MM 96 vs. T25 MM 24	2.667	16	33.182	<0.001	Yes
T26 MM 96 vs. TR274 MM 24	2.533	16	31.523	<0.001	Yes
T26 MM 96 vs. T26 MM 24	2.533	16	31.523	<0.001	Yes
T26 MM 96 vs. T40 MM 48	2.133	16	26.546	<0.001	Yes

T26 MM 96 vs. TR274 MM 48	2.000	16	24.887	<0.001	Yes
T26 MM 96 vs. T26 MM 48	1.733	16	21.569	<0.001	Yes
T26 MM 96 vs. T25 MM 48	1.733	16	21.569	<0.001	Yes
T26 MM 96 vs. T25 MM 72	1.467	16	18.250	<0.001	Yes
T26 MM 96 vs. T40 MM 72	1.467	16	18.250	<0.001	Yes
T26 MM 96 vs. TR274 MM 72	1.333	16	16.591	<0.001	Yes
T26 MM 96 vs. T40 MM 96	0.667	16	8.296	<0.001	Yes
T26 MM 96 vs. T25 MM 96	0.467	16	5.807	0.019	Yes
T26 MM 96 vs. T26 MM 72	0.267	16	3.318	0.596	No
T26 MM 72 vs. T40 MM 24	2.400	16	29.864	<0.001	Yes
T26 MM 72 vs. T25 MM 24	2.400	16	29.864	<0.001	Yes
T26 MM 72 vs. TR274 MM 24	2.267	16	28.205	<0.001	Yes
T26 MM 72 vs. T26 MM 24	2.267	16	28.205	<0.001	Yes
T26 MM 72 vs. T40 MM 48	1.867	16	23.228	<0.001	Yes
T26 MM 72 vs. TR274 MM 48	1.733	16	21.569	<0.001	Yes
T26 MM 72 vs. T26 MM 48	1.467	16	18.250	<0.001	Yes
T26 MM 72 vs. T25 MM 48	1.467	16	18.250	<0.001	Yes
T26 MM 72 vs. T25 MM 72	1.200	16	14.932	<0.001	Yes
T26 MM 72 vs. T40 MM 72	1.200	16	14.932	<0.001	Yes
T26 MM 72 vs. TR274 MM 72	1.067	16	13.273	<0.001	Yes
T26 MM 72 vs. T40 MM 96	0.400	16	4.977	0.077	No
T26 MM 72 vs. T25 MM 96	0.200	16	2.489	0.913	Do Not Test
T25 MM 96 vs. T40 MM 24	2.200	16	27.376	<0.001	Yes
T25 MM 96 vs. T25 MM 24	2.200	16	27.376	<0.001	Yes
T25 MM 96 vs. TR274 MM 24	2.067	16	25.716	<0.001	Yes
T25 MM 96 vs. T26 MM 24	2.067	16	25.716	<0.001	Yes
T25 MM 96 vs. T40 MM 48	1.667	16	20.739	<0.001	Yes
T25 MM 96 vs. TR274 MM 48	1.533	16	19.080	<0.001	Yes
T25 MM 96 vs. T26 MM 48	1.267	16	15.762	<0.001	Yes
T25 MM 96 vs. T25 MM 48	1.267	16	15.762	<0.001	Yes
T25 MM 96 vs. T25 MM 72	1.000	16	12.443	<0.001	Yes
T25 MM 96 vs. T40 MM 72	1.000	16	12.443	<0.001	Yes
T25 MM 96 vs. TR274 MM 72	0.867	16	10.784	<0.001	Yes
T25 MM 96 vs. T40 MM 96	0.200	16	2.489	0.913	Do Not Test
T40 MM 96 vs. T40 MM 24	2.000	16	24.887	<0.001	Yes
T40 MM 96 vs. T25 MM 24	2.000	16	24.887	<0.001	Yes
T40 MM 96 vs. TR274 MM 24	1.867	16	23.228	<0.001	Yes
T40 MM 96 vs. T26 MM 24	1.867	16	23.228	<0.001	Yes
T40 MM 96 vs. T40 MM 48	1.467	16	18.250	<0.001	Yes
T40 MM 96 vs. TR274 MM 48	1.333	16	16.591	<0.001	Yes
T40 MM 96 vs. T26 MM 48	1.067	16	13.273	<0.001	Yes
T40 MM 96 vs. T25 MM 48	1.067	16	13.273	<0.001	Yes
T40 MM 96 vs. T25 MM 72	0.800	16	9.955	<0.001	Yes
T40 MM 96 vs. T40 MM 72	0.800	16	9.955	<0.001	Yes
T40 MM 96 vs. TR274 MM 72	0.667	16	8.296	<0.001	Yes
TR274 MM 72 vs. T40 MM 24	1.333	16	16.591	<0.001	Yes
TR274 MM 72 vs. T25 MM 24	1.333	16	16.591	<0.001	Yes
TR274 MM 72 vs. TR274 MM 24	1.200	16	14.932	<0.001	Yes
TR274 MM 72 vs. T26 MM 24	1.200	16	14.932	<0.001	Yes
TR274 MM 72 vs. T40 MM 48	0.800	16	9.955	<0.001	Yes
TR274 MM 72 vs. TR274 MM 48	0.667	16	8.296	<0.001	Yes
TR274 MM 72 vs. T26 MM 48	0.400	16	4.977	0.077	No
TR274 MM 72 vs. T25 MM 48	0.400	16	4.977	0.077	Do Not Test
TR274 MM 72 vs. T25 MM 72	0.133	16	1.659	0.998	Do Not Test

TR274 MM 72 vs. T40 MM 72	0.133	16	1.659	0.998	Do Not Test
T40 MM 72 vs. T40 MM 24	1.200	16	14.932	<0.001	Yes
T40 MM 72 vs. T25 MM 24	1.200	16	14.932	<0.001	Yes
T40 MM 72 vs. TR274 MM 24	1.067	16	13.273	<0.001	Yes
T40 MM 72 vs. T26 MM 24	1.067	16	13.273	<0.001	Yes
T40 MM 72 vs. T40 MM 48	0.667	16	8.296	<0.001	Yes
T40 MM 72 vs. TR274 MM 48	0.533	16	6.636	0.004	Yes
T40 MM 72 vs. T26 MM 48	0.267	16	3.318	0.596	Do Not Test
T40 MM 72 vs. T25 MM 48	0.267	16	3.318	0.596	Do Not Test
T40 MM 72 vs. T25 MM 72	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T25 MM 72 vs. T40 MM 24	1.200	16	14.932	<0.001	Yes
T25 MM 72 vs. T25 MM 24	1.200	16	14.932	<0.001	Yes
T25 MM 72 vs. TR274 MM 24	1.067	16	13.273	<0.001	Yes
T25 MM 72 vs. T26 MM 24	1.067	16	13.273	<0.001	Yes
T25 MM 72 vs. T40 MM 48	0.667	16	8.296	<0.001	Yes
T25 MM 72 vs. TR274 MM 48	0.533	16	6.636	0.004	Yes
T25 MM 72 vs. T26 MM 48	0.267	16	3.318	0.596	Do Not Test
T25 MM 72 vs. T25 MM 48	0.267	16	3.318	0.596	Do Not Test
T25 MM 48 vs. T40 MM 24	0.933	16	11.614	<0.001	Yes
T25 MM 48 vs. T25 MM 24	0.933	16	11.614	<0.001	Yes
T25 MM 48 vs. TR274 MM 24	0.800	16	9.955	<0.001	Yes
T25 MM 48 vs. T26 MM 24	0.800	16	9.955	<0.001	Yes
T25 MM 48 vs. T40 MM 48	0.400	16	4.977	0.077	No
T25 MM 48 vs. TR274 MM 48	0.267	16	3.318	0.596	Do Not Test
T25 MM 48 vs. T26 MM 48	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T26 MM 48 vs. T40 MM 24	0.933	16	11.614	<0.001	Yes
T26 MM 48 vs. T25 MM 24	0.933	16	11.614	<0.001	Yes
T26 MM 48 vs. TR274 MM 24	0.800	16	9.955	<0.001	Yes
T26 MM 48 vs. T26 MM 24	0.800	16	9.955	<0.001	Yes
T26 MM 48 vs. T40 MM 48	0.400	16	4.977	0.077	Do Not Test
T26 MM 48 vs. TR274 MM 48	0.267	16	3.318	0.596	Do Not Test
TR274 MM 48 vs. T40 MM 24	0.667	16	8.296	<0.001	Yes
TR274 MM 48 vs. T25 MM 24	0.667	16	8.296	<0.001	Yes
TR274 MM 48 vs. TR274 MM 24	0.533	16	6.636	0.004	Yes
TR274 MM 48 vs. T26 MM 24	0.533	16	6.636	0.004	Yes
TR274 MM 48 vs. T40 MM 48	0.133	16	1.659	0.998	Do Not Test
T40 MM 48 vs. T40 MM 24	0.533	16	6.636	0.004	Yes
T40 MM 48 vs. T25 MM 24	0.533	16	6.636	0.004	Yes
T40 MM 48 vs. TR274 MM 24	0.400	16	4.977	0.077	No
T40 MM 48 vs. T26 MM 24	0.400	16	4.977	0.077	Do Not Test
T26 MM 24 vs. T40 MM 24	0.133	16	1.659	0.998	No
T26 MM 24 vs. T25 MM 24	0.133	16	1.659	0.998	Do Not Test
T26 MM 24 vs. TR274 MM 24	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
TR274 MM 24 vs. T40 MM 24	0.133	16	1.659	0.998	Do Not Test
TR274 MM 24 vs. T25 MM 24	0.133	16	1.659	0.998	Do Not Test
T25 MM 24 vs. T40 MM 24	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test

Um resultado de " Do Not Test " ocorre para uma comparação quando nenhuma diferença significativa é encontrada entre dois meios que incluem essa comparação. Por exemplo, se você tivesse quatro meios classificados em ordem e não encontrasse diferença entre médias 4 e 2, então você não testaria 4 vs. 3 e 3 vs. 2, mas ainda testaria 4 vs. 1 e 3 vs. 1 (4 x 3 e 3 x 2 estão entre 4 x 2: 4 3 2 1). Observe que Do Not Test os meios incluídos é uma regra processual, e um resultado de Não Testar deve ser tratado como se não houvesse diferença significativa entre as médias, mesmo que possa parecer existir.

## Arquivo Suplementar 2

### Crescimento em meio BDA- Análise Estatística

#### Análise de variância One Way

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Tr274 BDA 24	3	0	1.267	0.115	0.0667
Tr274 BDA 48	3	0	6.600	1.088E-015	6.280E-016
Tr274 BDA 72	3	0	8.433	0.0577	0.0333
Tr274 BDA 96	3	0	8.500	0.000	0.000
T25 BDA 24	3	0	0.267	0.115	0.0667
T25 BDA 48	3	0	3.867	0.231	0.133
T25 BDA 72	3	0	7.000	0.000	0.000
T25 BDA 96	3	0	8.500	0.000	0.000
T26 BDA 24	3	0	0.333	0.115	0.0667
T26 BDA 48	3	0	2.867	0.231	0.133
T26 BDA 72	3	0	6.733	0.306	0.176
T26 BDA 96	3	0	8.500	0.000	0.000
T40 BDA 24	3	0	0.000	0.000	0.000
T40 BDA 48	3	0	2.400	0.200	0.115
T40 BDA 72	3	0	4.600	0.200	0.115
T40 BDA 96	3	0	6.733	0.306	0.176

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	15	468.779	31.252	1200.075	<0.001
Residual	32	0.833	0.0260		
Total	47	469.612			

As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado pelo acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = <0.001$ ).

Amplitude do teste executado com alfa = 0.050: 1.000

Todos os procedimentos de comparação múltipla emparelhados (Teste Tukey):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
T26 BDA 96 vs. T40 BDA 24	8.500	16	91.232	<0.001	Yes
T26 BDA 96 vs. T25 BDA 24	8.233	16	88.369	<0.001	Yes
T26 BDA 96 vs. T26 BDA 24	8.167	16	87.654	<0.001	Yes
T26 BDA 96 vs. Tr274 BDA 24	7.233	16	77.636	<0.001	Yes
T26 BDA 96 vs. T40 BDA 48	6.100	16	65.472	<0.001	Yes
T26 BDA 96 vs. T26 BDA 48	5.633	16	60.463	<0.001	Yes
T26 BDA 96 vs. T25 BDA 48	4.633	16	49.730	<0.001	Yes
T26 BDA 96 vs. T40 BDA 72	3.900	16	41.859	<0.001	Yes
T26 BDA 96 vs. Tr274 BDA 48	1.900	16	20.393	<0.001	Yes
T26 BDA 96 vs. T40 BDA 96	1.767	16	18.962	<0.001	Yes
T26 BDA 96 vs. T26 BDA 72	1.767	16	18.962	<0.001	Yes
T26 BDA 96 vs. T25 BDA 72	1.500	16	16.100	<0.001	Yes
T26 BDA 96 vs. Tr274 BDA 72	0.0667	16	0.716	1.000	No
T26 BDA 96 vs. T25 BDA 96	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test

Tr274 BDA 96 vs. T40 BDA 24	8.233	16	88.369	<0.001	Yes
Tr274 BDA 96 vs. T26 BDA 24	8.167	16	87.654	<0.001	Yes
Tr274 BDA 96 vs. Tr274 BDA 24	7.233	16	77.636	<0.001	Yes
Tr274 BDA 96 vs. T40 BDA 48	6.100	16	65.472	<0.001	Yes
Tr274 BDA 96 vs. T26 BDA 48	5.633	16	60.463	<0.001	Yes
Tr274 BDA 96 vs. T25 BDA 48	4.633	16	49.730	<0.001	Yes
Tr274 BDA 96 vs. T40 BDA 72	3.900	16	41.859	<0.001	Yes
Tr274 BDA 96 vs. Tr274 BDA 48	1.900	16	20.393	<0.001	Yes
Tr274 BDA 96 vs. T40 BDA 96	1.767	16	18.962	<0.001	Yes
Tr274 BDA 96 vs. T26 BDA 72	1.767	16	18.962	<0.001	Yes
Tr274 BDA 96 vs. T25 BDA 72	1.500	16	16.100	<0.001	Yes
Tr274 BDA 96 vs. Tr274 BDA 72	0.0667	16	0.716	1.000	Do Not Test
Tr274 BDA 96 vs. T25 BDA 96	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T25 BDA 96 vs. T40 BDA 24	8.500	16	91.232	<0.001	Yes
T25 BDA 96 vs. T25 BDA 24	8.233	16	88.369	<0.001	Yes
T25 BDA 96 vs. T26 BDA 24	8.167	16	87.654	<0.001	Yes
T25 BDA 96 vs. Tr274 BDA 24	7.233	16	77.636	<0.001	Yes
T25 BDA 96 vs. T40 BDA 48	6.100	16	65.472	<0.001	Yes
T25 BDA 96 vs. T26 BDA 48	5.633	16	60.463	<0.001	Yes
T25 BDA 96 vs. T25 BDA 48	4.633	16	49.730	<0.001	Yes
T25 BDA 96 vs. T40 BDA 72	3.900	16	41.859	<0.001	Yes
T25 BDA 96 vs. Tr274 BDA 48	1.900	16	20.393	<0.001	Yes
T25 BDA 96 vs. T40 BDA 96	1.767	16	18.962	<0.001	Yes
T25 BDA 96 vs. T26 BDA 72	1.767	16	18.962	<0.001	Yes
T25 BDA 96 vs. T25 BDA 72	1.500	16	16.100	<0.001	Yes
T25 BDA 96 vs. Tr274 BDA 72	0.0667	16	0.716	1.000	Do Not Test
Tr274 BDA 72 vs. T40 BDA 24	8.433	16	90.516	<0.001	Yes
Tr274 BDA 72 vs. T25 BDA 24	8.167	16	87.654	<0.001	Yes
Tr274 BDA 72 vs. T26 BDA 24	8.100	16	86.938	<0.001	Yes
Tr274 BDA 72 vs. Tr274 BDA 24	7.167	16	76.921	<0.001	Yes
Tr274 BDA 72 vs. T40 BDA 48	6.033	16	64.757	<0.001	Yes
Tr274 BDA 72 vs. T26 BDA 48	5.567	16	59.748	<0.001	Yes
Tr274 BDA 72 vs. T25 BDA 48	4.567	16	49.015	<0.001	Yes
Tr274 BDA 72 vs. T40 BDA 72	3.833	16	41.144	<0.001	Yes
Tr274 BDA 72 vs. Tr274 BDA 48	1.833	16	19.677	<0.001	Yes
Tr274 BDA 72 vs. T40 BDA 96	1.700	16	18.246	<0.001	Yes
Tr274 BDA 72 vs. T26 BDA 72	1.700	16	18.246	<0.001	Yes
Tr274 BDA 72 vs. T25 BDA 72	1.433	16	15.384	<0.001	Yes
T25 BDA 72 vs. T40 BDA 24	7.000	16	75.132	<0.001	Yes
T25 BDA 72 vs. T25 BDA 24	6.733	16	72.270	<0.001	Yes
T25 BDA 72 vs. T26 BDA 24	6.667	16	71.554	<0.001	Yes
T25 BDA 72 vs. Tr274 BDA 24	5.733	16	61.537	<0.001	Yes
T25 BDA 72 vs. T40 BDA 48	4.600	16	49.372	<0.001	Yes
T25 BDA 72 vs. T26 BDA 48	4.133	16	44.364	<0.001	Yes
T25 BDA 72 vs. T25 BDA 48	3.133	16	33.630	<0.001	Yes
T25 BDA 72 vs. T40 BDA 72	2.400	16	25.760	<0.001	Yes
T25 BDA 72 vs. Tr274 BDA 48	0.400	16	4.293	0.210	No
T25 BDA 72 vs. T40 BDA 96	0.267	16	2.862	0.795	Do Not Test
T25 BDA 72 vs. T26 BDA 72	0.267	16	2.862	0.795	Do Not Test
T26 BDA 72 vs. T40 BDA 24	6.733	16	72.270	<0.001	Yes
T26 BDA 72 vs. T25 BDA 24	6.467	16	69.408	<0.001	Yes
T26 BDA 72 vs. T26 BDA 24	6.400	16	68.692	<0.001	Yes
T26 BDA 72 vs. Tr274 BDA 24	5.467	16	58.674	<0.001	Yes
T26 BDA 72 vs. T40 BDA 48	4.333	16	46.510	<0.001	Yes
T26 BDA 72 vs. T26 BDA 48	3.867	16	41.501	<0.001	Yes
T26 BDA 72 vs. T25 BDA 48	2.867	16	30.768	<0.001	Yes
T26 BDA 72 vs. T40 BDA 72	2.133	16	22.897	<0.001	Yes
T26 BDA 72 vs. Tr274 BDA 48	0.133	16	1.431	1.000	Do Not Test

T26 BDA 72 vs. T40 BDA 96	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T40 BDA 96 vs. T40 BDA 24	6.733	16	72.270	<0.001	Yes
T40 BDA 96 vs. T25 BDA 24	6.467	16	69.408	<0.001	Yes
T40 BDA 96 vs. T26 BDA 24	6.400	16	68.692	<0.001	Yes
T40 BDA 96 vs. Tr274 BDA 24	5.467	16	58.674	<0.001	Yes
T40 BDA 96 vs. T40 BDA 48	4.333	16	46.510	<0.001	Yes
T40 BDA 96 vs. T26 BDA 48	3.867	16	41.501	<0.001	Yes
T40 BDA 96 vs. T25 BDA 48	2.867	16	30.768	<0.001	Yes
T40 BDA 96 vs. T40 BDA 72	2.133	16	22.897	<0.001	Yes
T40 BDA 96 vs. Tr274 BDA 48	0.133	16	1.431	1.000	Do Not Test
Tr274 BDA 48 vs. T40 BDA 24	6.600	16	70.839	<0.001	Yes
Tr274 BDA 48 vs. T25 BDA 24	6.333	16	67.976	<0.001	Yes
Tr274 BDA 48 vs. T26 BDA 24	6.267	16	67.261	<0.001	Yes
Tr274 BDA 48 vs. Tr274 BDA 24	5.333	16	57.243	<0.001	Yes
Tr274 BDA 48 vs. T40 BDA 48	4.200	16	45.079	<0.001	Yes
Tr274 BDA 48 vs. T26 BDA 48	3.733	16	40.070	<0.001	Yes
Tr274 BDA 48 vs. T25 BDA 48	2.733	16	29.337	<0.001	Yes
Tr274 BDA 48 vs. T40 BDA 72	2.000	16	21.466	<0.001	Yes
T40 BDA 72 vs. T40 BDA 24	4.600	16	49.372	<0.001	Yes
T40 BDA 72 vs. T25 BDA 24	4.333	16	46.510	<0.001	Yes
T40 BDA 72 vs. T26 BDA 24	4.267	16	45.795	<0.001	Yes
T40 BDA 72 vs. Tr274 BDA 24	3.333	16	35.777	<0.001	Yes
T40 BDA 72 vs. T40 BDA 48	2.200	16	23.613	<0.001	Yes
T40 BDA 72 vs. T26 BDA 48	1.733	16	18.604	<0.001	Yes
T40 BDA 72 vs. T25 BDA 48	0.733	16	7.871	<0.001	Yes
T25 BDA 48 vs. T40 BDA 24	3.867	16	41.501	<0.001	Yes
T25 BDA 48 vs. T25 BDA 24	3.600	16	38.639	<0.001	Yes
T25 BDA 48 vs. T26 BDA 24	3.533	16	37.924	<0.001	Yes
T25 BDA 48 vs. Tr274 BDA 24	2.600	16	27.906	<0.001	Yes
T25 BDA 48 vs. T40 BDA 48	1.467	16	15.742	<0.001	Yes
T25 BDA 48 vs. T26 BDA 48	1.000	16	10.733	<0.001	Yes
T26 BDA 48 vs. T40 BDA 24	2.867	16	30.768	<0.001	Yes
T26 BDA 48 vs. T25 BDA 24	2.600	16	27.906	<0.001	Yes
T26 BDA 48 vs. T26 BDA 24	2.533	16	27.191	<0.001	Yes
T26 BDA 48 vs. Tr274 BDA 24	1.600	16	17.173	<0.001	Yes
T26 BDA 48 vs. T40 BDA 48	0.467	16	5.009	0.073	No
T40 BDA 48 vs. T40 BDA 24	2.400	16	25.760	<0.001	Yes
T40 BDA 48 vs. T25 BDA 24	2.133	16	22.897	<0.001	Yes
T40 BDA 48 vs. T26 BDA 24	2.067	16	22.182	<0.001	Yes
T40 BDA 48 vs. Tr274 BDA 24	1.133	16	12.164	<0.001	Yes
Tr274 BDA 24 vs. T40 BDA 24	1.267	16	13.595	<0.001	Yes
Tr274 BDA 24 vs. T25 BDA 24	1.000	16	10.733	<0.001	Yes
Tr274 BDA 24 vs. T26 BDA 24	0.933	16	10.018	<0.001	Yes
T26 BDA 24 vs. T40 BDA 24	0.333	16	3.578	0.476	No
T26 BDA 24 vs. T25 BDA 24	0.0667	16	0.716	1.000	Do Not Test
T25 BDA 24 vs. T40 BDA 24	0.267	16	2.862	0.795	Do Not Test

Um resultado de " Do Not Test " ocorre para uma comparação quando nenhuma diferença significativa é encontrada entre dois meios que incluem essa comparação. Por exemplo, se você tivesse quatro meios classificados em ordem e não encontrasse diferença entre médias 4 e 2, então você não testaria 4 vs. 3 e 3 vs. 2, mas ainda testaria 4 vs. 1 e 3 vs. 1 (4 x 3 e 3 x 2 estão entre 4 x 2: 4 3 2 1). Observe que Do Not Test os meios incluídos é uma regra processual, e um resultado de Não Testar deve ser tratado como se não houvesse diferença significativa entre as médias, mesmo que possa parecer existir.

## Arquivo Suplementar 3

### Atividade de $\beta$ 1,3-Glucanase - Análise Estatística

#### Análise de variância One Way

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Tr274 24Hrs	3	0	0.642	0.0106	0.00611
Tr274 48Hrs	3	0	0.493	0.0345	0.0199
Tr274 72Hrs	3	0	0.538	0.0205	0.0118
Tr274 96Hrs	3	0	0.461	0.0111	0.00642
T25 24Hrs	3	0	0.593	0.00545	0.00314
T25 48Hrs	3	0	0.492	0.0111	0.00640
T25 72Hrs	3	0	0.181	0.00181	0.00104
T25 96Hrs	3	0	0.723	0.0925	0.0534
T26 24Hrs	3	0	0.583	0.0242	0.0139
T26 48Hrs	3	0	0.582	0.0474	0.0273
T26 72Hrs	3	0	0.523	0.0400	0.0231
T26 96Hrs	3	0	0.546	0.0389	0.0225
T40 24Hrs	3	0	0.507	0.00702	0.00406
T40 48Hrs	3	0	0.600	0.0133	0.00769
T40 72Hrs	3	0	0.540	0.0152	0.00878
T40 96HRS	3	0	0.384	0.0568	0.0328

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	15	0.645	0.0430	34.084	<0.001
Residual	32	0.0403	0.00126		
Total	47	0.685			

As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado pelo acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = <0.001$ ).

Amplitude do teste executado com alfa = 0.050: 1.000

Todos os procedimentos de comparação múltipla emparelhados (Teste Tukey):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
T25 96Hrs vs. T25 72Hrs	0.541	16	26.405	<0.001	Yes
T25 96Hrs vs. T40 96HRS	0.339	16	16.518	<0.001	Yes
T25 96Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.261	16	12.754	<0.001	Yes
T25 96Hrs vs. T25 48Hrs	0.231	16	11.270	<0.001	Yes
T25 96Hrs vs. Tr274 48Hrs	0.229	16	11.178	<0.001	Yes
T25 96Hrs vs. T40 24Hrs	0.216	16	10.537	<0.001	Yes
T25 96Hrs vs. T26 72Hrs	0.199	16	9.719	<0.001	Yes
T25 96Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.184	16	8.987	<0.001	Yes
T25 96Hrs vs. T40 72Hrs	0.183	16	8.908	<0.001	Yes
T25 96Hrs vs. T26 96Hrs	0.176	16	8.592	<0.001	Yes
T25 96Hrs vs. T26 48Hrs	0.141	16	6.862	0.003	Yes
T25 96Hrs vs. T26 24Hrs	0.140	16	6.824	0.003	Yes
T25 96Hrs vs. T25 24Hrs	0.130	16	6.345	0.007	Yes
T25 96Hrs vs. T40 48Hrs	0.122	16	5.964	0.014	Yes
T25 96Hrs vs. Tr274 24Hrs	0.0810	16	3.951	0.321	No
Tr274 24Hrs vs. T25 72Hrs	0.460	16	22.454	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. T40 96HRS	0.258	16	12.567	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.180	16	8.803	<0.001	Yes

Tr274 24Hrs vs. T25 48Hrs	0.150	16	7.319	0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. Tr274 48Hrs	0.148	16	7.227	0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. T40 24Hrs	0.135	16	6.585	0.005	Yes
Tr274 24Hrs vs. T26 72Hrs	0.118	16	5.768	0.020	Yes
Tr274 24Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.103	16	5.036	0.070	No
Tr274 24Hrs vs. T40 72Hrs	0.102	16	4.957	0.080	Do Not Test
Tr274 24Hrs vs. T26 96Hrs	0.0951	16	4.640	0.129	Do Not Test
Tr274 24Hrs vs. T26 48Hrs	0.0597	16	2.911	0.776	Do Not Test
Tr274 24Hrs vs. T26 24Hrs	0.0589	16	2.873	0.791	Do Not Test
Tr274 24Hrs vs. T25 24Hrs	0.0491	16	2.394	0.934	Do Not Test
Tr274 24Hrs vs. T40 48Hrs	0.0413	16	2.012	0.984	Do Not Test
T40 48Hrs vs. T25 72Hrs	0.419	16	20.442	<0.001	Yes
T40 48Hrs vs. T40 96HRS	0.216	16	10.554	<0.001	Yes
T40 48Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.139	16	6.791	0.003	Yes
T40 48Hrs vs. T25 48Hrs	0.109	16	5.307	0.045	Yes
T40 48Hrs vs. Tr274 48Hrs	0.107	16	5.215	0.053	No
T40 48Hrs vs. T40 24Hrs	0.0937	16	4.573	0.143	Do Not Test
T40 48Hrs vs. T26 72Hrs	0.0770	16	3.755	0.399	Do Not Test
T40 48Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.0620	16	3.023	0.730	Do Not Test
T40 48Hrs vs. T40 72Hrs	0.0604	16	2.945	0.763	Do Not Test
T40 48Hrs vs. T26 96Hrs	0.0539	16	2.628	0.876	Do Not Test
T40 48Hrs vs. T26 48Hrs	0.0184	16	0.899	1.000	Do Not Test
T40 48Hrs vs. T26 24Hrs	0.0176	16	0.860	1.000	Do Not Test
T40 48Hrs vs. T25 24Hrs	0.00782	16	0.382	1.000	Do Not Test
T25 24Hrs vs. T25 72Hrs	0.411	16	20.060	<0.001	Yes
T25 24Hrs vs. T40 96HRS	0.209	16	10.173	<0.001	Yes
T25 24Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.131	16	6.409	0.006	Yes
T25 24Hrs vs. T25 48Hrs	0.101	16	4.925	0.084	No
T25 24Hrs vs. Tr274 48Hrs	0.0991	16	4.833	0.097	Do Not Test
T25 24Hrs vs. T40 24Hrs	0.0859	16	4.191	0.240	Do Not Test
T25 24Hrs vs. T26 72Hrs	0.0692	16	3.374	0.570	Do Not Test
T25 24Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.0542	16	2.642	0.872	Do Not Test
T25 24Hrs vs. T40 72Hrs	0.0525	16	2.563	0.894	Do Not Test
T25 24Hrs vs. T26 96Hrs	0.0461	16	2.246	0.959	Do Not Test
T25 24Hrs vs. T26 48Hrs	0.0106	16	0.517	1.000	Do Not Test
T25 24Hrs vs. T26 24Hrs	0.00981	16	0.479	1.000	Do Not Test
T26 24Hrs vs. T25 72Hrs	0.401	16	19.582	<0.001	Yes
T26 24Hrs vs. T40 96HRS	0.199	16	9.694	<0.001	Yes
T26 24Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.122	16	5.930	0.015	Yes
T26 24Hrs vs. T25 48Hrs	0.0912	16	4.447	0.170	Do Not Test
T26 24Hrs vs. Tr274 48Hrs	0.0893	16	4.355	0.193	Do Not Test
T26 24Hrs vs. T40 24Hrs	0.0761	16	3.713	0.417	Do Not Test
T26 24Hrs vs. T26 72Hrs	0.0594	16	2.895	0.782	Do Not Test
T26 24Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.0443	16	2.163	0.970	Do Not Test
T26 24Hrs vs. T40 72Hrs	0.0427	16	2.085	0.978	Do Not Test
T26 24Hrs vs. T26 96Hrs	0.0362	16	1.768	0.995	Do Not Test
T26 24Hrs vs. T26 48Hrs	0.000789	16	0.0385	1.000	Do Not Test
T26 48Hrs vs. T25 72Hrs	0.401	16	19.543	<0.001	Yes
T26 48Hrs vs. T40 96HRS	0.198	16	9.656	<0.001	Yes
T26 48Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.121	16	5.892	0.016	Yes
T26 48Hrs vs. T25 48Hrs	0.0904	16	4.408	0.180	Do Not Test
T26 48Hrs vs. Tr274 48Hrs	0.0885	16	4.316	0.204	Do Not Test
T26 48Hrs vs. T40 24Hrs	0.0753	16	3.674	0.433	Do Not Test
T26 48Hrs vs. T26 72Hrs	0.0586	16	2.857	0.797	Do Not Test
T26 48Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.0436	16	2.125	0.974	Do Not Test
T26 48Hrs vs. T40 72Hrs	0.0419	16	2.046	0.981	Do Not Test



T26 48Hrs vs. T26 96Hrs	0.0355	16	1.729	0.996	Do Not Test
T26 96Hrs vs. T25 72Hrs	0.365	16	17.814	<0.001	Yes
T26 96Hrs vs. T40 96HRS	0.162	16	7.926	<0.001	Yes
T26 96Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.0853	16	4.163	0.249	No
T26 96Hrs vs. T25 48Hrs	0.0549	16	2.679	0.860	Do Not Test
T26 96Hrs vs. Tr274 48Hrs	0.0530	16	2.587	0.888	Do Not Test
T26 96Hrs vs. T40 24Hrs	0.0399	16	1.945	0.988	Do Not Test
T26 96Hrs vs. T26 72Hrs	0.0231	16	1.127	1.000	Do Not Test
T26 96Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.00810	16	0.395	1.000	Do Not Test
T26 96Hrs vs. T40 72Hrs	0.00649	16	0.317	1.000	Do Not Test
T40 72Hrs vs. T25 72Hrs	0.359	16	17.497	<0.001	Yes
T40 72Hrs vs. T40 96HRS	0.156	16	7.609	<0.001	Yes
T40 72Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.0788	16	3.846	0.362	Do Not Test
T40 72Hrs vs. T25 48Hrs	0.0484	16	2.362	0.940	Do Not Test
T40 72Hrs vs. Tr274 48Hrs	0.0465	16	2.270	0.956	Do Not Test
T40 72Hrs vs. T40 24Hrs	0.0334	16	1.628	0.998	Do Not Test
T40 72Hrs vs. T26 72Hrs	0.0166	16	0.811	1.000	Do Not Test
T40 72Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.00161	16	0.0784	1.000	Do Not Test
Tr274 72Hrs vs. T25 72Hrs	0.357	16	17.418	<0.001	Yes
Tr274 72Hrs vs. T40 96HRS	0.154	16	7.531	<0.001	Yes
Tr274 72Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.0772	16	3.767	0.394	Do Not Test
Tr274 72Hrs vs. T25 48Hrs	0.0468	16	2.284	0.954	Do Not Test
Tr274 72Hrs vs. Tr274 48Hrs	0.0449	16	2.192	0.967	Do Not Test
Tr274 72Hrs vs. T40 24Hrs	0.0318	16	1.550	0.999	Do Not Test
Tr274 72Hrs vs. T26 72Hrs	0.0150	16	0.732	1.000	Do Not Test
T26 72Hrs vs. T25 72Hrs	0.342	16	16.686	<0.001	Yes
T26 72Hrs vs. T40 96HRS	0.139	16	6.799	0.003	Yes
T26 72Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.0622	16	3.035	0.724	Do Not Test
T26 72Hrs vs. T25 48Hrs	0.0318	16	1.551	0.999	Do Not Test
T26 72Hrs vs. Tr274 48Hrs	0.0299	16	1.460	0.999	Do Not Test
T26 72Hrs vs. T40 24Hrs	0.0168	16	0.818	1.000	Do Not Test
T40 24Hrs vs. T25 72Hrs	0.325	16	15.869	<0.001	Yes
T40 24Hrs vs. T40 96HRS	0.123	16	5.981	0.014	Yes
T40 24Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.0455	16	2.218	0.963	Do Not Test
T40 24Hrs vs. T25 48Hrs	0.0150	16	0.734	1.000	Do Not Test
T40 24Hrs vs. Tr274 48Hrs	0.0132	16	0.642	1.000	Do Not Test
Tr274 48Hrs vs. T25 72Hrs	0.312	16	15.227	<0.001	Yes
Tr274 48Hrs vs. T40 96HRS	0.109	16	5.339	0.043	Yes
Tr274 48Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.0323	16	1.576	0.999	Do Not Test
Tr274 48Hrs vs. T25 48Hrs	0.00188	16	0.0919	1.000	Do Not Test
T25 48Hrs vs. T25 72Hrs	0.310	16	15.135	<0.001	Yes
T25 48Hrs vs. T40 96HRS	0.108	16	5.247	0.050	Yes
T25 48Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.0304	16	1.484	0.999	Do Not Test
Tr274 96Hrs vs. T25 72Hrs	0.280	16	13.651	<0.001	Yes
Tr274 96Hrs vs. T40 96HRS	0.0772	16	3.764	0.395	No
T40 96HRS vs. T25 72Hrs	0.203	16	9.888	<0.001	Yes

Um resultado de " Do Not Test " ocorre para uma comparação quando nenhuma diferença significativa é encontrada entre dois meios que incluem essa comparação. Por exemplo, se você tivesse quatro meios classificados em ordem e não encontrasse diferença entre médias 4 e 2, então você não testaria 4 vs. 3 e 3 vs. 2, mas ainda testaria 4 vs. 1 e 3 vs. 1 (4 x 3 e 3 x 2 estão entre 4 x 2: 4 3 2 1). Observe que Do Not Test os meios incluídos é uma regra processual, e um resultado de Não Testar deve ser tratado como se não houvesse diferença significativa entre as médias, mesmo que possa parecer existir.

## Arquivo Suplementar 4

### Atividade de protease- Análise Estatística

#### Análise de variância One Way

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Tr274 24Hrs	3	0	0.0139	0.000265	0.000153
Tr274 24Hrs	3	0	0.0283	0.00198	0.00114
Tr274 72Hrs	3	0	0.000	0.00326	0.00188
Tr274 96Hrs	3	0	0.000	0.0000707	0.0000408
T25 24Hrs	3	0	0.0322	0.00912	0.00527
T25 48Hrs	3	0	0.0108	0.00531	0.00307
T25 72Hrs	3	0	0.000600	0.00205	0.00118
T25 96Hrs	3	0	0.000	0.000283	0.000163
T26 24Hrs	3	0	0.000	0.000849	0.000490
T26 48Hrs	3	0	0.000	0.00249	0.00144
T26 72Hrs	3	0	0.000	0.00206	0.00119
T26 96Hrs	3	0	0.0258	0.000636	0.000367
T40 24Hrs	3	0	0.000	0.00375	0.00216
T40 48Hrs	3	0	0.000	0.00231	0.00133
T40 72Hrs	3	0	0.000	0.00141	0.000816
T40 96Hrs	3	0	0.0472	0.000919	0.000531

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	15	0.0104	0.000693	67.560	<0.001
Residual	32	0.000328	0.0000103		
Total	47	0.0107			

As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado pelo acaso; existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = <0.001$ ).

Amplitude do teste executado com alfa = 0.050: 1.000

Todos os procedimentos de comparação múltipla emparelhados (Teste Tukey):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
T40 96Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.0472	16	25.512	<0.001	Yes
T40 96Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.0472	16	25.512	<0.001	Yes
T40 96Hrs vs. T26 48Hrs	0.0472	16	25.512	<0.001	Yes
T40 96Hrs vs. T26 72Hrs	0.0472	16	25.512	<0.001	Yes
T40 96Hrs vs. T25 96Hrs	0.0472	16	25.512	<0.001	Yes
T40 96Hrs vs. T40 24Hrs	0.0472	16	25.512	<0.001	Yes
T40 96Hrs vs. T40 72Hrs	0.0472	16	25.512	<0.001	Yes
T40 96Hrs vs. T26 24Hrs	0.0472	16	25.512	<0.001	Yes
T40 96Hrs vs. T40 48Hrs	0.0472	16	25.512	<0.001	Yes
T40 96Hrs vs. T25 72Hrs	0.0466	16	25.187	<0.001	Yes
T40 96Hrs vs. T25 48Hrs	0.0364	16	19.670	<0.001	Yes
T40 96Hrs vs. Tr274 24Hrs	0.0333	16	18.012	<0.001	Yes
T40 96Hrs vs. T26 96Hrs	0.0213	16	11.539	<0.001	Yes
T40 96Hrs vs. Tr274 24Hrs	0.0189	16	10.223	<0.001	Yes
T40 96Hrs vs. T25 24Hrs	0.0149	16	8.077	<0.001	Yes
T25 24Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.0322	16	17.435	<0.001	Yes
T25 24Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.0322	16	17.435	<0.001	Yes

T25 24Hrs vs. T26 48Hrs	0.0322	16	17.435	<0.001	Yes
T25 24Hrs vs. T26 72Hrs	0.0322	16	17.435	<0.001	Yes
T25 24Hrs vs. T25 96Hrs	0.0322	16	17.435	<0.001	Yes
T25 24Hrs vs. T40 24Hrs	0.0322	16	17.435	<0.001	Yes
T25 24Hrs vs. T40 72Hrs	0.0322	16	17.435	<0.001	Yes
T25 24Hrs vs. T26 24Hrs	0.0322	16	17.435	<0.001	Yes
T25 24Hrs vs. T40 48Hrs	0.0322	16	17.435	<0.001	Yes
T25 24Hrs vs. T25 72Hrs	0.0316	16	17.110	<0.001	Yes
T25 24Hrs vs. T25 48Hrs	0.0214	16	11.593	<0.001	Yes
T25 24Hrs vs. Tr274 24Hrs	0.0184	16	9.934	<0.001	Yes
T25 24Hrs vs. T26 96Hrs	0.00640	16	3.462	0.529	No
T25 24Hrs vs. Tr274 24Hrs	0.00397	16	2.146	0.972	Do Not Test
Tr274 24Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.0283	16	15.289	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.0283	16	15.289	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. T26 48Hrs	0.0283	16	15.289	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. T26 72Hrs	0.0283	16	15.289	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. T25 96Hrs	0.0283	16	15.289	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. T40 24Hrs	0.0283	16	15.289	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. T40 72Hrs	0.0283	16	15.289	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. T26 24Hrs	0.0283	16	15.289	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. T40 48Hrs	0.0283	16	15.289	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. T25 72Hrs	0.0277	16	14.965	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. T25 48Hrs	0.0175	16	9.448	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. Tr274 24Hrs	0.0144	16	7.789	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. T26 96Hrs	0.00243	16	1.316	1.000	Do Not Test
T26 96Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.0258	16	13.973	<0.001	Yes
T26 96Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.0258	16	13.973	<0.001	Yes
T26 96Hrs vs. T26 48Hrs	0.0258	16	13.973	<0.001	Yes
T26 96Hrs vs. T26 72Hrs	0.0258	16	13.973	<0.001	Yes
T26 96Hrs vs. T25 96Hrs	0.0258	16	13.973	<0.001	Yes
T26 96Hrs vs. T40 24Hrs	0.0258	16	13.973	<0.001	Yes
T26 96Hrs vs. T40 72Hrs	0.0258	16	13.973	<0.001	Yes
T26 96Hrs vs. T26 24Hrs	0.0258	16	13.973	<0.001	Yes
T26 96Hrs vs. T40 48Hrs	0.0258	16	13.973	<0.001	Yes
T26 96Hrs vs. T25 72Hrs	0.0252	16	13.648	<0.001	Yes
T26 96Hrs vs. T25 48Hrs	0.0150	16	8.131	<0.001	Yes
T26 96Hrs vs. Tr274 24Hrs	0.0120	16	6.473	0.006	Yes
Tr274 24Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.0139	16	7.500	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.0139	16	7.500	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. T26 48Hrs	0.0139	16	7.500	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. T26 72Hrs	0.0139	16	7.500	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. T25 96Hrs	0.0139	16	7.500	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. T40 24Hrs	0.0139	16	7.500	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. T40 72Hrs	0.0139	16	7.500	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. T26 24Hrs	0.0139	16	7.500	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. T40 48Hrs	0.0139	16	7.500	<0.001	Yes
Tr274 24Hrs vs. T25 72Hrs	0.0133	16	7.176	0.002	Yes
Tr274 24Hrs vs. T25 48Hrs	0.00307	16	1.659	0.998	No
T25 48Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.0108	16	5.842	0.018	Yes
T25 48Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.0108	16	5.842	0.018	Yes
T25 48Hrs vs. T26 48Hrs	0.0108	16	5.842	0.018	Yes
T25 48Hrs vs. T26 72Hrs	0.0108	16	5.842	0.018	Yes
T25 48Hrs vs. T25 96Hrs	0.0108	16	5.842	0.018	Yes
T25 48Hrs vs. T40 24Hrs	0.0108	16	5.842	0.018	Yes
T25 48Hrs vs. T40 72Hrs	0.0108	16	5.842	0.018	Yes
T25 48Hrs vs. T26 24Hrs	0.0108	16	5.842	0.018	Yes
T25 48Hrs vs. T40 48Hrs	0.0108	16	5.842	0.018	Yes

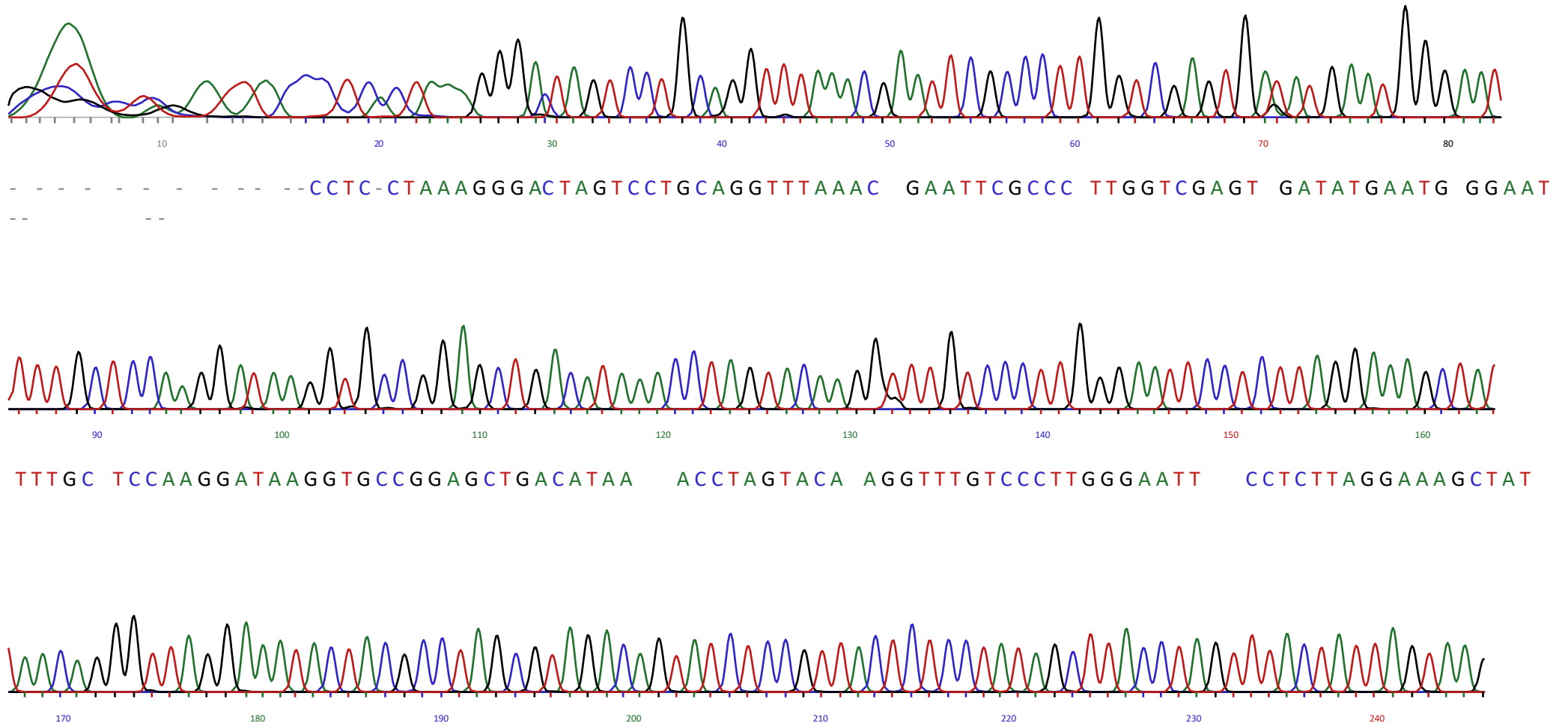
T25 48Hrs vs. T25 72Hrs	0.0102	16	5.517	0.032	Yes
T25 72Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.000600	16	0.325	1.000	No
T25 72Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.000600	16	0.325	1.000	Do Not Test
T25 72Hrs vs. T26 48Hrs	0.000600	16	0.325	1.000	Do Not Test
T25 72Hrs vs. T26 72Hrs	0.000600	16	0.325	1.000	Do Not Test
T25 72Hrs vs. T25 96Hrs	0.000600	16	0.325	1.000	Do Not Test
T25 72Hrs vs. T40 24Hrs	0.000600	16	0.325	1.000	Do Not Test
T25 72Hrs vs. T40 72Hrs	0.000600	16	0.325	1.000	Do Not Test
T25 72Hrs vs. T26 24Hrs	0.000600	16	0.325	1.000	Do Not Test
T25 72Hrs vs. T40 48Hrs	0.000600	16	0.325	1.000	Do Not Test
T40 48Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T40 48Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T40 48Hrs vs. T26 48Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T40 48Hrs vs. T26 72Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T40 48Hrs vs. T25 96Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T40 48Hrs vs. T40 24Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T40 48Hrs vs. T40 72Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T40 48Hrs vs. T26 24Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T26 24Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T26 24Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T26 24Hrs vs. T26 48Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T26 24Hrs vs. T26 72Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T26 24Hrs vs. T25 96Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T26 24Hrs vs. T40 24Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T26 24Hrs vs. T40 72Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T40 72Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T40 72Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T40 72Hrs vs. T26 48Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T40 72Hrs vs. T26 72Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T40 72Hrs vs. T25 96Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T40 72Hrs vs. T40 24Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T40 24Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T40 24Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T40 24Hrs vs. T26 48Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T40 24Hrs vs. T26 72Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T40 24Hrs vs. T25 96Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T25 96Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T25 96Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T25 96Hrs vs. T26 48Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T25 96Hrs vs. T26 72Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T26 72Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T26 72Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T26 72Hrs vs. T26 48Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T26 48Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
T26 48Hrs vs. Tr274 96Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test
Tr274 96Hrs vs. Tr274 72Hrs	0.000	16	0.000	1.000	Do Not Test

Um resultado de " Do Not Test " ocorre para uma comparação quando nenhuma diferença significativa é encontrada entre dois meios que incluam essa comparação. Por exemplo, se você tivesse quatro meios classificados em ordem e não encontrasse diferença entre médias 4 e 2, então você não testaria 4 vs. 3 e 3 vs. 2, mas ainda testaria 4 vs. 1 e 3 vs. 1 (4 x 3 e 3 x 2 estão entre 4 x 2: 4 3 2 1). Observe que Do Not Test os meios incluídos é uma regra processual, e um resultado de Não Testar deve ser tratado como se não houvesse diferença significativa entre as médias, mesmo que possa parecer existir.

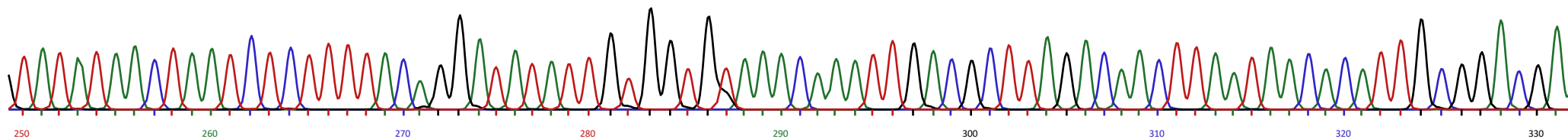


# ARQUIVO SUPLEMENTAR 5

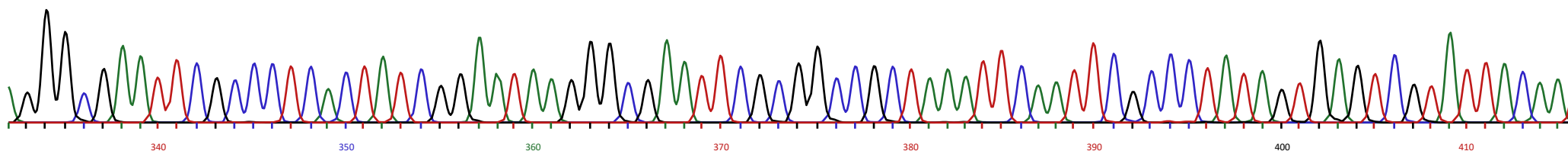
## MUTANTE T25 PRIMERS AD3 E AD3 LIU



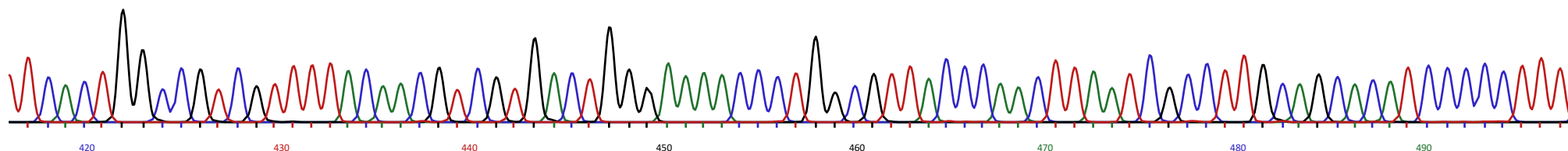
AACAGGGTTAGGAAATACTACGC CTAGCGTAGACAGTATCTCCGTTACTCTCC TATAGCTTACCTAGTTTACT ATTAGTAAG



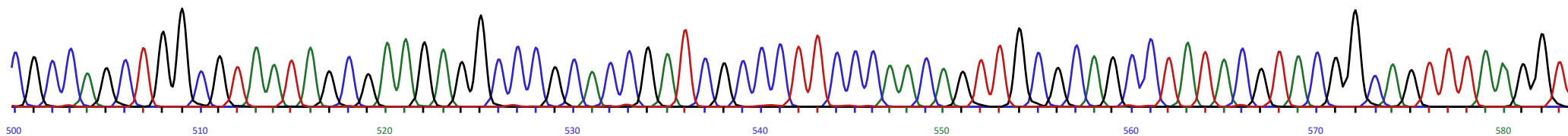
TATATAACTAA TCTCTTTTACAGGATATATT GTGGTGTAACAAATTGACGCTTAGACAAC TTAATAACACATTGCGGACGA



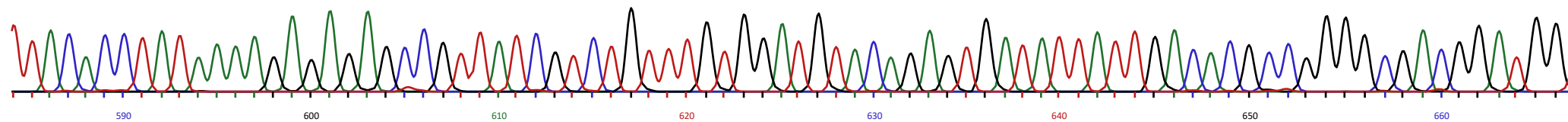
AGGGCGAA TCGCCCTCACTATCGGAATA AGGGCGAATT CGCGGCCGCT AAATTCAATT CGCCCTATAGTGAGTCGTAT TACAAT  
T



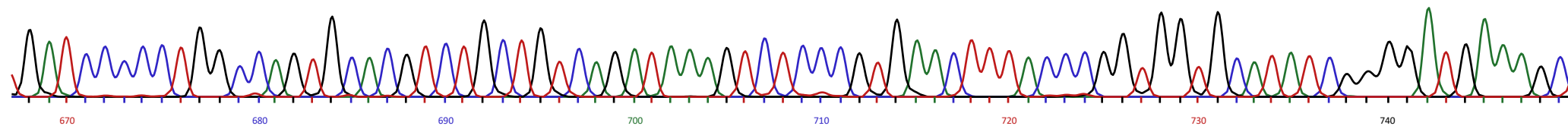
TCACTGGCCGTCGT TTTACAACGT CGTGACTGGG AAAACCCTGGCGTTACCCAA CTTAATCGCC TTGCAGCACATCCCCCTTT



CGCCAGCTGGCGTAATAGCGA AGAGGCCCGC ACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTATACGTACGGCAGTTTAAGGT

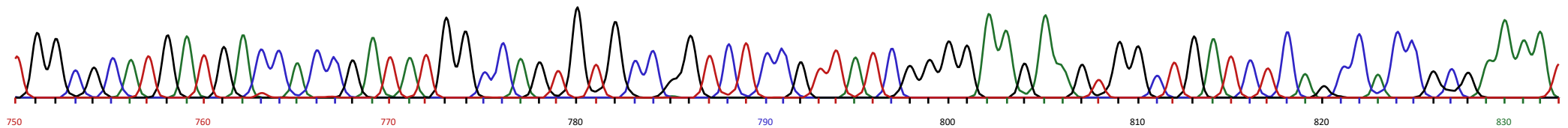


TTACACC TATAAAGAGAGAGCCGTTATCGTCTGTTT GTGGATGTACAGAGTGATAT TATTGACACGCCGGGGCGACGGATGGT

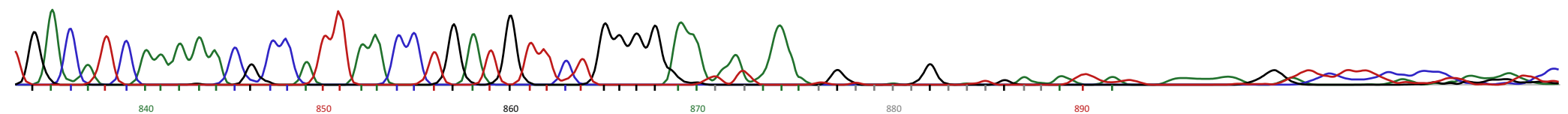


GA CCCCCTGGCCAGTGACAGTCTGCTGTCAGATAAAGTCTCC CGTGAACTTT ACCCGGTGGT GCATATCGGGGATGAAAGC  
T





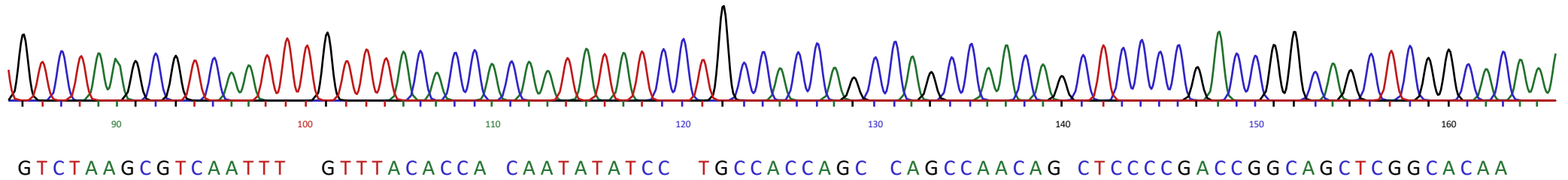
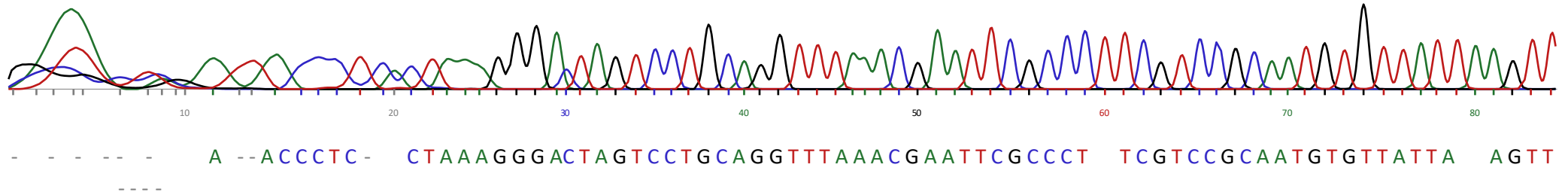
TGGCGCATGAT GACCACCGAT ATGGCCAGTG TGCCGGTCTCCGTTATCGGGGAAGAAAGTGGCTGATCTCAGCCACCGCGAA AAT

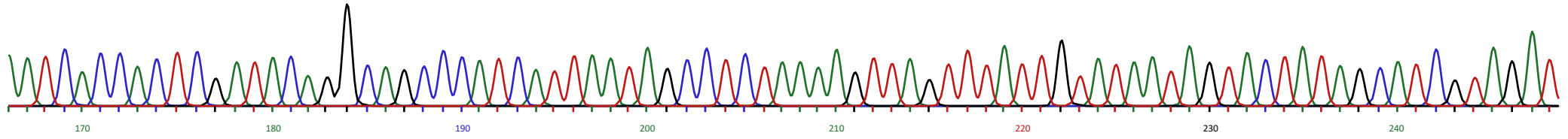


GACATCAAAAACGCCATTAACCTGATG TTCTGGGGAA - -AAA-G--- - G - - - G - - A TA

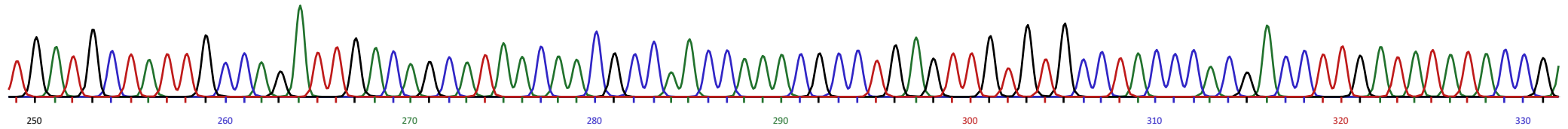
# ARQUIVO SUPLEMENTAR 6

## MUTANTE T26 PRIMERS AD5 E AD5 PAR

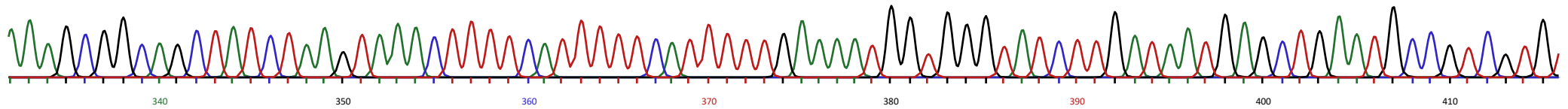




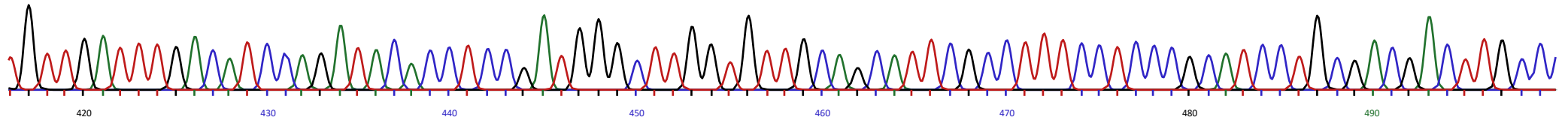
AATCA CCACTCGATA CAGGCAGCCCATCATTAATA GCCTCTAAAAGTTAGTTTAT TGTATAATAG TACTATAGCA TCGTAGAT



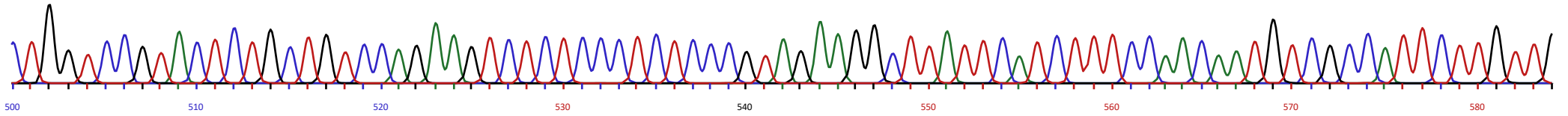
TGATGCTATTGCCAGATTGACAGCATAAACAACGCCAACCAA CGCCTGAGTT GTGTGCCTACCCACGACCTT GATATATACCG



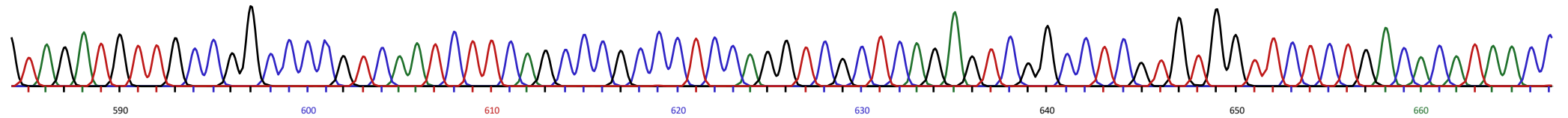
AAAGCGGCAGCTATCTAAG TAAACTTTTCATTTTTCATT TTTGAAAATG GTGGGTATCT TGATAATGAG CTGAATGCCGTCGTG



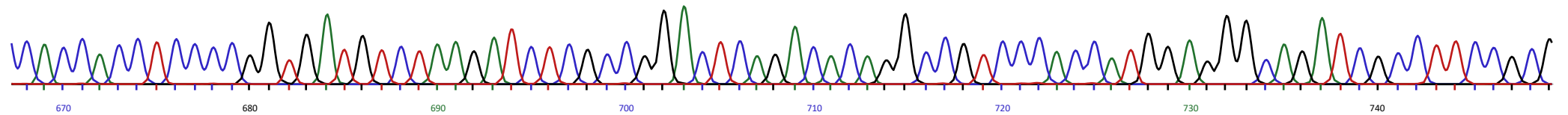
TGTTG ATTTGACATCCAGATACACC TCCGATGGGC TTGGTGTTCAGCATTGCGC TTCCTCCCG CATCCTGCGA CGACTTGCC



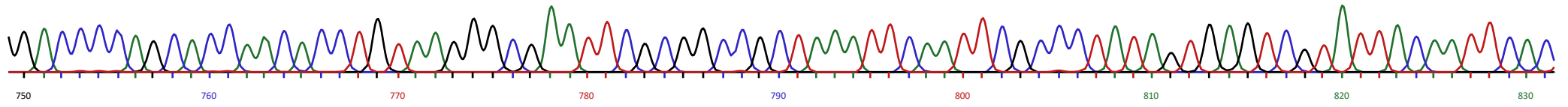
CTGGTCCGTAC TCTGCTGTCCAGAAGTCTCT CCCTCTCCCG TAGAAGGCTTATTCATCTTT CCAACAATGT CGCCATTCTT GTTG



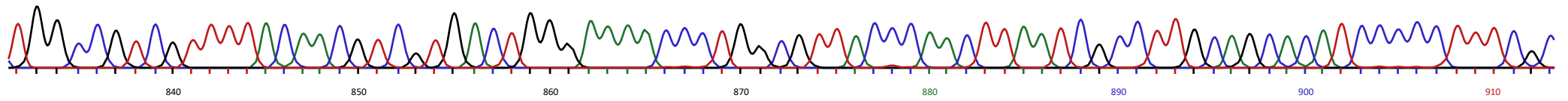
TAGAT TTGCCGGCCCCGTCAATCTT CAGCCCGCCC TCCAGGTCGC TCAGAGTCGG CCTCGTGTGG TTCTCTGACA CATAACC  
G



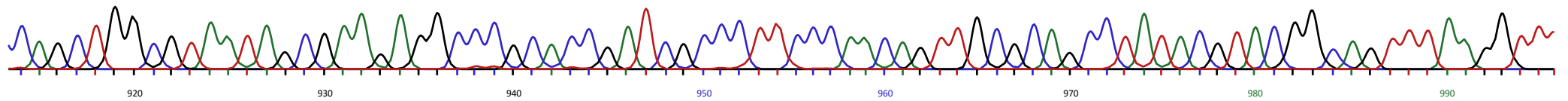
CA CACCTCCCCG GTGATGTCTA AGATCTCGCCGGA CT CAGACACAGGCCGTCCACCATGGAGGGCAGATCG CCTTCCGCG  
C



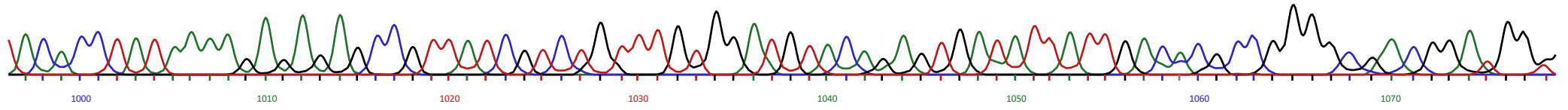
GACCCAGCACCAACACCTGTAAGGGCGAAT TCGCGGCCGC TAAATTCAAT TCGCCCTATAGTGAGTCGTA TTACAATTAC



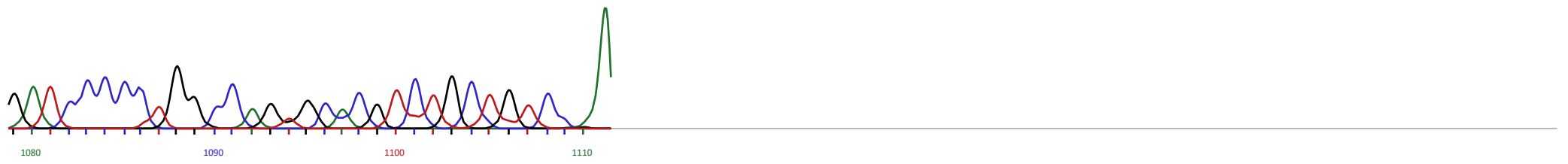
TGGCCGTCG TTTTACAACG TCGTGACTGGGAAAACCCCTG GCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTG CAGCACATCCCCCTTT CGC



CAGCTGG CGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAAC AGTTGCGCAGCCTATACGTA CGGCAGTTTA AGGTTT

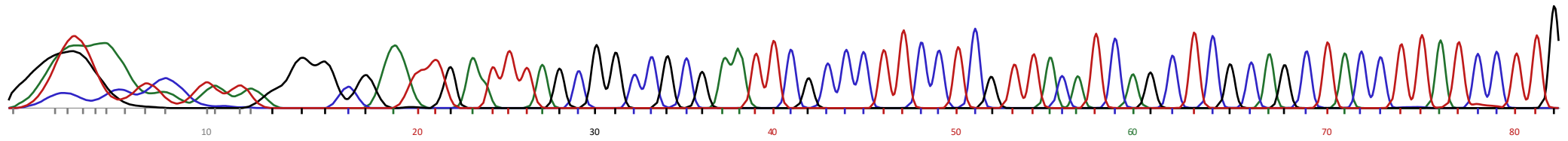


A C A C C T A T A A A A G A G A G A G C C G T T A T C G T C T G T T T G T G G A T G T A C A G A G T G A T A T T A T T G A C - C G C C G G G G C G A C G G A T G G T

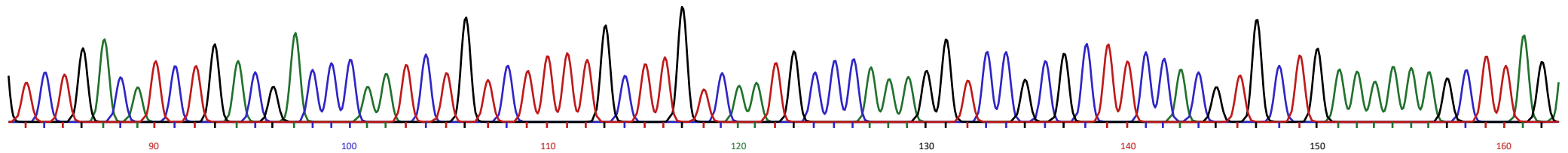


# ARQUIVO SUPLEMENTAR 7

## MUTANTE T40 PRIMERS AD3 E AD2 TSU

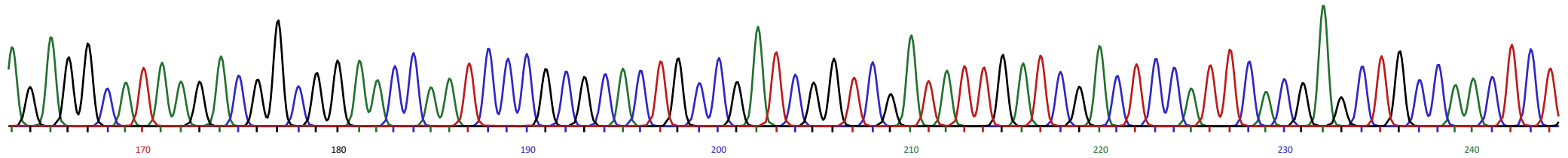


---GGGCGATTGATTTAGCGGCCGCGAATTCGCCCTTCTCGTTACATCAGCTCGCAGCTACCTTATCCTTG

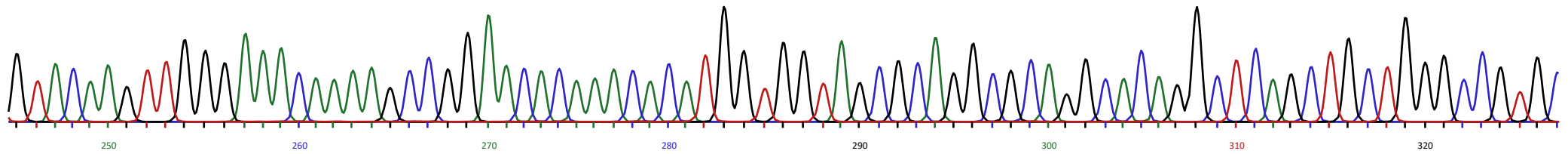


TCTGACATCTGACGACCCAATCTGTCTTTTGCTTGTCAATGCCAAAGGTCCGCGCTTCCACGTGCTGAAAAAAGCTTAG

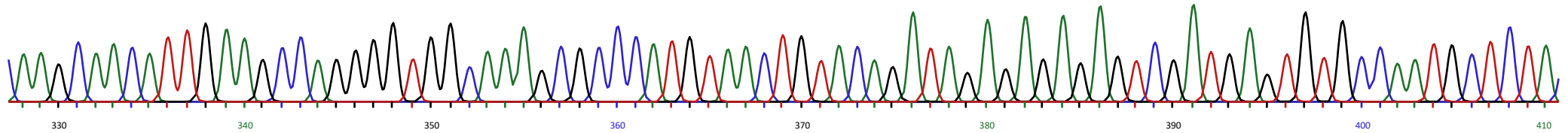




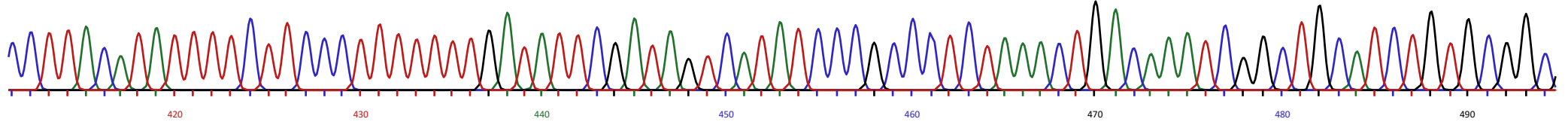
AGAGGCAT AAGACGGCGG AACCAATCCCGCGCACTGCCGATCGGT CGA TATTGATCGACTCCATT CACGAGCTGCCAA CTCT



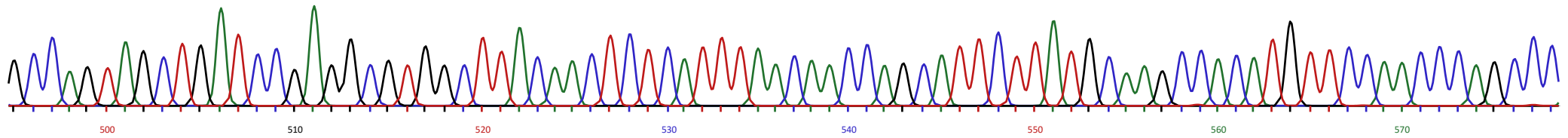
GTACAAGTTGGGAAACAAAAGCCGGA ACACAAACACATGGTGGTAG CGCAGGCGCAGGCACAGGCT CAGCTGCTGGGCCGTGC



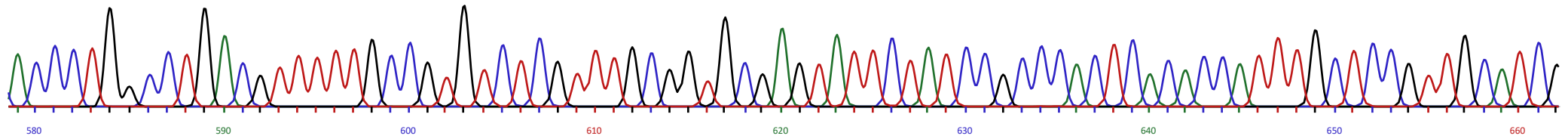
AAGCAACATTGAAGCCAGGGGTG GCAAAGCGCCATGTAACTG TACAGATAGAGAGAGAGTCG ATGAGTGTGCCAATGCTCTA



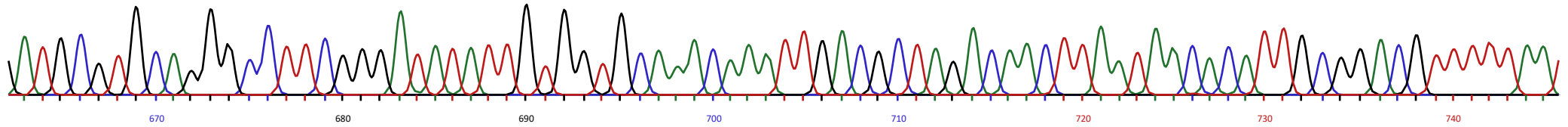
CCTTACATAT TTTCTTCCT TTTTTTGATATTCGATAGTC ATATCCCGCC CTCTAAACTG ACAAAATCGGC TGCATCTGTG CGGC



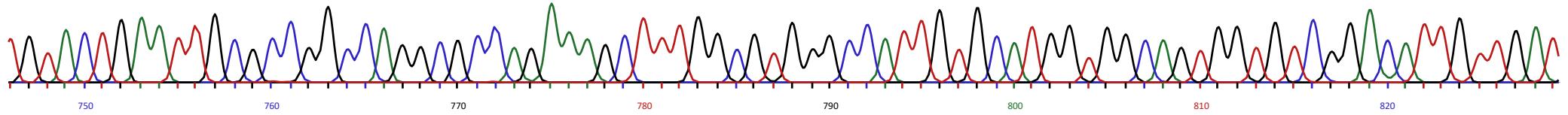
GCCAGT AGCTGATCCGAGGCGTGGCT TACAAC TCTCATTTAACAACCAGCATTCTT ATGCAAGCCA CATGTTCCAA CCCAGCCC



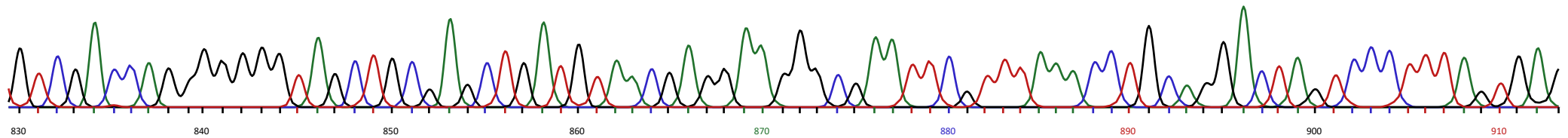
ACCCTGGCCTGA CGTTTTTGCCGTGTCTCGTT TGCGGTGCAGATATTCTATCCGCCCACTCA CACCATTGCTCCGTTGCATCG



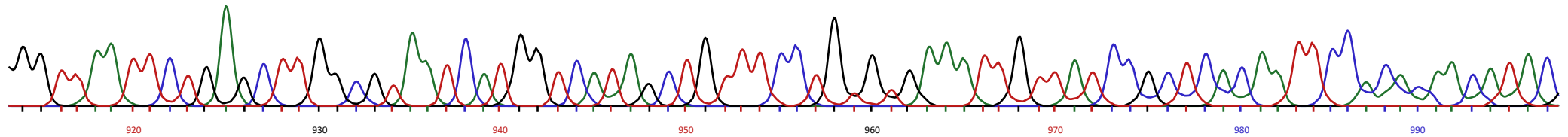
ATGCGTGCAGGGCCTTCGGGATATATTG TGGTGCAAACAATTGACGC TAGACAAC TTAACACAT TGCGGACGTT TTTAA



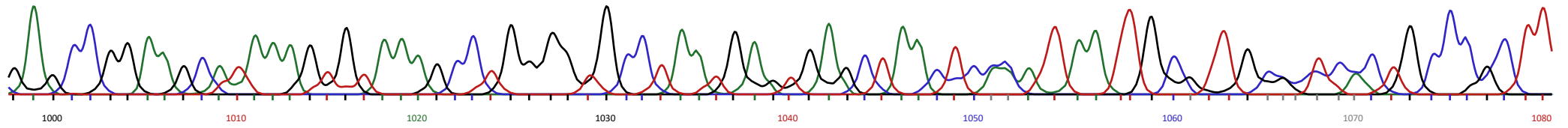
TGTACTGAATTGCGC CGGCCAGGCG CCAGAAAGCT TTGGCGTGGGCCATTGTGCATGGTGGCAGTGGTGTCTGGACATTGTTGAT



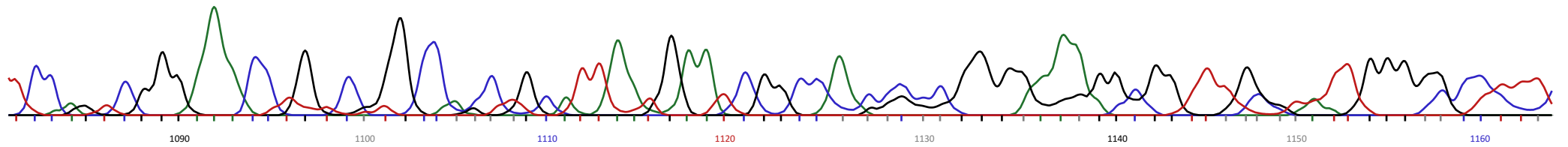
GTCGACCAGGG GGGGTAGCTG CGAGCTGATG TAACGAGGAA GGGCGAATTCGTTTAAACCT GCAGGACTAG TCCCTTTAGTGAG



GGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCAT GGTCATAGCT GTTTCCTGTG TGAAATTGTT ATCCGCTCAC AATTCCACACAACATAC



GAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTG CCTAATGAGT GAGCTAACTC --ATAATTGC -TTG----- CTGCCCGCTT



TCCAGTCGGGAAACCTGTC- TGCC----GC ATTAATGAAT C G G C C -