

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CAMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
HENRIQUE SANTILLO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO*
SENSU MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS A
PRODUTOS PARA SAÚDE

ÉRICA CAMELO VIANA LOPES

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *ThHsp70a*,
ThHsp70b e *ThHsp70c* DE *Trichoderma harzianum*
DURANTE O MICOPARASITISMO E ESTRESSE TÉRMICO**

ÉRICA CAMELO VIANA LOPES

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *ThHsp70a*,
ThHsp70b e *ThHsp70c* DE *Trichoderma harzianum*
DURANTE O MICOPARASITISMO E ESTRESSE TÉRMICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde.

Área de Concentração: Pesquisa e obtenção de produtos para saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Raphaela de Castro Georg

ANÁPOLIS – GO 2018

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

CER68a Camelô Viana Lopes, Érica
ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES ThHsp70a, ThHsp70b e
ThHsp70c DE *Trichoderma harzianum* DURANTE O
MICOPARASITISMO E ESTRESSE TÉRMICO / Érica Camelo Viana
Lopes; orientador Raphaela de Castro Georg. -- Anápolis, 2018.

59 f

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Mestrado
Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) --
Câmpus-Anápolis CET, Universidade Estadual de Goiás, 2018.

1. HSP70. 2. *Trichoderma harzianum*. 3. *S. sclerotiorum*. 4.
micoparasitismo. 5. controle biológico. I. de Castro Georg, Raphaela,
orient. II. Título.

Érica Camelo Viana Lopes

**“Análise da expressão dos genes ThHsp70a, ThHsp70b e ThHsp70c de
Trichoderma harzianum durante o micoparasitismo”**

Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás, para a obtenção do título de Mestre, aprovada em 25 de abril de 2018, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores



Prof. Dra. Raphaela de Castro Georg
Presidente da Banca
UEG



Prof. Dra. Valdirene Neves Monteiro
Membro Interno
UEG



Prof. Dra. Aline Raquel Voltan
Membro Externo
UFG

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me sustentou e guardou por toda esta caminhada, que não foi nada fácil, mas me concedeu forças para tornar este sonho uma realidade.

Agradeço à minha mãe e meu pai por todo apoio durante minha formação acadêmica, que sempre foram o esteio da minha vida e meu motivo de orgulho. Sem eles esse dia não se tornaria possível. Minha mãe Aurora e meu pai Hélio, muito obrigada pelo amor incondicional e por pelo menos tentarem entender um pouco do que eu fazia ... AMO MUITO VOCÊS.

Agradeço imensamente a todos do Laboratório de Enzimologia, à Bruna, Aline, Stephanie, Jomal. Meu Muito obrigada em especial às amigas Thuana e Letícia que, não tenho nem palavras para expressar o meu agradecimento p/or tantas ajudas prestadas! Que Deus abençoe muito cada uma de vocês. Obrigada pelo companheirismo, compartilhamento do conhecimento, risadas, suporte. Vocês fizeram esta caminhada muito menos pesada! Agradeço ainda ao Renato que me apoiou e deu forças quando muitas vezes eu estava muito cansada.

Agradeço muito à minha orientadora Professora Dr^a. Raphaela de Castro Georg pela oportunidade oferecida, orientação e paciência durante todo esse tempo e principalmente pela amizade.

Agradeço também a todos os professores que me ajudaram de alguma forma, a realizar esse trabalho, o Prof^a. Dr. Cirano José Ulhoa e à Prof^a. Dr^a. Valdirene Neves Monteiro, pelas ajudas e dicas durante todo este percurso, além da confiança e amizade.

Obrigada ao programa de Pós-Graduação em Biologia/UFG, ao Programa de Pós-Graduação da UEG (CAPS) e a todos os funcionários destas instituições que foram sempre tão solícitos... MUITO OBRIGADA!!!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Placa contendo o fungo *Trichoderma harzianum* crescido em meio de cultura MYG (Fonte Própria). 20
- Figura 2** - Crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio MYG com presença de escleródios – estruturas responsáveis pela sua sobrevivência e ciclo de vida (Fonte: Própria)..... 22
- Figura 3** - Evento de pré-contato na interação de *Trichoderma*-fungo hospedeiro. Fase1) Produção de compostos de alta massa molecular pelo micoparasita que atinge o hospedeiro. Fase 2) Geração de produtos de baixa massa molecular que são liberados da parede celular do hospedeiro e que ativam a cascata de expressão de genes. Vinale et al. (2008)..... 24
- Figura 4** - Gel de agarose 1% do RNA total extraído das placas de uma das três réplicas realizadas dos confrontos *T. harzianum* versus *T. harzianum* (TxT) e *T. harzianum* versus *S. sclerotiorum* (TxS). 1-Précont (TxT); 2- Pré-cont (TxS); 3- Cont (TxT); 4- Cont (TxS); 5- Pós-cont (TxT); 6- Pós-cont (TxS)..... 29
- Figura 5** - Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos das três proteínas ThHsp70 de *T. harzianum* analisadas neste trabalho, através do programa Clustal - 489504 (ThHsp70A), 499175 (ThHsp70B) e 81081 (ThHsp70C), correspondem, respectivamente, às proteínas. 37
- Figura 6** - Ensaio de pareamento em placa. (A): Pré-contato, contato e pós contato de *T. harzianum* (ALL) com *si próprio*, respectivamente. (B)Pré-contato, contato e pós contato de *T. harzianum* (ALL) com *S. sclerotiorum*, respectivamente. (C): Pré-contato, contato e pós contato de *T. harzianum* Δ ep1-1 com *si próprio*, respectivamente. (D): Pré-contato, contato e pós contato de *T. harzianum* Δ ep1-1 com *S. sclerotiorum*, respectivamente. 39
- Figura 7** - Curva de eficiência dos *primers*. (A): *Actina*; (B): *ThHsp70a*; (C): *ThHsp70b*; D: *ThHsp70c*. 40
- Figura 8** - Análise da expressão relativa de genes *ThHsp70a*, *ThHsp70b* e *ThHsp70c*.

(A): ALL x ALL em relação a ALL crescendo sozinho na placa; (B): $\Delta epl-1$ x $\Delta epl-1$ em relação a $\Delta epl-1$ crescendo sozinho na placa; (C): ALL x SS em relação a ALL crescendo sozinho na placa (D): $\Delta epl-1$ x SS em relação a $\Delta epl-1$ crescendo sozinho na placa.

42 Figura 9 - Expressão gênica relativa (em \log_2) de *ThHps70a*, *ThHsp70b* e *ThHsp70c* de *T. harzianum* (ALL42) durante estresse térmico, tendo como controle temperatura de 28 °C. Dados apresentam a expressão relativa ao gene actina, como gene referência.
44

Figura 10 - Expressão gênica relativa (em \log_2) de *ThHps70a*, *ThHsp70b* e *ThHsp70c* de *T. harzianum* (ALL42) durante tratamentos de estresse térmico e oxidativo tendo como controle a temperatura de 28 °C. 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para as reações de PCR em tempo real. ...	27
Tabela 2 - Proteínas da família Hsp70 de <i>S. cerevisiae</i> com e-value e porcentual de identidade de cada uma delas, juntamente às suas proteínas homólogas em <i>T. harzianum</i> . *corresponde às três proteínas que foram eliminadas das análises posteriores, por não possuírem domínios característicos da família Hsp70.	33
Tabela 3 - Localização celular das proteínas da família Hsp70 de <i>T. harzianum</i> preditas pelo programa Cello.	34
Tabela 4 - Similaridade entre as sequências de aminoácidos das proteínas de <i>T. asperellum</i> e <i>T. harzianum</i> , avaliadas pelo programa Blastp. *Corresponde às ortólogas em <i>T. atroviridae</i> que foram detectadas como induzidas durante o micoparasitismo. <i>e-value</i> - indica o número de alinhamentos que seriam esperados apresentando valores de <i>score</i> iguais ou melhores que o encontrado por acaso.	35
Tabela 5 - Grau de semelhança entre as sequências de aminoácidos das proteínas de <i>T. atroviride</i> e <i>T. harzianum</i> , avaliadas pelo programa Blastp.	36
Tabela 6 - Quantificação e avaliação do grau de pureza do RNA total medidos por espectrofotometria em comprimento de onda de 260/280 e 260/230 nm. As amostras correspondem aos experimentos de confronto nos momentos de pré-contato, contato e póscontato. ALL = <i>T. harzianum</i> (ALL42), SS = <i>S. sclerotiorum</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDNA	DNA complementar
DEPC	Água tratada com dietilpirocarbonato
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
MYG	Extrato de malte, extrato de levedura e glicose
QRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
T.A	Temperatura ambiente
TE	Tris EDTA
<i>ThHsp70a</i>	<i>Trichoderma harzianum</i> Hsp70a
<i>ThHsp70b</i>	<i>Trichoderma harzianum</i> Hsp70b
<i>ThHsp70c</i>	<i>Trichoderma harzianum</i> Hsp70c

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ix
RESUMO	xi
<i>ABSTRACT</i>	xi

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Proteínas de Choque Térmico	13
1.1.2 <i>Proteínas HSP70</i>	15
1.1.3 <i>HSP e Estresse Térmico</i>	15
1.2 Trichoderma spp	16
1.2.1 <i>Hsp e Trichoderma spp</i>	19
1.4 Micoparasitismo	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivos Gerais	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Manutenção dos Isolados	24
3.2 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS HSP70 DE <i>T. harzianum</i>	24
3.3 Localização Subcelular das Proteínas	25
3.4 Alinhamento de Sequências Múltiplas pelo PFAM	25
3.5 Alinhamento de Sequências Múltiplas Pelo Clustal Ômega	25
3.6 Teste de Pareamento	26
3.7 Extração de RNA	27
3.8 Síntese de cDNA	28
3.9. <i>qRT-PCR</i>	29
3.10 Análise da Expressão da Tolerância ao Stress Térmico e Oxidativo	29
3.11 Análises Estatísticas	30
4 RESULTADOS	32
4.1 Ensaio de Confronto Direto	39
4.2 Estresse Térmico e por Etanol	41
5 DISCUSSÃO	44
CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXOS	57

RESUMO

O fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* faz parte de um gênero de fungos que atuam como agentes de controle biológico, amplamente utilizado contra alguns fitopatógenos, tais como *Sclerotinia sclerotiorum*. Esta relação de micoparasitismo, acaba levando a determinados estresses sobre as células de *Trichoderma*, provocando uma resposta, a qual se dá através de mudanças no metabolismo celular, ativando mecanismos de defesa através das proteínas de choque térmico (Hsp). Este trabalho teve como objetivo analisar a expressão de genes que codificam proteínas de choque térmico da família HSP70 de *T. harzianum* durante o micoparasitismo e na resposta aos estresses térmico e oxidativo. O RNA total foi extraído de micélio de *T. harzianum* e do mutante $\Delta epl-1$ em condições de confronto em placa antes (pré-contato), durante (contato) e após o contato (pós-contato) com o fitopatógeno *S. sclerotiorum*. O RNA total foi também extraído de células de *T. harzianum* submetidas ao estresse por temperatura e etanol. Em seguida, utilizou-se qRT-PCR para avaliar o nível de expressão dos genes *ThHsp70a*, *ThHsp70b* e *ThHsp70c* durante as condições testadas. Observou-se que a expressão dos genes *ThHsp70a*, *ThHsp70b* e *ThHsp70c* varia de acordo com as fases do micoparasitismo. Os dados sugerem que o mecanismo de auto-reconhecimento de *T. harzianum* é importante para a ativação da expressão gênica de *ThHsp70b* e *ThHsp70c*. Todos os genes foram induzidos por choque térmico, mostrando os genes *ThHsp70a* e *ThHsp70c* os maiores níveis de mRNA. Durante o estresse com etanol, *ThHsp70a* foi o gene que apresentou a maior indução.

Palavras-chave: *Trichoderma harzianum*, *S. sclerotiorum*, controle biológico, micoparasitismo, HSP70, qRT-PCR

ABSTRACT

The filamentous fungus Trichoderma harzianum is part of a genus of fungi that act as agents of biological control, widely used against some phytopathogens, such as Sclerotinia sclerotiorum. This relationship of mycoparasitism, leads to certain stresses on the cells of Trichoderma, provoking a response, which occurs through changes in cellular metabolism, activating defense mechanisms through heat shock proteins (Hsp). This work aimed to analyze the expression of genes encoding heat shock proteins of the HSP70 family of T. harzianum during mycoparasitism and in the response to thermal and oxidative stresses. The total RNA was extracted from mycelium of T. harzianum and the Δ ep1-1 mutant under pre-contact conditions (precontact), during (contact) and after contact (contact) with the phytopathogen S. sclerotiorum. Total RNA was also extracted from T. harzianum cells subjected to temperature and ethanol stress. Then, qRT-PCR was used to assess the level of expression of ThHsp70a, ThHsp70b and ThHsp70c genes during the conditions tested. Expression of ThHsp70a, ThHsp70b and ThHsp70c genes has been observed to vary according to the phases of mycoparasitism. The data suggest that the mechanism of self-recognition of T. harzianum is important for the activation of the gene expression of ThHsp70b and ThHsp70c. All genes were induced by heat shock, showing the ThHsp70a and ThHsp70c genes at the highest mRNA levels. During stress with ethanol, ThHsp70a was the gene that presented the highest induction.

Keywords: *Trichoderma harzianum, S. sclerotiorum, biological control, mycoparasitism, qRT-PCR.*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Proteínas de Choque Térmico

Na década de 60, mais precisamente no ano de 1962, descobriu-se que a exposição de células da probóscida da mosca de frutas *Drosophila busckii* ao calor, propiciava o surgimento de sítios específicos de transcrição para síntese de proteínas (RITOSSA 1962; TISSIÉRES et al. 1974). Este estresse térmico provocava uma indução nos genes a serem expressos, causando uma resposta celular através da produção de proteínas de choque térmico (HSPs) (MEYER; SILVA, 1999).

Proteínas de choque térmico ou HSP estão presentes em todas as células e em todas as formas de vida. Em condições consideradas normais, ou seja, sem estresse, elas funcionam principalmente como chaperonas moleculares auxiliando no enovelamento de proteínas. Além disso, as concentrações das HSPs podem estar elevadas em várias condições em resposta a várias tensões (HWANG et al., 2016).

Geralmente, os níveis de HSP sofrem uma elevação somente em determinadas circunstâncias em resultado a algum estresse gerado, e isto ocorre rapidamente e logo sua concentração é diminuída (AUESUKAREE et al., 2012). Em contrapartida, existem também certas proteínas que não necessitam sofrer nenhum estresse para ter sua expressão HSP, sendo conhecidas por constitutivas, ou seja, expressas em todas as condições (GUPTA et al. 2010).

Proteínas de choque térmico são classificadas com base em suas massas moleculares em: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e small HSP. Para cada família de HSP, há diferentes proteínas - HSP72 e HSP73 - no grupo HSP70 onde os pesos moleculares são semelhantes, mas os padrões de expressão podem ser distintos (MEYER; SILVA, 1999). A capacidade que algumas espécies de fungos possuem para superar as condições do meio ambiente tem sido previamente relacionadas com as HSPs, proteínas altamente conservadas em seres eucariotos e procariotos (MONTERO-BARRIENTOS et al., 2010).

Sabe-se que estas chaperonas auxiliam no reparo de danos celulares sofridos em condições de estresse, bem como no enovelamento dos polipeptídeos. E para demonstrar a importância destas proteínas para populações naturais, expostas a ambientes variáveis que provocam situações de estresses, diversos experimentos

com *Drosophila melanogaster* têm sido realizados *in vitro*, principalmente no que diz respeito à melhora nas funções fisiológicas (RUTHERFORD & LINDQUIST, 1998; SORENSEN & LOESCHCKE, 2001; QUEITSCH ET AL., 2002; RUTHERFORD, 2003).

As Hsp70 são constituídas por uma vasta família de moléculas, sendo bastante associadas à resposta celular à temperatura. Também tem função na montagem, transporte e regulação da atividade de proteínas (Mayer e Baku, 2005). Entretanto, as HSPs não são induzidas apenas sob condições de estresse, sendo também expressas constitutivamente em diferentes células e organismos. De fato, as formas das Hsp's expressas constitutivamente, apresentam diferenças bioquímicas marcantes em comparação às formas induzíveis expressas em níveis quantitativamente superiores (HOROWITZ; ROBINSON, 2007).

Vários estresses, sejam eles químicos ou térmicos, provocados em plantas, como *Arabidopsis*, ocasiona uma ação, como por exemplo, a indução de genes que levam ao aumento da síntese de proteínas de choque térmico. Quando estas HSP são liberadas há uma reação ao estresse gerado, a qual se conhece por resposta ao choque térmico onde, na maioria das vezes, esta é comum a vários seres vivos ativada em situações que propiciam o aumento da expressão de genes (MEYER; SILVA, 1999).

Uma das maneiras de responder a estes e demais estresses é através da produção de proteínas do choque térmico (HSPs). Estas são responsáveis pelo enovelamento de proteínas deixando-as em sua conformação correta, pelo reenovelamento de proteínas que foram desnaturadas por alguma condição, como por exemplo, por calor (YOUNG, 2001), bem como pela degradação de proteínas que foram danificadas (WANG *et al.*, 2004).

Células submetidas a estresse podem sobreviver ou morrer, dependendo da natureza celular, do tipo e nível do estresse. A exposição prévia das células a estresses pode conduzir a uma resposta celular caracterizada pela síntese acentuada das Hsp's (DAUGAARD; ROHDE; JÄÄTTELÄ, 2007). Por conseguinte, uma nova exposição dessas células a estresses poderá produzir menores prejuízos, uma vez que, o alto conteúdo das HSPs já existente nessas células tende a torná-las termotolerantes contra novas exposições aos mesmos agentes estressantes.

1.1.2 Proteínas HSP70

A família de proteínas Hsp70 é considerada a mais conservada dentre as HSPs. Hsp70 são as mais ligadas à função de enovelamento de proteínas nas células e também associadas ao início e duração da tolerância à temperatura (TIRELLI et al., 2005; STINSHOFF et al., 2009; TARUTHUM et al., 2010; COLE & MEYERS, 2011; MONZO et al., 2012).

Os quatro principais representantes da família Hsp70, as quais possuem massa molecular de 72 kDa, sendo expressas constitutivamente são: Hsp72; Hsp73; HSPA5 (78 kD) e HSPA9 (75 kD). A Hsp73 é expressa constitutivamente em todas as células e presente tanto no núcleo como no citoplasma celular (BECKMANN et al., 1990). Já a Hsp72 é o principal membro da família expresso em resposta ao estresse (OGATA et al., 2009). HSPA5, localiza-se no lúmen do retículo endoplasmático, desempenhando papel fundamental na translocação proteica. E HSPA9 é encontrada no interior das mitocôndrias e além de atuar na resposta ao estresse, participa em outros processos celulares como controle de diferenciação e proliferação celular (WADHWA et al., 2002).

1.1.3 HSP e Estresse Térmico

Devido às oscilações que ocorrem nas condições ambientais, os organismos estão sujeitos a uma variedade de estresses. Em resposta à essas oscilações, a grande maioria dos organismos, especialmente os microrganismos, respondem a esses estímulos por meio de alterações no metabolismo celular, ativando seus mecanismos de defesa. A primeira resposta de um organismo a qualquer estresse ambiental acontece bioquimicamente, essa resposta ao estresse consiste na rápida expressão de uma classe de proteínas denominadas; proteínas de choque térmico (Hsp – *Heat Shock Proteins*), sendo esta uma das respostas primárias de proteção celular, a qual antecede todos os efeitos de maior nível organizacional (VIERLING, 1991).

Desde a primeira descrição, em células de glândula salivar de *Drosophila melanogaster* em que se observou que larvas sujeitas a um choque térmico por 30

minutos, determinava uma alteração no padrão de espessamento cromossomal (LOPES et al, 2012), essa resposta tem sido continuamente confirmada. Como esses espessamentos indicam locais de intensa atividade transcricional, tal mudança de padrão assinalava que o choque térmico teria ativado um conjunto de genes que determinava a expressão de um grupo específico de proteínas (RITOSSA, 1962). Assim, tais proteínas ficaram conhecidas como proteínas de choque térmico, ou proteínas de estresse, pois são sempre induzidas em resposta ao estresse, seja ele; oxidativo, osmótico, térmico ou decorrente da exposição a metais pesados. Isso ocorre devido ao fato de que agentes estressantes compartilham da capacidade de afetar de modo adverso a conformação correta, e conseqüentemente a função das proteínas (MINOWADA, 1995).

Entre as estratégias desenvolvidas por essas proteínas para auxiliar na defesa diante do estresse, incluem-se os mecanismos de indução à tolerância ao estresse (LEVITT, 1980).

1.2 *Trichoderma spp*

Trichoderma é um gênero classificado como pertencente aos fungos imperfeitos, subdivisão Deuteromycotyna, ordem Hifomicetes, família Moniliaceae e gênero *Hypocrea*, o qual constitui uma das duas fases que *Trichoderma* possui, denominada teleomórfica (MELO, 1991). Estes, possuem grande importância econômica dentro da agricultura, sendo também utilizado na produção de antibióticos e micotoxinas. Isto pode ser comprovado através da relação que ocorre entre *Trichoderma* e a planta, ocasionando em mudanças bioquímicas e estruturais importantes, dentre elas, uma maior produção de metabólitos, promovendo o crescimento do vegetal. Estas características favorecem a utilização de isolados de *Trichoderma* no desenvolvimento de produtos biotecnológicos (WOO et al., 2006). Por possuir essa propriedade este fungo é considerado um micoparasita (GÖRGEN et al., 2009; MUTHUKUMAR et al., 2011; KHALILI et al., 2012; ASAD et al., 2014).

Ultimamente vem evidenciando-se uma crescente preocupação da população com a saúde, ambiente e com isto surge a necessidade da criação de novos métodos de eliminação de pragas, mais eficientes (FRIGHETTO, 2000; LORITO et al., 2010).

O gênero *Trichoderma* pode ser um bom exemplo deste novo método.

O fungo é eficaz contra a proliferação de *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Botrytis* e *Rizoctonia* para algumas plantações de feijão, soja e cacau. É um método recente, que está presente no mercado, que se faz potente contra *Fusarium solani* e *Rizoctonia solani*, sendo utilizado para combate a estes fungos na cultura do feijão e vem sendo um mercado em constante crescimento (MORANDI et al, 2005). Já existem evidências que tratar o solo com *Trichoderma* melhora satisfatoriamente o crescimento radicular de plantas, aumento no caule, comprimento e espessura, da folha, e ainda um aumento no tamanho e número de flores (LINDSEY & BAKER, 1967; VINALE et al. 2008; ALTOMARE et al. 1999).

O gênero *Trichoderma* foi descrito pela primeira vez por Persoon em 1794 e revisado mais tarde por Rifai em 1969, o qual renomeou nove espécies de *Trichoderma*, sendo considerado de vital importância para a ciência (ROMEROARENAS et al., 2009). Para a diferenciação das espécies de *Trichoderma* são realizadas técnicas morfológicas em microscopia óptica e também moleculares, embora métodos individuais ainda não são suficientes para explicar a tamanha diversidade desse gênero de fungos (VIEIRA et al., 2013).

Algumas espécies de *Trichoderma spp* são típicas de regiões frias, a exemplo do *Trichoderma minutisporum*, *Trichoderma oiride* e *Trichoderma polysporum* que conseguem se desenvolver bem a 7 °C. Em contrapartida, a maioria das espécies adaptam-se melhor em temperaturas entre 25°C a 40°C, a exemplo do *Trichoderma hamatum* (35 °C), *Trichoderma harzianum* (28 °C) e *Trichoderma pseudokoningii* (40 °C) (DANIELSON & DAVEY, 1973; HJELJORD et al, 2003; SAMUELS, 2006). Além da temperatura, outros fatores influenciam em seu crescimento, dentre eles, umidade (92 a 95%). A habilidade de sobreviver a ambientes extremos facilita a presença do fungo em várias regiões, e por isso são tidos como fungos ubiqüitários. Ultimamente tem sido isolado por métodos tradicionais em solos do cerrado brasileiro (ALMEIDA et al., 2007).

Dentre as várias espécies de *Trichoderma spp*, uma das mais comuns é *T. harzianum*, podendo ser facilmente encontrada em vários tipos de solo e locais, e por isso é considerado como ubiqüitário (RIFAI, 1969; BISSET, 1991; LIMA, 2002). *T. harzianum* possui características próprias de cultivo diferentes de outros fungos e ainda apresenta capacidade de suportar variações de temperatura (MCBEATH & ADELMA, 1991).

T. harzianum quando cultivado em ágar possui características de colônia aveludada e de superfície esbranquiçada (ROMERO-ARENAS et al., 2009), com crescimento rápido em cultura e produção de conídios diferenciais (branco ou verdes) (Figura 1). Os conídios, que são produzidos abundantemente, podem ser soltos ou muito compactados em tufo (CORABI-ADELL, 2004). Microscopicamente são observados como fungos filamentosos e grandes produtores de esporos, com micélio formado por hifas hialinas ramificadas com parede lisa, com tamanho aproximado de 5 a 10 µm de diâmetro (WEEDEN; SHELTON; HOFFMAN, 2008).

T. harzianum foi caracterizado como sendo um tipo de fungo que protege as plantas do ataque proveniente de outros fungos, e nos últimos anos tem sido muito importante do ponto de vista biotecnológico, sendo as suas proteínas usadas com sucesso na agricultura e na indústria, atuando na produção de antibióticos (VIEIRA et al., 2013). Isso ocorre devido à mecanismos de controle diretos e indiretos. Entre os mecanismos diretos encontram-se competição por espaço e nutrientes, e entre os indiretos, indução da resistência em plantas a doenças causadas por fitopatógenos, podendo ser esta resistência sistêmica ou localizada (HARMAN et al, 2004).

A capacidade antagonista de *Trichoderma spp* varia de acordo com o patógeno a ser combatido e sofre interferência de alguns fatores como, o tipo de solo, temperatura e pH (HOWELL, 2003; TRUSHINA et al., 2013). Além disso está envolvido na produção de metabólitos, como as enzimas, que conseguem degradar a parede celular do fungo desejado (TROIAN et al., 2014). A característica da parede celular do microrganismo é um ponto crucial na produção dessas proteínas, dentre elas, as quitinases (LO; NELSON; HARTMAN, 1997).

Trabalhos a respeito do *Trichoderma spp.* no controle biológico de *S. sclerotiorum* tem sido descrito demonstrando diminuição capacidade do crescimento de *S. sclerotiorum* através da produção de enzimas, penetração e micoparasitismo (ABDULLAH et al., 2008).

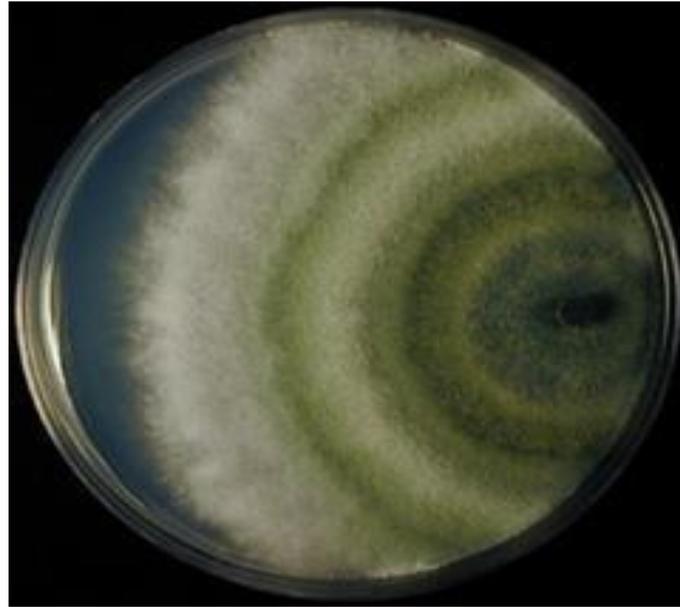


Figura 1 - Placa contendo o fungo *Trichoderma harzianum* crescido em meio de cultura MYG (Fonte Própria).

1.2.1 Hsp e *Trichoderma* spp

A habilidade de algumas cepas de *Trichoderma*, um agente de controle biológico, em sobreviver em condições extremas do meio ambiente estão relacionados a processos importantes, através da atuação de chaperonas moleculares.

Alguns estudos têm relacionado as proteínas Hsp de *Trichoderma* ao micoparasitismo (Marra et al., 2006; Seidl et al., 2009; Lorito et al., 2010; Steindorff et al., 2012). No entanto, análises mais aprofundadas ainda não foram realizadas. Seidl e colaboradores (2009) observaram em *Trichoderma atroviridae* algumas proteínas da família Hsp induzidas em condições de micoparasitismo, incluindo três membros da família Hsp70. Também pôde ser vista a indução de Hsp70 em *T. atroviridae* em resposta à presença do agrotóxico DDVP (2,2-diclorovinil dimetil fosfato) (ZHANG et al, 2015).

Já em *T. harzianum*, a superexpressão de uma Hsp70 aumentou a resistência do fungo ao estresse térmico e a outros estresses abióticos (Montero-Barrientos et al., 2008). Além disso, uma Hsp70 de *T. harzianum* foi superexpressa em *Arabidopsis thaliana* e, como resultado, estas linhagens foram mais resistentes ao calor, estresse oxidativo e osmótico (Montero-Barrientos et al., 2010).

Mota (2018) observou que a expressão dos genes Hsp70 durante o micoparasitismo parece ser modulada pelo fitopatógeno em *T. asperellum*, indicando que um conjunto diferente de proteínas é necessário para antagonizar diferentes fungos. De fato, observa-se que as espécies de *Trichoderma* possuem diferentes estratégias de micoparasitismo para o mesmo fitopatógeno (Atanasova et al., 2013). No estudo conduzido por Atanasova et al., (2013) foi observado que durante experimentos de confronto contra o fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, diferentes conjuntos de genes foram regulados para cima ou para baixo, dependendo da espécie de *Trichoderma* analisada. Por exemplo, cinco genes de chaperona/ choque térmico foram regulados positivamente em *Trichoderma virens* enquanto em *Trichoderma reesei* nenhum gene desta família foi induzido (Atanasova et al., 2013).

1.3 *Sclerotinia sclerotiorum*

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é um microrganismo causador da doença conhecidas como mofo branco em virtude dos sinais causados na planta. É morfológicamente caracterizado como pertencente ao grupo dos *Ascomycetos* e um fungo filamentosos presente em várias partes do mundo, atingindo aproximadamente 400 milhões de espécies diferentes de plantas (BOLAND & HALL, 1994; BOLTON *et al.*, 2006; BATISTA *et al.*, 2011). Geralmente está presente em regiões temperadas, tropicais e subtropicais, visto que, apresenta um bom desenvolvimento em temperaturas em torno de 11° a 25 °C sob uma alta umidade (LEITE, 2005).

S. sclerotiorum é um fungo possuidor de uma característica peculiar. O mesmo possui estruturas de resistência denominadas escleródio. Este, pode ser definido como um conjunto de hifas formadas por um longo período de tempo (BUTLER, 1966). Por conta da formação do escleródio este fungo sobrevive no solo por longos anos, podendo infectar as plantações. Em contrapartida, tem-se observado a atuação do *Trichoderma* como inibidor de crescimento deste fungo (ABDULLAH *et al.*, 2008). Estas estruturas têm papel fundamental na vida da *S. sclerotiorum*, pois em condições de temperatura e umidades ideais para o fungo e na presença de um hospedeiro susceptível, o escleródio produz micélio, penetrando diretamente na planta e infectando as flores (LEITE, 2005). Podem ser vistas perdas de até 100% de culturas infectadas por *S. sclerotiorum* (MANITOBA AGRICULTURE, 2002). Dentre elas, as

mais afetadas são o algodão, o feijão e a soja, sendo este prejudicado em até 20 % em algumas lavouras dentre os anos de 2005 e 2006 (BETTIOL & MORANDI, 2009).



Figura 2 - Crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio MYG com presença de escleródios – estruturas responsáveis pela sua sobrevivência e ciclo de vida (Fonte: Própria).

Estudos demonstraram que enzimas como N-acetil-glucosaminidases (NAGases), as quais participam do sistema quitinolítico, também são de extrema importância em processos de micoparasitismo contra o mofo branco (Figura 3) (GERALDINE *et al.*, 2013). Além destas, também β -1,3- glucanases e proteases são amplamente capazes de degradar parede celular do fitopatógeno, tais como *S. sclerotiorum*, sendo ainda relatado que estas conseguem causar diminuição da produção de escleródios (Figura 2), que germinam, produzem micélios e penetram na planta, infectando-a (WOO *et al.*, 2006).

1.4 Micoparasitismo

Trichoderma spp. tem sido estudado e conhecido pela característica de secretar antibióticos e enzimas, antagonizar e parasitar outros fungos e não causar doenças em plantas, sendo estas, características importantes para o controle biológico (MELO, 1996; DRUZHININA *et al.*, 2011; SCHUSTER & SCHMOLL, 2010). As substâncias químicas produzidas pelo fitopatógeno estimulam o crescimento das hifas de

Trichoderma na sua direção, iniciando-se então, a interação micoparasita, um processo complexo e que ocorre em várias etapas (CHET et al., 1988). O contato micoparasita-hospedeiro é mediado por lectinas do hospedeiro, uma classe de proteínas não imunológicas, que se ligam a carboidratos da parede celular de *Trichoderma* (ELAD et al., 1983). Ao degradar a parede celular do antagonista, o micoparasita ativa a expressão de genes presentes no micoparasitismo (VINALE, et al., 2008). Essa interação acaba induzindo o enrolamento do micélio do fitopatógeno ao redor das hifas do hospedeiro, possibilitando a penetração do *Trichoderma* nas hifas hospedeiras (ALMEIDA et al., 2007).

A intensidade de penetração de *Trichoderma* nas hifas do hospedeiro irá depender da taxa de secreção de enzimas hidrolíticas, que degradam a parede celular do fungo, permitindo a invasão no interior do corpo do hospedeiro (TROIAN et al., 2014). Além disso, ativar mecanismos de defesa depende de inúmeros fatores, dentre eles, a espécie de *Trichoderma*, tipo de cultivo, fungo antagonista, e condições ambientais tais como a temperatura, umidade e disponibilidade de nutrientes (BENÍTEZ et al., 2004).

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

O mecanismo mais importante realizado por *T. harzianum* é o de micoparasitismo, que consiste no ataque ao fungo hospedeiro. Este processo inclui o reconhecimento, ataque, penetração das hifas e, por fim, a morte do patógeno. Durante o ataque *T. harzianum* libera enzimas degradadoras de parede celular (endoquitinases, β -glicosidase, fosfatases ácidas e proteases), as quais agem causando o controle efetivo de patógenos como *Botrytis cinérea*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium spp* (MONTEIRO et al., 2010).

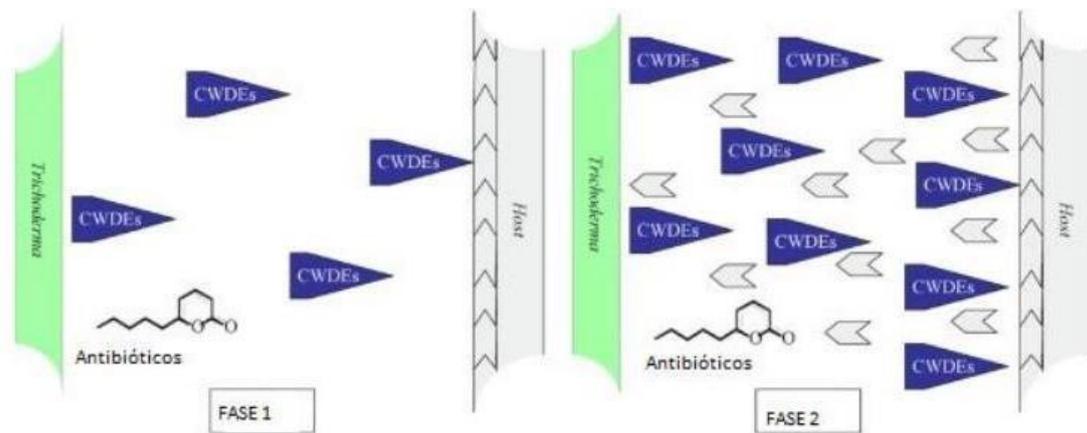


Figura 3 - Evento de pré-contato na interação de *Trichoderma*-fungo hospedeiro. Fase1) Produção de compostos de alta massa molecular pelo micoparasita que atinge o hospedeiro. Fase 2) Geração de produtos de baixa massa molecular que são liberados da parede celular do hospedeiro e que ativam a cascata de expressão de genes. Vinale et al. (2008).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a família HSP70 de *Trichoderma harzianum* e verificar a importância da atuação destas chaperonas no processo de micoparasitismo, reconhecimento próprio, estresse térmico e por etanol.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar as proteínas da família HSP70 codificadas no genoma de *T. harzianum*, a partir da análise de banco de dados e utilizando ferramentas de bioinformática;
- Avaliar a expressão dos genes que codificam as proteínas *ThHsp70a*, *ThHsp70b* e *ThHsp70c* durante o micoparasitismo, em ensaios de confronto em placa e durante estresses térmico e por etanol, utilizando PCR em tempo real quantitativa;
- Analisar a expressão dos genes que codificam as proteínas *ThHsp70a*, *ThHsp70b* e *ThHsp70c* no mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum* durante o micoparasitismo, em ensaios de confronto em placa, utilizando PCR em tempo real quantitativa;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Manutenção dos Isolados

T. harzianum (isolado ALL42) da coleção do laboratório de Enzimologia da UFG foi mantido com repiques periódicos inicialmente em meio MYG [0,5% (p/v) de extrato de malte, 0,25% (p/v) de extrato de levedura, 1% (p/v) de glicose e 2% (p/v) de ágar]. Os repiques foram mantidos em temperatura ambiente ($\pm 28^\circ\text{C}$), sob condições de fotoperíodo.

3.2 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS HSP70 DE *T. harzianum*

A fim de identificar as proteínas da família HSP70 de *T. harzianum* foi utilizado inicialmente as sequências de aminoácidos das proteínas Hsp70 de *Sacharomyces cerevisiae*, fungo muito utilizado como modelo de estudo e já caracterizado quanto às suas HSPs. As sequências de aminoácidos das Hsp70 de *S. cerevisiae* foram comparadas com todas as proteínas preditas do genoma de *T. harzianum* (CBS 226.95 v1.0) através de Ferramenta de Alinhamento Local de Sequências (BLASTp).

3.3 Localização Subcelular das Proteínas

Com o auxílio da ferramenta Cello v 2.5 *Subcellular Localization Predictor* (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) foi possível prever a localização subcelular das 12 HSP70 identificadas nesse trabalho.

3.4 Alinhamento de Sequências Múltiplas pelo PFAM

Para confirmar a identidade das proteínas identificadas anteriormente como Hsp70 foi executado alinhamento de sequências múltiplas pelo Pfam - (<http://pfam.xfam.org/>). Essa ferramenta avalia a identidade utilizando os domínios das proteínas ou partes estruturais delas, caracterizando assim partes funcionais.

3.5 Alinhamento de Sequências Múltiplas Pelo Clustal Ômega

Para a determinação de quais proteínas seriam estudadas neste trabalho, observou-se a expressão das HSP70 no estudo realizado por SEIDL *et al.* (2009), do confronto entre *Trichoderma atroviride* e os fitopatógenos *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia solani*. As três proteínas que tiveram sua expressão elevada no micoparasitismo (IDs 132465, 142538 e 149341) foram então comparadas com todas as sequências de proteínas de *T. harzianum* (CBS 226.95 v1.0) através do programa BLASTp no portal JGI. Para identificar regiões de similaridade, foi realizado um alinhamento das sequências de três HSP 70 de *T. harzianum* (IDs 489504 / 499175 /

81081) através do programa Clustal Ômega. Estas proteínas foram aqui nomeadas, respectivamente de ThHsp70A, ThHsp70B e ThHsp70C, respectivamente.

Posteriormente, os *primers* correspondentes aos genes das proteínas deste estudo foram desenhados utilizando-se o programa Primer3Plus (site).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para as reações de PCR em tempo real.

Nome	Sequência (5'→3')	Bases	Tm °C
ThHsp70 aF	ACA ACA AGC TGC TCG GAA AC	20	59,3 °C
ThHps70 aR	CTT CAT CAC TGC CGA TGC TT	20	58,7 °C
ThHsp70 bF	TTG GTC GCA AGT TCA ACG AG	20	59,1 °C
ThHsp70 bR	GTC ATT GAC CGC GAT GGA AA	20	58,9 °C
ThHsp70 cF	AGA TTT CGA CAA CCG CCT TG	20	58,8 °C
ThHsp70 cR	GAA CTC TGT CTT CGT CTG CT	20	60,0 °C
Actin R	ACG TAG GAG TCC TTC TGA CCC ATA	24	58,6 °C
Actin F	CGA CAA TGG TTC CGG TAT GTG CAA	24	59,8 °C

3.6 Teste de Pareamento

Foram utilizados os fungos *T. harzianum*, o mutante *T. harzianum-Δepl-1* e o fitopatógeno *S. sclerotiorum*.

O confronto foi realizado em placas de petri, contendo meio de cultura MYG (malte, levedura e glicose). Discos de *T. harzianum* e do fitopatógeno, ambos de aproximadamente 1 a 2 mm, foram retirados das colônias em prazo de 3 dias de crescimento em meio MYG e transferidos para outra placa contendo o mesmo meio de cultura acrescidos de papel celofane. Os discos foram dispostos em lados opostos mantendo uma distância de aproximadamente 1 cm da margem. As placas foram mantidas em estufa BOD com temperatura de 28°C e fotoperíodo de 12 horas.

Após cerca de 2 dias, quando *T. harzianum* e o fitopatógeno ficaram a uma proximidade de um a dois cm de distância um do outro, foi retirado o micélio do micoparasita - condição denominada pré-contato. Em outras três placas, quando *T. harzianum* encostou no fitopatógeno, aproximadamente 2 dias após pré-contato, foi retirado seu micélio - contato. E por fim, também em 3 réplicas técnicas, quando o micoparasita já havia lançado as suas hifas sob o fitopatógeno ou o oposto, foi retirado

o micélio do ALL 42 - condição denominada pós-contato. Os micélios foram retirados através da utilização de espátulas estéreis, sendo cada réplica armazenada em papel alumínio, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultra freezer -80 °C. O antagonismo das cepas de *T. harzianum-Δepl-1* e *T. harzianum* (ALL42) contra o fitopatógeno *S. sclerotiorum* foram detectados utilizando meio MYG contendo discos dos fungos situados na borda das placas. As mesmas foram incubadas a 28 °C com um fotoperíodo de 12h (CARSOLIO, C., GUTIÉRREZ, A., JIMÉNEZ, B. & VAN MONTAGU, M. & HERRERA-ESTRELLA, A., 1994). Os micélios foram retirados em condições de pré-contato, contato e pós-contato com o fitopatógeno, de acordo com a classificação proposta por Bell et al, (1982) sendo elas: antes que um encostasse no outro (após 3 dias), quando eles estavam apenas tocando (após 4 dias) e quando a zona de interação tinha aproximadamente 1 cm de largura (após 7 dias). Os micélios coletados nas condições de pré-contato, contato e pós-contato foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer -80 °C até posterior extração de RNA.

O confronto foi realizado da seguinte forma: *T. harzianum-Δepl-1* versus *T. harzianum-Δepl-1*; *T. harzianum-Δepl-1* versus *S. sclerotiorum*; *T. harzianum* versus *T. harzianum*; e *T. harzianum* versus *S. sclerotiorum*. Para que os micélios das zonas de interação fossem coletados, as placas contendo meio foram cobertas com folhas de celofane estéril.

3.7 Extração de RNA

Para extração de RNA total, os micélios de *Trichoderma* armazenados em ultra freezer – 80°C foram colocados em gral para, com o auxílio de pistilo, serem macerados com auxílio de nitrogênio líquido. Após maceração completa os micélios foram armazenados em eppendorf sob a presença de 1 mL de reagente TRIReagente (Invitrogen™) para conservação e congelados -80 °C. Em seguida, os mesmos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Depois de centrifugado o sobrenadante foi transferido para novos eppendorfs contendo 200 µL de clorofórmio. Foram homogeneizados em vórtex e incubados por 3 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi em seguida transferido para novos tubos contendo 250 µl de isopropanol e 250 µl de citrato de sódio. Após isso, foram misturados por inversão durante 10 segundos. A solução aquosa foi incubada por tempo de 10

minutos à temperatura ambiente e centrifugada por 12.000 rpm por 10 minutos. Descartado o sobrenadante, o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 75%, centrifugado a 7.500 rpm por 5 minutos a 4° C. Removeu-se o sobrenadante e o *pellet*, e procedeu-se a secagem do mesmo em equipamento speed vac por 10 minutos. Por fim, o pellet foi ressuscitado em 50 l de água DEPC. A quantificação do RNA extraído foi realizada em espectrofotômetro (Thermo Scientific NanoDrop™) nas absorvâncias 260/280nm e 260/230 nm usadas para avaliação da pureza da amostra de RNA. Segundo fabricante, são aceitos valores até 2,0 para absorvâncias de 260/280 e 260/230, visto que, valores fora deste limiar, podem indicar Em seguida para avaliação da integridade do RNA foi realizada eletroforese em pH alcalino em gel de agarose.

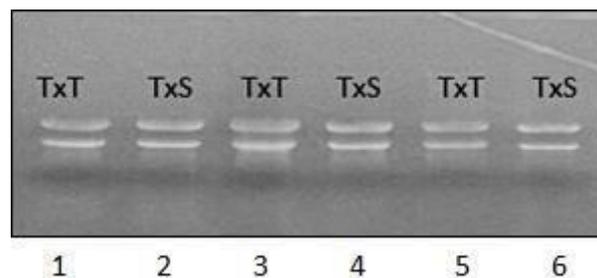


Figura 4 - Gel de agarose 1% do RNA total extraído das placas de uma das três réplicas realizadas dos confrontos *T. harzianum* versus *T. harzianum* (TxT) e *T. harzianum* versus *S. sclerotiorum* (TxS). 1Précont (TxT); 2- Pré-cont (TxS); 3- Cont (TxT); 4- Cont (TxS); 5- Póscont (TxT); 6- Pós-cont (TxS).

3.8 Síntese de cDNA

Para realização da síntese da primeira fita de cDNA fez-se a necessidade das junções das amostras de pré-contato (réplicas biológicas 1, 2 e 3), contato (réplicas biológicas 1, 2 e 3) e pós-contato (réplicas biológicas 1, 2 e 3). Além das três réplicas de estresse térmico e por etanol. Para tal, após a quantificação do RNA em tecnologia NanoDrop, foi retirada de cada réplica técnica, a quantidade necessária para uma concentração final de 5 µg/ul. Começou-se então o tratamento das amostras com DNase para remoção do DNA genômico, restando somente o RNA. Para o cumprimento desta etapa foram utilizados água miliq, RNAsin, tampão de DNase, RNA e DNase – todos reagentes do próprio kit. Em seguida, levou-se ao termociclador

em dois ciclos: 37° C por 1h; adição de 2µl de EDTA e 65° por 10 min. O próximo passo foi a realização de cDNA. Para tanto, utilizou-se o RNA anteriormente tratado. Levou-se ao termociclador por 5' a 65°. Acrescentou-se tampão da reação, inibidor de RNase, transcriptase, DNTP. Levou novamente ao termociclador em três tempos: 25° por 5'; 45° por 60' e 70° por 5'.

3.9. qRT-PCR

Após tratamento com DNase e síntese de cDNA, os mesmos foram utilizados para análise por RT-PCR utilizando o equipamento iQ5 (Bio-Rad), usando SYBR Green para o sinal de detecção, de acordo com as instruções do fabricante. Para a verificação da eficiência da amplificação dos *primers* foi realizado um ensaio com diluições de cDNA de 1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000. O programa de amplificação da qRT-PCR em tempo real usado neste estudo foi: 95°C por 10 minutos seguidos de 39 ciclos de 95°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos seguidos de curva de dissociação de 60°C até 95°C com sucessivos incrementos de 0,5°C, por 10 segundos. O nível de expressão dos genes foi calculado, e a amostra de *T. harzianum* crescida em condições fisiológicas (sem presença do fitopatógeno) foi utilizada como controle. Neste teste utilizou-se 10 µL de SYBER Green PCR Master Mix (Fermentas), 2 µL de mix de primers Forward e Reverse (10 µM), 2 µL de cDNA e 6 µL de água livre de nucleotídeo.

3.10 Análise da Expressão da Tolerância ao Stress Térmico e Oxidativo

Os fungos permaneceram em crescimento em estufa BOD por 28°C e fotoperíodo até ocuparem toda a placa de petri, o que se dava em um período de 3 a 4 dias. Após este crescimento, cada placa foi dividida em 4 partes iguais, a fim de que pudesse ser retirado 10⁷ de micélio para cada frasco. Foram utilizadas um total de 5 placas para 15 frascos, em cada uma das réplicas.

Após a retirada de cada 10⁷ de micélio, este foi inoculado em frascos contendo 50 mL de meio líquido – TLE. Os 15 frascos, contendo 50 mL cada um, foram então incubados à temperatura de 28°C sob agitação constante de 180 rpm em agitador rotatório por 48 horas a 28°C. Após este tempo, 3 frascos foram retirados para controle, tendo o micélio de cada frasco coletado por filtração à vácuo e armazenado em ultrafreezer -80°. E seguida, os outros frascos foram submetidos a stress térmico

de 38° por diferentes períodos de tempo, sendo 3 frascos colocados a temperaturas de 38° por 30 min., 3 frascos a 38° por 1h, 3 frascos a 38° por 2 hrs e 3 frascos a 38° por 4 hrs. O micélio de cada frasco (38° 30 min., 38° 1 hora, 38° 2 horas e 38 4 horas) foi retirado, respeitando os respectivos períodos de tempo, através do mesmo processo de filtração, e posterior armazenamento a -80 °. Em seguida os micélios de cada réplica técnica foram misturados para serem macerados com utilização de cadinho e pistilo, utilizando-se nitrogênio líquido e após acrescentando cerca de 1 mL de trizol para conservação do micélio. Além deste primeiro estresse térmico, foi realizado também um posterior, realizado com 18 frascos submetidos a stress térmico diferentes sendo eles: 3 frascos a 4° por 1 hora, 3 frascos a 10° por 1h, 3 frascos a 32° por 1 h e 3 frascos a 48° por 1 h. Além do stress térmico oi realizado também o stress oxidativo. Em 3 frascos foi acrescido etanol 10 % e submetido também a rotação de 180 rpm por 1 h e retirado seguindo o mesmo procedimento.

Os mesmos procedimentos foram realizados posteriormente com cada condição, sendo eles, extração de RNA, eletroforese em gel de agarose, síntese de cDNA e qRT-PCR

3.11 Análises Estatísticas

A quantificação da expressão gênica foi calculada de acordo com o método de Livak, $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Para cada amostra, analisada em triplicata, o valor ΔC_T foi obtido subtraindo o valor de C_T da β -actina do valor de C_T de cada gene de interesse. Assim o $\Delta\Delta C_T$ foi calculado subtraindo o valor de ΔC_T do controle do valor do ΔC_T da amostra. No intuito de facilitar a leitura das variações de nível de expressão a expressão relativa dos genes foi apresenta em \log_2 .

Para comparar a expressão relativa dos genes analisados nas condições experimentais com as condições utilizadas como controle foi realizado uma análise de variância simples (ANOVA) seguido de teste de Monte Carlo, que compara os testes com o controle, usando o programa GraphPad Prism versão 7.00. O nível de significância considerado foi de 5%.

4 RESULTADOS

Embora *T. harzianum* tenha seu genoma sequenciado, não há informação detalhada sobre a anotação das proteínas da família Hsp70. Portanto, para identificar as proteínas da família HSP70 de *T. harzianum* fez-se uma comparação (Blastp) entre as sequências de aminoácidos de todas as HSP70 preditas no genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, obtidas no banco de dados, contra todas as sequências de proteínas preditas no genoma de *T. harzianum* (CBS 226.95 v1.0), disponíveis no portal JGI.

Utilizando esta ferramenta, foram identificadas 15 sequências de aminoácidos correspondendo a proteínas da família Hsp70 de *T. harzianum* (Tabela 1). Posteriormente, foi realizada a identificação dos domínios que caracterizam Hsp70s no programa Pfam com o intuito de verificar se realmente todas compunham essa família. No entanto, destas 15 proteínas, somente 12 correspondiam à HSP70s. Portanto, as 3 proteínas restantes foram eliminadas da pesquisa (Tabela 1).

Tabela 2 - Proteínas da família Hsp70 de *S. cerevisiae* com e-value e porcentual de identidade de cada uma delas, juntamente às suas proteínas homólogas em *T. harzianum*. *corresponde às três proteínas que foram eliminadas das análises posteriores, por não possuírem domínios característicos da família Hsp70.

ID (<i>S. cerevisiae</i>)	e-value	%IDENTIDADE	ID <i>T. harzianum</i>
YJL034W KAR2	9.3e-108	61%	145858
YJR045C SSC1	3.5e-243	84%	489504
	1e-243	84%	499175
YER103W SSA4			
YBR169C SSE2	3.2e-137	70%	503436
YKL073W LHS1	8.8e-52	50%	503836
YDR258C HSP78	1.9e-228	74%	509199*
YNL209W SSB2	2.8e-234	85%	5722
YLL026W HSP104	7.6e-200	65%	8037*
YJL034W KAR2	6.8e-247	82%	81081
YJR045C SSC1	0.00018	42%	516115
YEASTORF	0.404	50%	127128*
YLR369W SSQ1	1.2e-09	44%	92034
YDL229W SSB1	1.8e-06	46%	223929
YBL075C SSA3	2e-08	41%	496481

YER103W SSA4	5.8e-07	48%	498219
--------------	---------	-----	--------

Com o auxílio da ferramenta Cello v 2.5 *Subcellular Localization Predictor* foi possível prever a localização subcelular das 12 proteínas. Observamos que as proteínas Hsp70 foram preditas em diferentes compartimentos celulares como citoplasma, mitocôndria, núcleo e retículo endoplasmático (Tabela 2). Podem ser verificadas que, das 12 proteínas, 8 delas são citoplasmáticas, 2 mitocondriais e 2 localizadas no retículo endoplasmático.

Tabela 3 - Localização celular das proteínas da família Hsp70 de *T. harzianum* preditas pelo programa Cello.

ID <i>Trichoderma harzianum</i>	LOCALIZAÇÃO
145858	Citoplasma
489504	Mitocôndria
499175	Citoplasma
503836	Retículo Endoplasmático
503436	Citoplasma
5722	Citoplasma
81081	Retículo Endoplasmático
516115	Citoplasma
92034	Citoplasma
223929	Mitocôndria
496481	Citoplasma
498219	Citoplasma

Além de analisar a localização das 12 proteínas, realizamos uma análise por Blastp entre as sequências de aminoácidos de Hsp70 de *T. harzianum* e *T. asperillum* para verificar o grau de similaridade das proteínas ortólogas, das duas espécies de *Trichoderma* (Tabela 3).

Tabela 4 - Similaridade entre as sequências de aminoácidos das proteínas de *T. asperellum* e *T. harzianum*, avaliadas pelo programa Blastp. *Corresponde às ortólogas em *T. atroviridae* que foram detectadas como induzidas durante o micoparasitismo. *e-value*- indica o número de alinhamentos que seriam esperados apresentando valores de *score* iguais ou melhores que o encontrado por acaso.

<i>T. harzianum</i>	<i>e- value</i>	% IDENT	<i>T. asperellum</i>
ID 145858	0,0e0	97,9	ID 188291
ID 516115	0,0e0	97,4	ID 128301
ID 5722	0,0e0	98,0	ID 140277
ID 496481	0,0e0	95,6	ID 148983
ID 92034	0,0e0	99,0	ID 150656
ID 503436	0,0e0	98,0	ID 24918
ID 489504*	0,0e0	96,8	ID 43441
ID 503836	0,0e0	94,0	ID 53053
ID 499175*	0,0e0	95,6	ID 80694
ID 223929	0,0e0	97,4	ID 83736
ID 498219	0,0e0	100,0	ID 23336
ID 81081*	0,0e0	96,3	ID 445543

SEIDL et al, (2009) observaram três genes codificando Hsp70 induzidos em *T. atroviride* durante o micoparasitismo. Considerando esses dados, verificamos quais proteínas de *T. harzianum* correspondiam às Hsp70 identificadas no trabalho com *T. atroviride*. Para essa análise foi feito uma comparação entre as sequências de aminoácidos das proteínas Hsp70 de *T. atroviridae*, e o banco de dados de sequências de proteínas de *T. harzianum*.

Ao comparar as três proteínas pôde ser observado suas ortólogas em *T. harzianum* (IDs, 499175, 81081 e 489504). Todas apresentando similaridade de sequência de aminoácidos entre *T. atroviride* e *T. harzianum*, variando entre 51% a 72% (Tabela 4). Essas proteínas foram então selecionadas para as análises de expressão gênica realizadas em *T. harzianum*, neste trabalho, tendo sido nomeadas de *ThHsp70a*, *ThHsp70b* e *ThHsp70c*.

Tabela 5 - Grau de semelhança entre as sequências de aminoácidos das proteínas de *T. atroviride* e *T. harzianum*, avaliadas pelo programa Blastp.

<i>T. atroviride</i>	% IDENT.	<i>T. harzianum</i>
ID 132465	72,55%	ID 499175 (<i>ThHsp70a</i>)
ID 142538	65,32%	ID 81081 (<i>ThHsp70b</i>)
ID 149341	51%	ID 489504 (<i>ThHsp70c</i>)

Posteriormente, foi realizado o alinhamento de sequências múltiplas pelo Clustal Ômega das 3 proteínas de *T. harzianum* (499175, 81081 e 489504). Os resultados apresentados na figura abaixo demonstram o alinhamento múltiplo entre os resíduos de aminoácidos das três proteínas Hsp70. Nesta análise, as áreas que apresentam um asterisco no alinhamento indicam máxima identidade entre todas as sequências analisadas. Podemos observar semelhanças entre sequências de nucleotídeos e aminoácidos, como resultado de similaridades, o que poderia reforçar a importante participação das mesmas nos mecanismos de reparo de proteínas recém-sintetizadas e em respostas celulares ao estresse em organismos.

T. harzianum (ALL) e *S. sclerotiorum* foram posicionados, em direções opostas, em placas de Petri contendo meio MYG e forradas com papel celofane. O micélio de *T. harzianum* (ALL) foi retirado em situações de pré-contato, contato e pós-contato com o fitopatógeno. Procedeu-se a extração de RNA das amostras e avaliação da expressão dos genes utilizando-se a técnica de qRT-PCR. Para *T. harzianum* (ALL42), três genes foram avaliados quanto à sua expressão relativa: ThHsp70a, ThHsp70b e ThHsp70c. No micoparasitismo, comparou-se os momentos de précontato, contato e pós-contato.

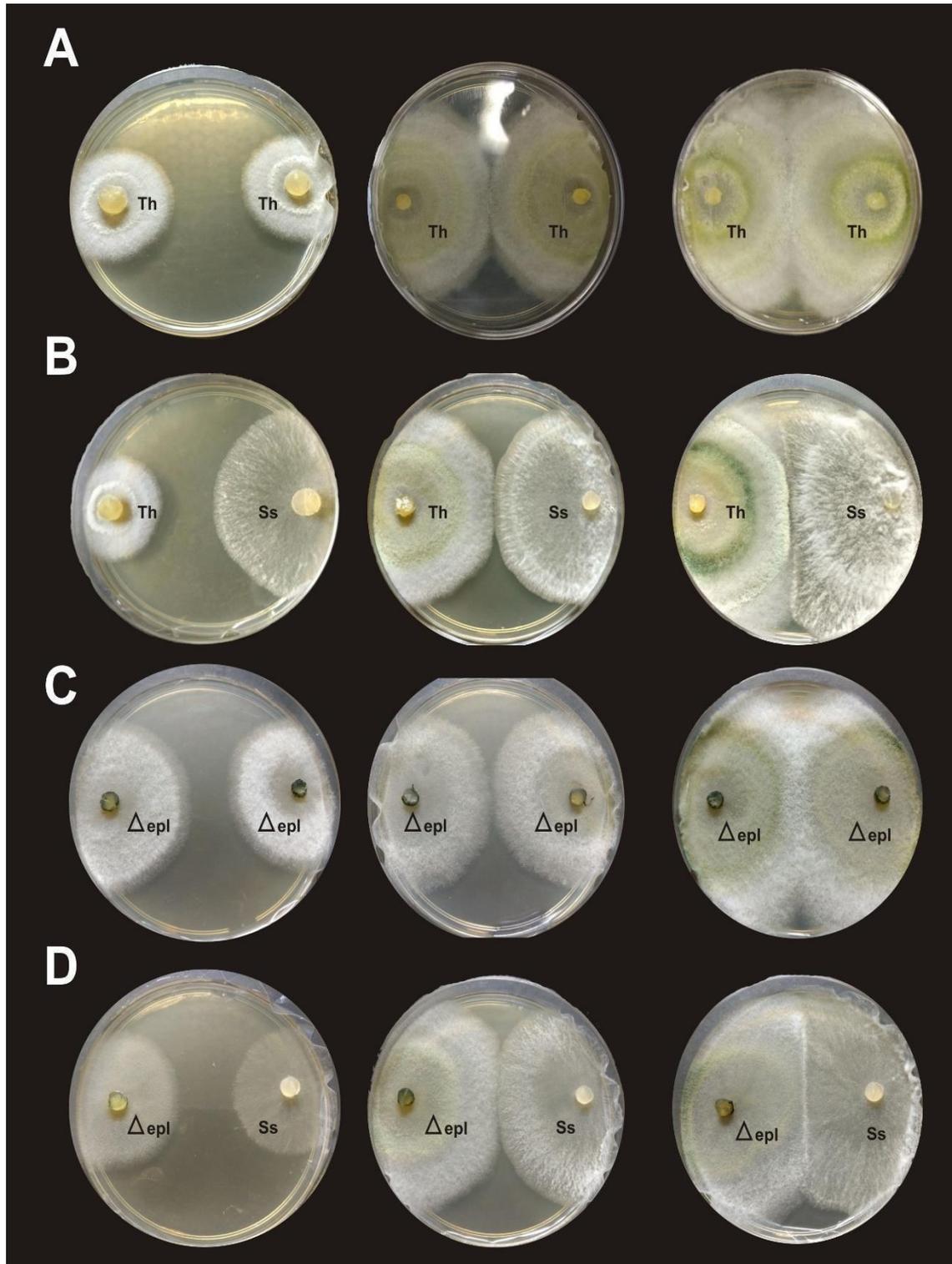


Figura 6 - Ensaio de pareamento em placa. (A): Pré-contato, contato e pós contato de *T. harzianum* (ALL) com *si próprio*, respectivamente. (B) Pré-contato, contato e pós contato de *T. harzianum* (ALL) com *S. sclerotiorum*, respectivamente. (C): Pré-contato, contato e pós contato de *T. harzianum* $\Delta ep1-1$ com *si próprio*, respectivamente. (D): Pré-contato, contato e pós contato de *T. harzianum* $\Delta ep1-1$ com *S. sclerotiorum*, respectivamente.

Os ensaios de qRT-PCR para avaliação da expressão gênica de *ThHsp70a*, *ThHsp70b* e *ThHsp70c* foram realizados utilizando os cDNA previamente sintetizados. Os valores de eficiência de amplificação, conjuntamente com os CTs (*cycle threshold*) foram utilizados para calcular a expressão relativa. Os níveis de expressão dos genes foram calculados de acordo com o método 2^{-DDCT} (LIVAK e SCHMITTGEN 2001). O experimento foi conduzido com três repetições. Para cada amostra os resultados foram comparados de uma só vez para analisar as diferenças entre as condições relacionadas aos controles usando GraphPad Prism 5 para Windows.

Para análise da eficiência de amplificação dos *primers* da qRT-PCR, foi utilizado o método de Pfaffl (2001). O coeficiente de correlação foi considerado ideal quando $R^2 > 0,95$.

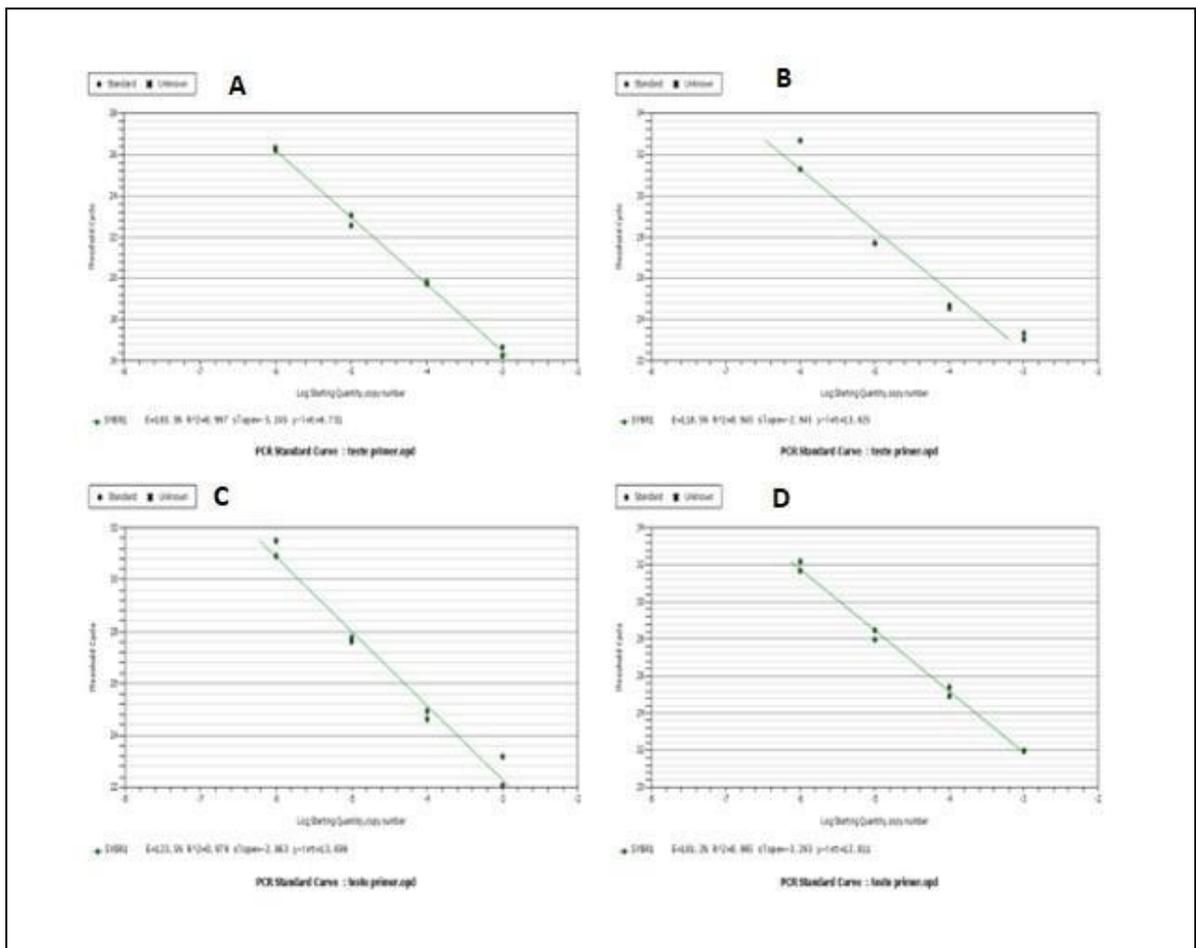


Figura 7 - Curva de eficiência dos *primers*. (A): *Actina*; (B): *ThHsp70a*; (C): *ThHsp70b*; D: *ThHsp70c*.

4.1 Ensaios de Confronto Direto

Inicialmente avaliou-se a expressão dos genes *ThHsp70a*, *ThHsp70b* e *ThHsp70c* durante a interação pré-contato, contato e pós-contato entre *T. harzianum* e ele próprio (Figuras 7A e 9A). Curiosamente, observamos que os genes *ThHsp70b* e *ThHsp70c* foram induzidos após o contato entre as hifas de *T. harzianum*, sendo o gene *ThHsp70c* altamente induzido. Além disso, não detectamos tal indução durante o contato entre as hifas de *T. harzianum* $\Delta epl-1$. Pelo contrário, todos os genes foram reprimidos em todas as condições analisadas (Figuras 7C e 9B). Estes dados sugerem que o mecanismo de auto-reconhecimento de *T. harzianum* é importante para a ativação da expressão gênica de *ThHsp70b* e *ThHsp70c*.

Quando analisamos a expressão dos genes *ThHsp70a*, *ThHsp70b* e *ThHsp70c* durante o micoparasitismo de *T. harzianum* contra *S. sclerotiorum*, observamos que os genes *ThHsp70b* e *ThHsp70c* também foram induzidos durante o pós-contato, enquanto o gene *ThHsp70a* foi induzido durante o contato (Figuras 7B e 9C). Detectamos alta indução do gene *ThHsp70c* durante o pós-contato entre as mutantes $\Delta epl-1$ e *S. sclerotiorum* (Figuras 7D e 9D).

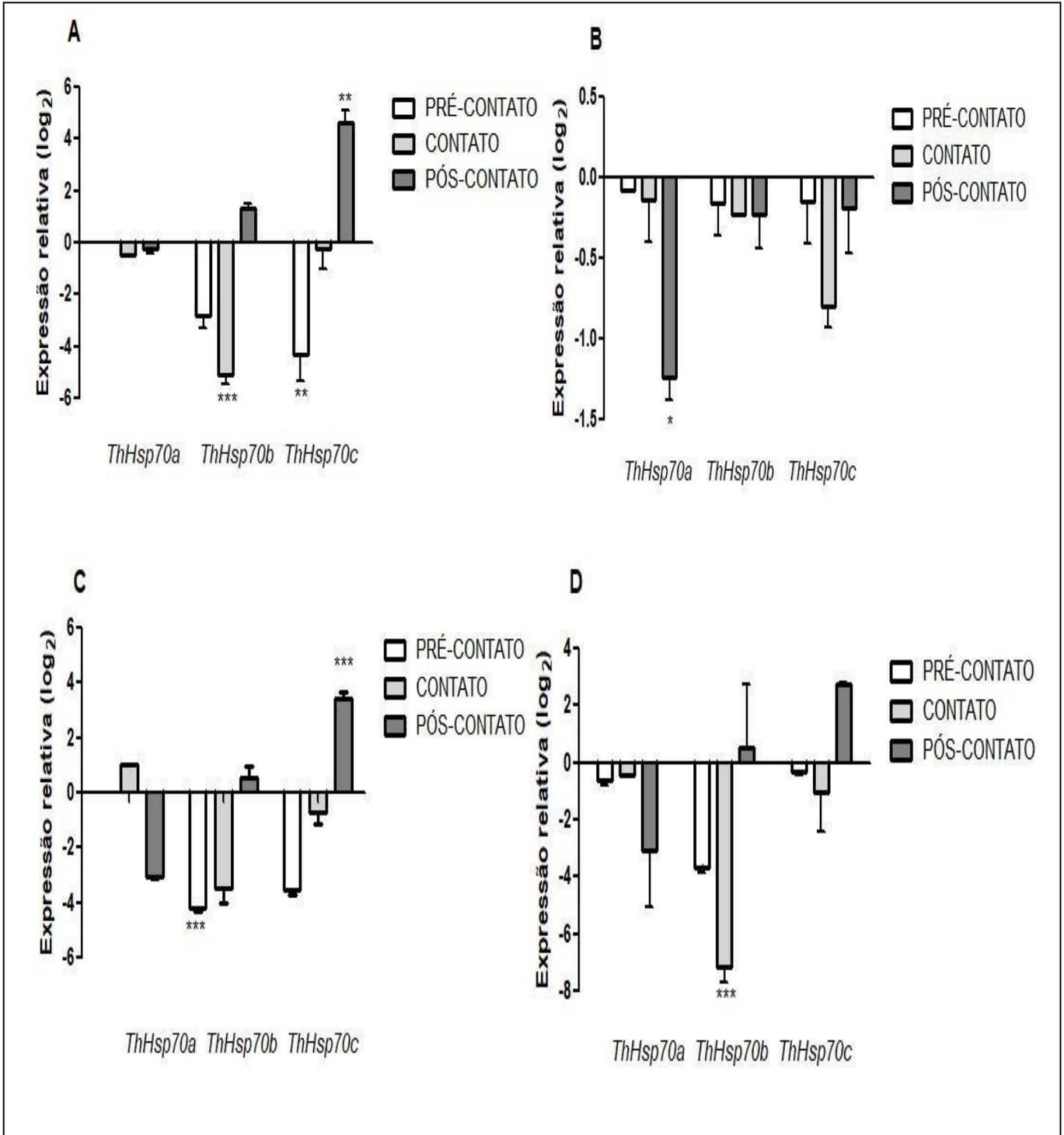


Figura 8 - Análise da expressão relativa de genes *ThHsp70a*, *ThHsp70b* e *ThHsp70c*. (A): ALL x ALL em relação a ALL crescendo sozinho na placa; (B): Δ epi-1 x Δ epi-1 em relação a Δ epi-1 crescendo sozinho na placa; (C): ALL x SS em relação a ALL crescendo sozinho na placa (D): Δ epi-1 x SS em relação a Δ epi-1 crescendo sozinho na placa.

4.2 Estresse Térmico e por Etanol

Para analisar o papel das Hsp durante o stress térmico foram realizados ensaios de crescimento em meio líquido TLE. O micélio de *T. harzianum* (ALL) foi retirado por filtração após crescimento em 48 hrs. Procedeu-se a extração de RNA das amostras e avaliação da expressão dos genes utilizando-se a técnica de qRT-PCR a partir do cDNA sintetizado. Os níveis de expressão dos genes foram calculados de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK e SCHMITTGEN 2001). O experimento foi conduzido com três repetições. Para cada amostra os resultados foram comparados de uma só vez para analisar as diferenças entre as condições relacionadas aos controles usando GraphPad Prism 5.

Para verificar se os genes *ThHsp70a*, *ThHsp70b* e *ThHsp70c* também são regulados por outros tipos de estresse, avaliamos a expressão gênica durante o choque térmico e frio, bem como durante o estresse com etanol. Primeiramente, submetemos o micélio de *T. harzianum* ao estresse térmico por 4 horas a 38 °C. Todos os genes foram induzidos por choque térmico, mostrando os genes *ThHsp70a* e *ThHsp70c* os maiores níveis de mRNA (Figura 10). No entanto, o gene *ThHsp70c* foi o único que apresentou altos níveis de mRNA desde 30 min de tratamento.

Também analisamos o crescimento de *T. harzianum* em outras temperaturas diferentes. Para essas análises, o micélio de *T. harzianum* foi coletado após ser submetido previamente a temperaturas de 4, 10, 32 ou 48 °C por 1 h (Figura 5). Os genes *ThHsp70a* e *ThHsp70b* foram induzidos principalmente em resposta ao choque frio (4 e 10 °C), enquanto o *ThHsp70c* não parece ser significativamente regulado por nenhuma das condições testadas.

Para estresse por etanol, o micélio de *T. harzianum* foi mantido por 1 h na presença de etanol na concentração final de 10%. Curiosamente, os genes *ThHsp70a* e *ThHsp70b* foram significativamente induzidos na presença de etanol. Em conjunto, estes dados demonstram que, embora as proteínas codificadas pelos genes *ThHsp70a*, *ThHsp70b* e *ThHsp70c* tenham sequências de aminoácidos muito semelhantes, apresentam padrões de expressão muito distintos, dependendo do tipo de estímulo.

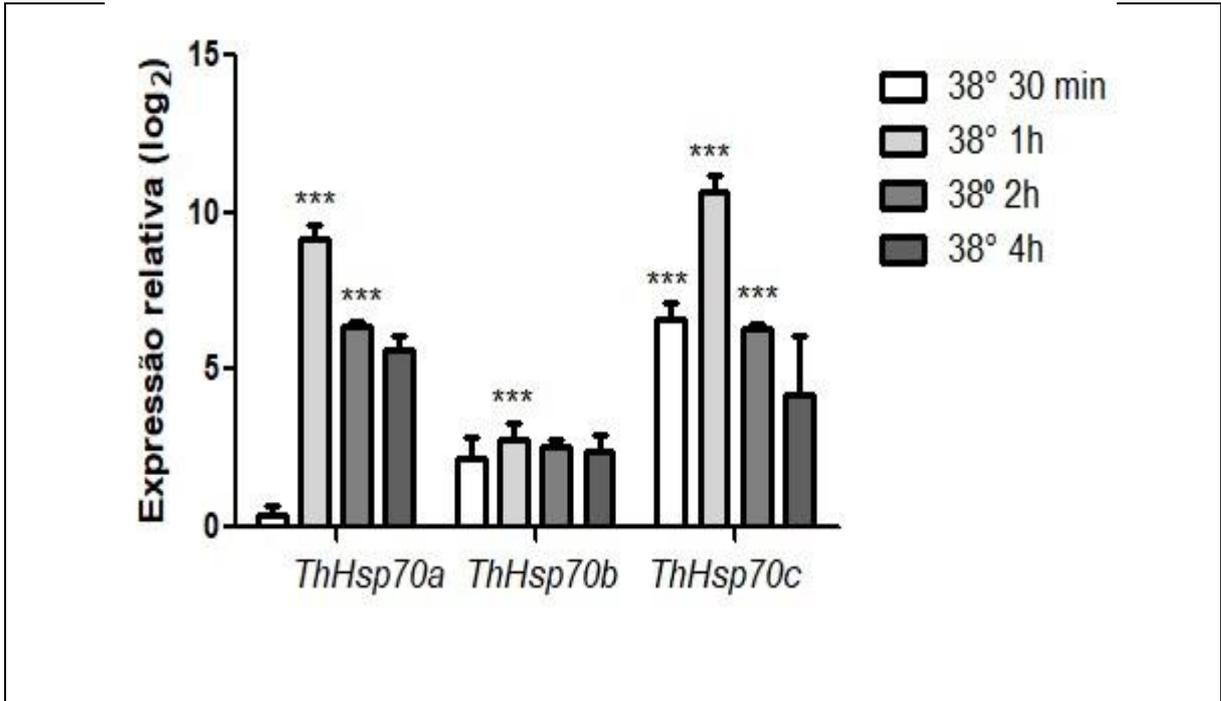


Figura 9 - Expressão gênica relativa (em \log_2) de *ThHsp70a*, *ThHsp70b* e *ThHsp70c* de *T. harzianum* (ALL42) durante estresse térmico, tendo como controle temperatura de 28 °C. Dados apresentam a expressão relativa ao gene actina, como gene referência.

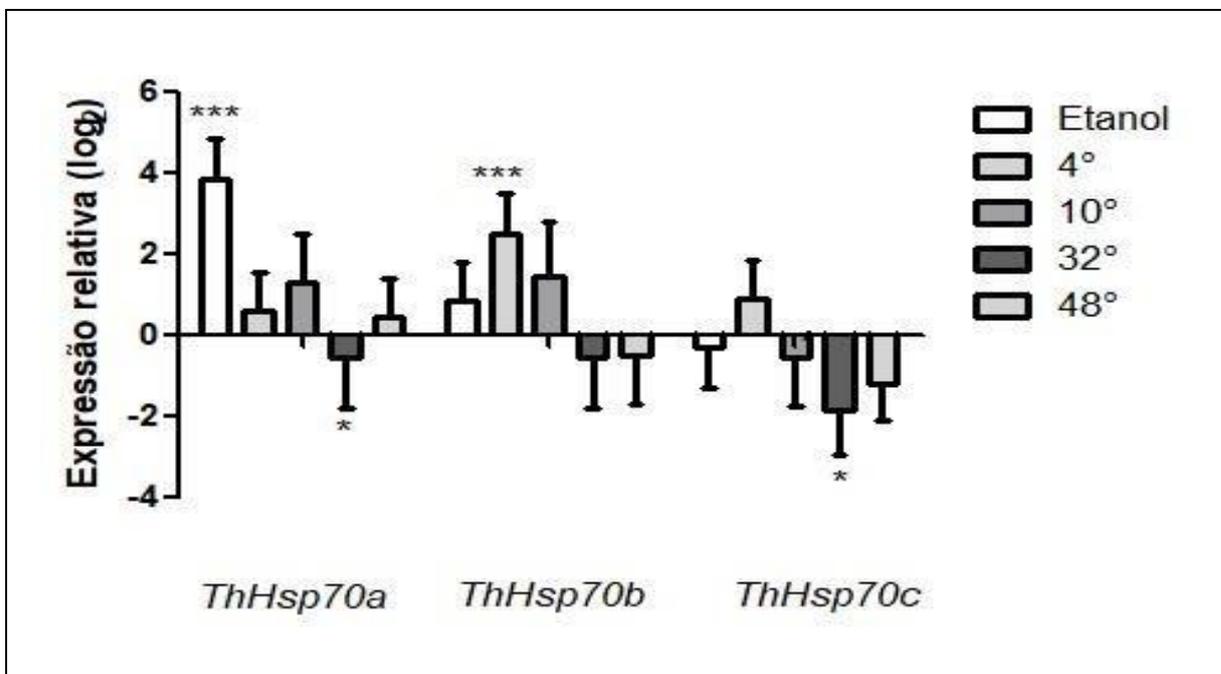


Figura 10 - Expressão gênica relativa (em \log_2) de *ThHsp70a*, *ThHsp70b* e *ThHsp70c* de *T. harzianum* (ALL42) durante tratamentos de estresse térmico e oxidativo tendo como controle a temperatura de 28 °C.

5 DISCUSSÃO

A capacidade do *Trichoderma spp* como antagonista de fungos fitopatogênicos, dentre eles *Rhizoctonia solani* (ALMEIDA *et al.*, 2007) *Macrophomina phaseolina*, (MONTEIRO *et al.*, 2010), *Fusarium oxysporum* já vem sendo relatada por diversos autores, e por este motivo, o emprego de microrganismos antagônicos no controle de pragas se torna de grande importância, sendo uma estratégia de considerável relevância, possibilitando menores riscos ao meio ambiente e à saúde humana (MELO,1998).

Já podem ser encontrados diversos estudos sobre *Trichoderma*, no entanto, muitos outros ainda estão sendo realizados a respeito dos mecanismos de controle biológico realizado pelo fungo e de que maneira ele pode auxiliar, como por exemplo através da expressão de proteínas de choque térmico. As proteínas Hsp foram relacionadas ao micoparasitismo de *Trichoderma* por alguns estudos (Seidl *et al.*, 2009; Steindorff *et al.*, 2012).

Tem sido relatado que as HSPs são induzidas pela exposição de células às condições térmicas e outras condições estressantes abióticas em plantas (Sung *et al.*, 2001), fungos (Montero-Barrientos *et al.*, 2007) e animais (Laayouni *et al.*, 2007). Outros estudos também mostraram que a superexpressão do gene HSP70 em plantas (Cho e Hong, 2006) e fungos (Miersch e Grancharov, 2008) confere tolerância ao calor e outras tensões abióticas.

Apesar de sua alta importância para a manutenção celular, as proteínas Hsp70 ainda são pouco estudadas em *Trichoderma*, incluindo *T. harzianum*. A partir deste estudo foi possível identificar 12 proteínas pertencentes à família Hsp70 de *T. harzianum*. Para comparação, dez membros diferentes da família Hsp70 foram identificados no genoma de *T. reesei*, enquanto o genoma de *T. atroviridae* compreende 13 genes desta família, e mesmo em *T. virens* 15 homólogos podem ser encontrados (SCHMOLL *et al.*, 2016). Fungos de filo filogeneticamente distantes, como Blastocladiomycota, também apresentam alto número de membros da família Hsp70 (GEORG e GOMES, 2007), indicando que a duplicação do gene *Hsp70* ocorreu precocemente no processo evolutivo dos fungos.

Em eucariotos, as proteínas Hsp70 são encontradas em todos os principais compartimentos da célula, geralmente representadas por múltiplos homólogos das

Hsp70, com funções celulares distintas (CRAIG et al., 1994). De fato, dos 12 genes que codificam as proteínas Hsp70 em *T. harzianum*, oito são citoplasmáticos, dois do retículo endoplasmático e dois da mitocôndria. Destes, três foram escolhidos para análise de expressão gênica, sendo um citoplasmático (*ThHsp70a*), um de retículo endoplasmático (*ThHsp70b*) e um mitocondrial (*ThHsp70c*).

Neste estudo, analisamos os perfis de expressão dos genes *ThHsp70a*, *ThHsp70b* e *ThHsp70c* de *T. harzianum* durante o micoparasitismo, estresse térmico e por etanol, além do perfil de expressão do mutante $\Delta epl-1$ de *T. harzianum* durante o micoparasitismo. *T. harzianum* foi escolhido como fungo de estudo, por apresentar elevada eficácia no controle biológico contra fitopatógenos, dentre eles *S. sclerotiorum*. Sendo assim, foi realizado confronto de *T. harzianum* e *T. harzianum* $\Delta epl-1$ contra o fitopatógeno *S. Sclerotiorum*, em placa contendo meio MYG. A eficiência conferida a *T. harzianum* contra fitopatógenos, é devida a expressão das proteínas de choque térmico (Hsp). Por este motivo, avaliamos a expressão destas em situações de pré-contato, contato e pós-contato com *S. sclerotiorum*, visto que, as ocorrências nestas fases são significativamente importantes.

Para melhor compreender o papel das proteínas Hsp70 durante o processo de auto-reconhecimento de *T. harzianum* e durante o micoparasitismo, bem como seu papel na resposta ao estresse, analisamos a expressão dos genes *ThHsp70* sob essas condições. Nossos dados sugerem que o mecanismo de auto-reconhecimento de *T. harzianum* é importante para a ativação da expressão do gene *ThHsp70b* e *ThHsp70c*, uma vez que os mesmos foram induzidos após contato entre as hifas de *T. harzianum*, sendo o gene *ThHsp70c* altamente induzido. Esse resultado é reforçado pelo fato de não termos detectado tal indução durante o contato entre as hifas de *T. harzianum* $\Delta epl-1$. A proteína Epl-1 está envolvida na interação entre *T. harzianum* e si mesmo e entre *T. harzianum* e o fitopatógeno, a ausência da proteína Epl-1 afeta a expressão de genes de micoparasitismo em ensaios de confronto direto contra *S. sclerotiorum* e *T. harzianum* com ele próprio (GOMES et al, 2015). Este mesmo comportamento foi observado para os genes *ThHsp70* analisados neste estudo. Assim, a ausência de indução dos genes *ThHsp70* no mutante $\Delta epl-1$ indica que sua expressão também é regulada pelo processo de auto-reconhecimento de *T. harzianum*.

Além disso, a expressão dos genes *ThHsp70a*, *ThHsp70b* e *ThHsp70c* parece ser importante para a interação com o hospedeiro, uma vez que também foi induzida durante o micoparasitismo de *T. harzianum* contra *S. sclerotiorum*, sendo os genes *ThHsp70b* e *ThHsp70c* induzidos durante o pós-contato enquanto o gene *ThHsp70a* foi induzido durante o contato. Ainda, a alta indução do gene *ThHsp70c* durante o póscontato entre o mutante $\Delta epl-1$ e *S. sclerotiorum* indica que a interação de *T. harzianum* com a hifa do fitopatógeno foi capaz de regular positivamente o gene *ThHsp70c* mesmo na ausência da proteína Epl-1. De fato, observou-se que o mutante $\Delta epl-1$ mantém a capacidade de antagonizar patógenos de plantas, sendo eficiente contra *S. sclerotiorum* (GOMES et al., 2015).

Várias espécies de *Trichoderma* já foram isoladas das mais diferentes regiões climáticas, confirmando sua plasticidade e capacidade de crescimento nos mais variados ambientes (HERMOSA et al., 2004). Todos os organismos respondem a temperaturas extremas e outros estresses alterando seus mecanismos de transcrição e tradução para ativar a síntese de HSPs (LINDQUIST e CRAIG, 1988). As HSPs atuam como chaperonas moleculares na manutenção da homeostasia, reativação e degradação de proteínas danificadas (PARSELL e LINDQUIST, 1993), e aquisição de termotolerância (SUNG et al., 2003; MONTERO-BARRIENTOS et al., 2007). Os genes *ThHsp70a*, *ThHsp70b* e *ThHsp70c* de *T. harzianum* foram regulados positivamente pelo choque térmico, sendo *ThHsp70c* o mais induzido. A importância das proteínas Hsp no estresse térmico é bem documentada, embora nem todas as Hsp sejam induzidas por altas temperaturas. Por exemplo, o fungo aquático *Blastocladiella emersonii* possui dez genes Hsp70 e apenas sete deles são significativamente induzidos por choque térmico (GEORG e GOMES, 2007).

Vários fatores que podem interferir no desempenho do *Trichoderma* como agente de biocontrole e entre eles são a baixa temperatura (KREDICS et al. 2003). De fato, quando 360 isolados de *Trichoderma* spp. foram avaliados em relação à tolerância ao estresse pelo frio apenas 14 cresceram bem a 5 ° C, correspondendo às espécies *T. aureoviride*, *T. harzianum* e *T. viridae* (ANTAL et al., 2000). Embora as Hsp sejam mais induzidas em resposta ao estresse térmico, sua indução também pode ser vista em resposta ao estresse pelo frio (MONTERO-BARRIENTOS et al, 2007). A tolerância de *T. harzianum* a baixas temperaturas pode ser devida à indução de HSPs. De fato, observamos que todos os genes analisados foram induzidos por

baixas temperaturas, sendo *ThHsp70a* o mais induzido em resposta ao estresse por frio a 10 °C e *ThHsp70b* e *ThHsp70c* a 4 °C.

Quando microrganismos são colocados em contato com o etanol, pode levar à produção de espécies reativas de oxigênio e, depois, ao estresse oxidativo (LIU et al., 2013). O etanol tem forte impacto sobre os comportamentos celulares e processos metabólicos relacionados à apoptose, incluindo alterações no fluxo de membrana, estrutura protéica, respostas ao estresse e apoptose (KITAGAKI et al., 2007; VANORST et al., 2006). Sabe-se também que altas concentrações de etanol causam danos nas bicamadas fosfolipídicas e também nas proteínas (KITAGAKI et al., 2007). Como o etanol tem um forte impacto na estrutura da proteína, deve-se exigir que as proteínas Hsp respondam adequadamente a esse tipo de estresse. Assim, avaliamos a expressão dos genes *ThHsp70a*, *ThHsp70b* e *ThHsp70c* durante o estresse com etanol. Detectamos alta indução do gene *ThHsp70a* em resposta ao tratamento com etanol, sendo o gene *ThHsp70b* também induzido mesmo em níveis mais baixos. Curiosamente, o gene *ThHsp70c*, que foi o que apresentou as maiores induções durante o auto-reconhecimento de *T. harzianum*, no micoparasitismo e estresse térmico, foi reprimido pelo estresse com etanol.

CONCLUSÃO

O alinhamento entre as proteínas ThHsp70a, ThHsp70b e ThHsp70c de *T. harzianum* demonstrou que elas são conservadas entre si, uma característica das proteínas da família Hsp70.

Os genes *ThHsp70b* e *ThHsp70c* são induzidos após o contato entre as hifas de *T. harzianum*, mas reprimidos no mutante $\Delta epl-1$ crescido nas mesmas condições, indicando que esses genes são regulados pelo processo de autoreconhecimento de *T. harzianum*.

Os genes *ThHsp70b* e *ThHsp70c* são induzidos tanto após o contato entre as hifas de *T. harzianum* e *S. sclerotiorum* quanto após o contato das hifas do mutante $\Delta epl-1$ e *S. sclerotiorum*, indicando que o contato com fitopatógeno regula positivamente a expressão desses genes.

Os genes *ThHsp70a*, *ThHsp70b* e *ThHsp70c* foram induzidos pelo choque térmico, embora em níveis e momentos diferentes.

O gene *ThHsp70a* foi o mais induzido em resposta ao estresse por frio a 10 °C enquanto que os genes *ThHsp70b* e *ThHsp70c* foram mais induzidos a 4 °C.

O gene *ThHsp70a* foi significativamente induzido por etanol, indicando um papel importante na resposta ao estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, M.T.; ALI, N.Y.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop protection**. v.27, p.1354-1359, 2008.

ALMEIDA, F. B. D. R.; CERQUEIRA, F. M.; SILVA, R. D. N.; ULHOA, C. J.; LIMA, A. L. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: Evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 8, p. 1189–1193, 2007.

ALTOMARE C, NORVELLI WA, BJORKMAN T, HARMAN GE. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus

Trichoderma harzianum. Rifai 1295–22. **Appl. Environ. Microbiol.** 65:2926–33, 1999.

ANTAL Z, MANCZINGER L, SZAKACS Z, TENGEDY RP, FERENCZY L. Colony growth, in vitro antagonism and secretion of extracellular enzymes in cold-tolerant strains of *Trichoderma* species. *Mycological Research* 2000; 104(5): 545–549

ASAD, Saeed Ahmad et al. Biocontrol efficacy of different isolates of *Trichoderma* against soil borne pathogen *Rhizoctonia solani*. **Polish Journal of Microbiology**, v.63, n.1, p.95-103, 2014.

AUESUKAREE, C.; KOEDRITH, P.; SAENPAYAVAI, P.; ASVARAK, T.; BENJAPHOKEE, S.; SUGIYAMA, M.; KANEKO, Y.; HARASHIMA, S.; BOONCHIRD, C. Characterization and gene expression profiles of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* isolates from Thai fruits. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 2, p. 144–149, 2012.

BATISTA, K.A., FERNANDES, K.F., SILVA, B.D.S., ULHOA, C.J., YAMASHITA, F., Potential fungal inhibition by immobilized hydrolytic enzymes from *Trichoderma asperellum*. **Journal of agricultural and food chemistry**. v.59. p.8148-8154. 2011.

BELL, D. K., WELLS, H. D. & MARKHAM, C. R. In Vitro Antagonism of *Trichoderma* species Against Six Fungal Plant Pathogens. **Am. Phytopathol. Soc.** 72, 379–382, 1982.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. p. 249–260, 2004.

BETTIOL, W., MORANDI, M.A.B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2009.

BŁASZCZYK, L.; SIWULSKI, M.; SOBIERALSKI, K.; LISIECKA, J.; JEŃDRYCZKA, M. *Trichoderma* spp. – application and prospects for use in organic farming and industry. **Journal of Plant Protection Research**, v. 54, n. 4, 2014.

BLEOANCA, I.; SILVA, A.R.C.; PIMENTEL, C.; POUSADA, C. R.; MENEZES, R. A. Relationship between ethanol and oxidative stress in laboratory and brewing yeast strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 116, p. 697-705, 2013.

BIJLSMA, R. & LOESCHCKE, V. Environmental Stress, Adaptation and Evolution. **J. EVOL. BIOL.**, v. 18, 2005.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B.P.H.J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen, **Mol. Plant Path.**, v. 7, 1–16, 2006.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Can. J. Plant Pathol.* 16, 93–108, 1994.

CARSOLIO, C.; GUTIÉRREZ, A.; JIMÉNEZ, B. & VAN MONTAGU, M. & HERRERAESTRELLA, A. Characterization of ech-42, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 91, 10903– 10907, 1994.

CHAKRABORTY, S.; NEWTON, A. C. Climate change, plant diseases and food security: An overview. **Plant Pathology**, v. 60, n. 1, p. 2–14, 2011.

CHET, I., HARMAN, G. E., BAKER, R. *Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. **Microbial Ecology**. 7: 29-38, 1988.

CHET, I.; BENHAMOU, N.; HARAN, S. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: *Trichoderma* and *Gliocladium* – enzymes, biological control and commercial applications (Harman, G.E.; Kubicek, C.P., eds). **London, Taylor & Francis**, v. 2, p. 153-72, 1998.

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

DAUGAARD, M.; ROHDE, M.; JÄÄTTELÄ, M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. **FEBS lett.** Amsterdam, v. 581, n. 9, p. 3702-3710, 2007.

DAVID, N.K., ANTHONY, J.M., ROBERT, E.F. Effect of stress on the immune system. **Immunol.** v. 11, 170–175, 1990.

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

DOĞAN, A.; DEMIRCI, S.; AYTEKIN, A. O.; ŞAHIN, F. Improvements of tolerance to stress conditions by genetic engineering in *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.174, p.28–42, 2014.

EILENBERG H, PNINI-COHEN S, SCHUSTER S, MOVTCAN A, ZILBERSTEIN A. Isolation and characterization of chitinase genes from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. **J Exp Bot.**;57(11):2775-84, 2006.

ELAD, Y., BARAK, R., CHET, I. Possible Roles of Lectins in Mycoparasitism. **Journal of Bacteriology**. 154 (3): 1431-1435, 1983.

FERREIRA, A. S. et al. Crescimento micelial e síntese de proteínas de choque térmico em três isolados de fungos ectomicorrízicos sob condições de temperaturas supraótimas. **R. Bras. Ci. Solo.** p. 29-38, 2007.

FRIGHETTO, R.T.S. Influência do manejo de agrotóxicos no meio ambiente. **Fitopatologia brasileira.**v.25:p.271-274, 2000.

GOMES, E.V. et al. The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self cell wall protection. **Scientific Reports**.v. 5, 2015.

GÖRGEN, C. A. et al. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.12, p.1593-1590, 2009.

GRIME, J.P. Plant Strategies and Vegetation Processes. **JOHN WILEY**, Chichester, 1979.

HERMOSA R, VITERBO A, CHET I, MONTE E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**;158(1):17-25, 2012.

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

HOFFMANN, A.A. & PARSONS, P.A. Evolutionary Genetics and Environmental Stress. **Oxford University Press**, New York, 1991.

HONG, M. F.; LEE, K-S.; YUB, B. J.; SUNGA, Y-J.; PARK, S. M.; KOO, H. M.; KWEONA, H-D.; PARK, J. C.; JINC, Y-S. Identification of gene targets eliciting improved alcohol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* through inverse metabolic engineering. **Journal of Biotechnology**, v. 149, p. 52–59, 2010.

HOROWITZ, M.; ROBINSON, S. D. M. Heat shock proteins and the heat shock response during hyperthermia and its modulation by altered physiological conditions. **Prog. brain res.**, Amsterdam, v. 162, p. 433- 446, 2007.

HWANG, Y. S.; KO, M. H.; KIM, Y. M.; PARK, Y. H.; ONO, T. The avian-specific small heat shock protein HSP25 is a constitutive protector against environmental stresses during blastoderm dormancy. **Nature Publishing Group**, n. October, p. 1–12, 2016.

KHALILI, Elham et al. Biological control of rice brown spot with natives isolates of three *Trichoderma* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.1, p.297-305, 2012.

KITAGAKI, H. et al. Ethanol-induced death in yeast exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway. **FEBS letters**, v. 581, n. 16, p. 2935–42, 26 jun., 2007.

LEITE, R.M.V.B.C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. Londrina: **EMBRAPA Soja**, 3p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 76), 2005.

LEVITT, J. CHILLING, freezing and high temperature stresses. In: Responses of plants to environmental stresses. 2.ed. New York, **Academic Press**. p.421-447, 1980.

- LIMA, A. L. Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de *Trichoderma* spp. isoladas de solo do cerrado brasileiro. **Tese. Universidade Federal de Goiás, Goiânia**, 2002.
- LINDSEY DL, BAKER R. Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions. **Phytopathology** 57:1262–63, 1967.
- LINK, H.; JOHNSON, K. B. White Mold. **The Plant Health Instructor**, 2007.
- LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T) Method. **Methods**. 25(4):4028, 2001
- LO, C.-T.; NELSON, E. B.; HARTMAN, G. E. Improved biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* 1295-22 for foliar phases of turf disease by use of spray applications. **Plant Disease**, v. 81, n. 10, p. 1132–1138, 1997.
- LOPES, F. A. C.; STEINDORFF, A. S.; GERALDINE, A. M.; BRANDÃO, R. S.; MONTEIRO, V. N.; JÚNIOR, M. L.; COELHO, A. S. G.; ULHOA, C. J.; SILVA, R. N. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology**, v. 116, n. 7, p. 815–824, 2012.
- LORITO, M., WOO, S.L., HARMAN, G.E., MONTE, E. Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. **Annual Reviews of Phytopathology**.v.8 (48):p.395-417, 2010
- MA, H. X. et al. Occurrence and Characterization of Dimethachlon Insensitivity in *Sclerotinia sclerotiorum* in Jiangsu Province of China. **Plant Disease**, v. 93, n. 1, p. 36–42, 2009.
- MAYER, M.P.; BAKU, B.Hsp70 Chaperones: Cellular functions and molecular mechanism, **Cellular and Molecular Life Sciences** v. 62, p. 670-684, 2005.
- MCBEALTH, J, & ADELMAN, M. Taxonomy of a new *Trichoderma* found in Alaska. **Abstract Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 10, p. 1151, 1991.
- MEYER, T. N.; SILVA, a. L. Da. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 181–188, 1999.
- MINOWADA G, WELCH WI. Clinical implications of the stress response. **J Clin Invest**; 95:3-12, 1995.
- MONTEIRO, V. N.; DO NASCIMENTO SILVA, R.; STEINDORFF, A. S.; COSTA, F. T.; NORONHA, E. F.; RICART, C. A. O.; DE SOUSA, M. V.; VAINSTEIN, M. H.;
- ULHOA, C. J. New Insights in *Trichoderma harzianum* Antagonism of Fungal Plant Pathogens by Secreted Protein Analysis. **Current Microbiology**, p. 1–8, 2010.

MONTEIRO, V. N. et al. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. **Curr Microbiol**, v. 61, n. 4, p. 298-305, Oct 2010.

MONTERO-BARRIENTOS, M.; HERMOSA, R.; CARDOZA, R. E.; GUTIÉRREZ, S.; NICOLÁS, C.; MONTE, E. Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum* hsp70 gene increases Arabidopsis resistance to heat and other abiotic stresses. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 8, p. 659–665, 2010.

MONTERO-BARRIENTOS, M.; HERMOSA, R.; NICOLÁS, C.; CARDOZA, R. E.; GUTIÉRREZ, S.; MONTE, E. Overexpression of a *Trichoderma* HSP70 gene increases fungal resistance to heat and other abiotic stresses. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 11, p. 1506–1513, 2008.

MONTERO-BARRIENTOS M, CARDOZA RE, GUTIÉRREZ S, MONTE E, HERMOSA R. The heterologous overexpression of hsp23, a small heat-shock protein gene from *Trichoderma virens*, confers thermotolerance to *T. harzianum*. **Curr. Genet**; 52: 45–53, 2007.

MONZO C., HAOUZI D., ROMAN K., ASSOUS S., DECHAUD H., HAMAMAH S. Slow freezing and vitrification differentially modify the gene expression profile of human metaphase II oocytes. **Human Reproduction**. 27(7): 2160-2168, 2012.

MORADI, M. A. B.; BETTIOL, W.; GHINI, R. Situação do Controle Biológico de doenças de plantas no Brasil. **Controle Alternativo de Pragas e Doenças**. Viçosa, p. 247-268, 2005.

MOSSER D D., CARON A W., BOURGET L., DENISLAROSE C., Massie B. Role of the human heat shock protein HSP70 in protection against stressinduces apoptosis. **Molecular and Celular Biology**.17: 5317-5327, 1997.

MUTHUKUMAR, A. et al. Exploitation of *Trichoderma* species on the growth of *Pythium aphanidermatum* in Chili. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p.1598-1607, 2011.

NICOLÁS, C.; HERMOSA, R.; RUBIO, B.; MUKHERJEE, P. K.; MONTE, E. *Trichoderma* genes in plants for stress tolerance- status and prospects. **Plant Science**, v. 228, p. 71–78, 2014.

PASCHOS, T.; XIROS, C.; CHRISTAKOPOULOS, P. Ethanol effect on metabolic activity of the ethalogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **BMC Biotechnology**, v.15, p.1-12, 2015.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in biotechnology**, v.21 , p. 400-407, 2003.

- QUEITSCH, C., SANGSTER, T.A. & LINDQUIST, S. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. **Nature**, 417, 618–624, 2002.
- RICCI, M.; AGGRAVI, M.; BONECHI, C.; MARTINI, S.; ALOISI, A.M.; ROSSI, C. Metabolic response to exogenous ethanol in yeast: An in vivo statistical total correlation NMR spectroscopy approach. **Journal Bioscience**, v. 37, p. 749–755, 2012.
- RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, 18, 571–573, 1962.
- ROSALES, A.G. Stress syndrome in birds. **J. Appl. Poult. Res.** 3, 199–203, 1994.
- ROMERO-ARENAS, O.; HUERTA LARA, M.; HUATO, D.; ANGEL, M.; DOMÍNGUEZ HERNÁNDEZ, F.; ARELLANO VICTORIA, D. A. Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. **Revista colombiana de Biotecnología**, v. 11, n. 2, p. 143–151, 2009.
- RUTHERFORD, S.L. & LINDQUIST, S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. **Nature**, 396, 336, 1998.
- RUTHERFORD, S.L. Between genotype and phenotype: Protein chaperones and evolvability. **Nat. Rev. Genet.**, 4, 263–274, 2003.
- SAMUELS, GJ. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 195–20, mar, 2006.
- SELYE, H. The Stress of Life. **McGraw-Hill**, New York, 1956.
- SIBLY, R.M. & CALOW, P. A life-cycle theory of responses to stress. **Biol. J. Linnean Soc.**, 37, 101–116, 1989.
- SIMON M M., REIKERSTORFER A., SCHWARZ A., KRONE C., LUGER T A. Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. **The Journal of Clinical Investigation**. 95(3): 926- 933, 1995.
- SOMERO G N. Protein and temperature. **Annual Review Physiology**. 57: 43-68, 1995
- SORENSEN, J.G., DAHLGAARD, J. & LOESCHCKE, V. Genetic variation in thermal tolerance among natural populations of *Drosophila buzzatii*: down regulation of Hsp70 expression and variation in heat stress resistance traits. **Funct. Ecol.**, 15, 289–296, 2001.
- STEINDORFF AS, SILVA RN, COELHO ASG, NAGATA T, NORONHA EF, ULHOA CJ. *Trichoderma harzianum* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in mycoparasitism against *Fusarium solani*. **Biological Control**; 61(2): 134-140, 2012.

STINSHOFF H, BRÜNING K, HANSTEDT A, MÜLLER D, WILKENING S, WRENZYCKI C. Effect of different cryopreservation methods on the quality of in vitro produced bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*; 22(1): 217-217, 2009.

TARUTHUM B, SAIKHUN K, SANGSUWAN P, KITIYANANT Y. Effects of vitrification on nuclear maturation, ultrastructural changes and gene expression of canine oocytes. *Reproductive Biology and Endocrinology*; 8:70, 2010.

TIRELLI M, BASINI G, GRASSELLI F, BIANCO F, TAMANINI C. Cryopreservation of pig granulosa cells: effect of FSH addition to freezing medium. *Domestic Animal Endocrinology*; 28(1) 17-33, 2005.

TISSIÉRES, A., MITCHELL, H.K. & TRACY, U.M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.*, 84, 389–398, 1974.

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

TROIAN, R. F.; STEINDORFF, A. S.; RAMADA, M. H. S.; ARRUDA, W.; ULHOA, C. J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: Evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 10, p. 2095–2101, 2014.

VAN VOORST, F. et al. Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress. **Yeast (Chichester, England)**, v. 23, n. 5, p. 351–9, 15 abr. 2006.

VIERLING, E. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 579–620, 1991.

VIEIRA, P. M.; COELHO, A. S. G.; STEINDORFF, A. S.; DE SIQUEIRA, S. J. L.; SILVA, R. D. N.; ULHOA, C. J. Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma harzianum* during growth on cell wall of *Fusarium solani* as a tool for biotechnological application. **BMC genomics**, v. 14, p. 177, 2013.

VIERLING, E. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*; 42: 579–620, 1991.

VINALE F, SIVASITHAMPARAM K, GHISALBERTI EL, MARRA R, BARBETTI MJ, et al. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 72:80–86, 2008.

ZHANG T, TANG J, SUN J, YU C, LIU Z, CHEN J. Hex1-related transcriptome of *Trichoderma atroviride* reveals expression patterns of ABC transporters associated with tolerance to dichlorvos. **Biotechnol Lett**; 37(7): 1421-9, 2015.

WANG, W. et al. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 5, p. 244–252, 2004

WANG, M.; ZHAO, J.; YANG, Z.; DUD, Z.; YANG, Z. Electrochemical insights into the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioelectrochemistry**, v. 71, p. 107–112, 2007.

WEEDEN, CR; SHELTON, AM; HOFFMAN, MP. Biological control: a guide to natural enemies in North America, **Hortic. bras.**, v. 26, n. 2 2008.

WILLETS, H.J. & J.A.L. WONG. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. **Botanical Review**, 46 (2): 102-165, 1980.

WOO, S. L.; SCALA, F.; RUOCCO, M.; LORITO, M. The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma* spp ., **Phytopathogenic Fungi , and Plants**. v. 96, n. 2, p. 181–185, 2006.

YOUNG, J. C.; MOAREFI, I.; ULRICH HARTL, F. Hsp90: A specialized but essential protein-folding tool. **Journal of Cell Biology**, v. 154, n. 2, p. 267–273, 2001.

ANEXOS

Tabela 6 - Quantificação e avaliação do grau de pureza do RNA total medidos por espectrofotometria em comprimento de onda de 260/280 e 260/230 nm. As amostras correspondem aos experimentos de confronto nos momentos de pré-contato, contato e póscontato. ALL = *T. harzianum* (ALL42), SS = *S. sclerotiorum*.

Quantificação e avaliação do grau de pureza do RNA total			
Amostra	Concentração (µg/µL)	260/280	260/230
ALL x ALL Pré-contato (1)	0,46	2,05	1,37
ALL x ALL Contato (1)	1,30	2,18	1,30
ALL x ALL Pós-contato (1)	1,48	2,18	1,24
ALL x SS Pré-contato (1)	0,57	2,17	1,38
ALL x SS Contato (2)	2,03	2,01	0,71
ALL x SS Pós-contato (2)	1,33	1,98	0,61
ALL x ALL Pré-contato (2)	2,69	2,06	1,01
ALL x ALL Contato (2)	2,48	2,07	1,19
ALL x ALL Pós-contato (2)	6,41	2,16	1,60
ALL x SS Pré-contato (2)	4,83	2,20	1,69
ALL x SS Contato (2)	4,31	2,20	1,63
ALL x SS Pós-contato (2)	4,43	2,20	1,11
ALL x ALL Pré-contato (3)	1,65	2,18	1,40
ALL x ALL Contato (3)	2,52	2,06	0,73
ALL x ALL Pós-contato (3)	1,84	2,08	0,73
ALL x SS Pré-contato (3)	1,89	2,20	1,27
ALL x SS Contato (3)	2,87	1,94	0,72
ALL x SS Pós-contato (3)	1,01	1,96	0,75

