

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E
BIOLÓGICAS

REGISTRO DE OCORRÊNCIA DE *Aspergillus brevijanus* e TAXONOMIA E
POTENCIAL DE BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS DE NOVAS ESPÉCIES DE
Trichoderma

TAINÁ DELMONDES SANTOS DA CONCEIÇÃO

CRUZ DAS ALMAS
BAHIA - BRASIL
2023

TAINÁ DELMONDES SANTOS DA CONCEIÇÃO

REGISTRO DE OCORRÊNCIA DE *Aspergillus brevijanus* e TAXONOMIA E
POTENCIAL DE BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS DE NOVAS ESPÉCIES DE
Trichoderma

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal
do Recôncavo da Bahia, como parte
das exigências do Curso de
Graduação de Bacharelado em
Biologia, para obtenção do título de
Bacharel em Biologia.

Orientador: Phellippe Arthur Santos
Marbach


CRUZ DAS ALMAS
BAHIA - BRASIL
2023

TERMO DE APROVAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO


Tainá Delmondes Santos da Conceição

REGISTRO DE OCORRÊNCIA DE *Aspergillus brevijanans* E
TAXONOMIA E POTENCIAL PARA O BIOCONTROLE DE
FITOPATÓGENOS DE NOVAS ESPÉCIES DE *Trichoderma*


BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 PHELLIPPE ARTHUR SANTOS MARBACH
Data: 03/06/2023 12:00:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Phellippe Arthur Santos Marbach
orientador
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

Documento assinado digitalmente
 PATRICIA LUZ RIBEIRO
Data: 04/06/2023 14:33:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dr. Patrícia Luz Ribeiro
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

Documento assinado digitalmente
 JORGE TEODORO DE SOUZA
Data: 05/06/2023 07:32:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza
Universidade Federal de Lavras (UFLA)

CRUZ DAS ALMAS

Junho-2023

*Dedico esse trabalho aos meus pais e meus irmãos,
sem o amor e o apoio de vocês, eu nada seria.*

AGRADECIMENTOS

Aos melhores pais do mundo, José e Semírames, vocês são meu porto seguro, sempre apoiaram minhas decisões e incentivaram meus estudos. Nunca me deixaram faltar nada, vocês são mais do que eu poderia merecer, exemplos de humildade, honestidade e força. Obrigada por todo amor, carinho e educação!

A minha irmã Taís, minha melhor amiga, meu presente mais valioso, meu tudo. Se existissem várias vidas, sei que seríamos irmãs em todas!! Obrigada por estar presente nos melhores momentos, e por me consolar nos piores. Eu te amo!

Ao meu irmão Tiago, por todo apoio e vivência, por compartilhar momentos e estar ao meu lado desde pequena, obrigada por todo carinho e ajuda.

Ao meu doguinho, Zeca, por ser companheiro e me alegrar nos momentos triste. Eu morro de saudade.

Aos meus amigos de faculdade: Tailane, Victor, Lara, Silas, Rafaela, Iasmin, por tornarem os estudos mais leves e por compartilharem momentos de descontração. Obrigada por dividerem os sufocos e somarem as risadas.

Aos meus tios, Ana Paula e Pedro, por me acolherem e me ajudarem nos momentos em que precisei, e aos meus primos Luiz, João e Arthur pela convivência.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Evolutiva (LABEV): Matheus, Lenon, Gabriel, Carol e Adriana por dividirem o trabalho e torná-lo mais agradável durante a trajetória. Obrigada também aos ex-integrantes Cristiane, Harrison e Lucas pelos ensinamentos, aprendi muito com vocês!

Ao meu orientador Phellippe pelos conselhos, por incentivar e acreditar no meu potencial. Obrigada pelos ensinamentos, dedicação e paciência.

A todos os professores que contribuíram para minha formação.

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

A CNPq e FAPESB pelo apoio financeiro nas pesquisas.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação acadêmica, Muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Árvore filogenética das espécies de *Trichoderma* pelo método de máxima verossimilhança baseado no alinhamento múltiplo combinado das sequências de nucleotídeos dos genes *tef1* e *rpb2*. *Trichoderma brunneoviride* CBS 121130 foi usado como grupo externo. Foram usadas apenas sequências de nucleotídeos dos tipos das espécies..... 31
- Figura 2.** *Trichoderma* sp. MON24. Culturas em 7d a 25 °C: BDA (A); SNA (B); CMD (C). Estruturas microscópicas em BDA a 25 °C (D – H). Conídios (D); conidióforos e fialides (E, F); clamidósporos: intercalar (G) e terminal (H). Barra de escala = 10 µm..... 33
- Figura 3.** Árvore filogenética das espécies de *Aspergillus* pelo método de máxima verossimilhança baseado no alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos dos genes *benA*, *rpb2* e *CaM*. *Aspergillus niger* NRRL 326 foi usado como grupo externo. Foram usadas apenas sequências de nucleotídeos dos tipos das espécies..... 36
- Figura 4.** *Aspergillus* sp. AMSO53 culturas em 14d a 25 °C: CYA verso (A), reverso (B); MEA verso (C), reverso (D) CREA (E); AO (F). Conídios (G). Conidióforos (H – K). Barra de escala = 10 µm..... 38
- Figura 5.** Ensaio de cultura pareada. Controles: *A. welwitschiae* (A) e *M. pernicioso* (E). Tratamentos: *Trichoderma* sp. nov. MTS17C contra *A. welwitschiae* (B) e *M. pernicioso* (F); *Trichoderma* sp. nov. 49 contra *A. welwitschiae* (C) e *M. pernicioso* (G); *Trichoderma* sp. nov. MTS29 contra *A. welwitschiae* (D) e *M. pernicioso* (H).... 52
- Figura 6.** Ensaios de cultura pareada. Controle: fitopatógeno crescendo na ausência do agente de biocontrole. Tratamento: fitopatógeno crescendo na presença do agente de biocontrole. *Trichoderma* sp. nov. MTS17C (A); *Trichoderma* sp. nov. 49 (B); *Trichoderma* sp. nov. MTS29 (C)..... 53
- Figura 7.** Atividade de compostos voláteis contra *A. welwitschiae* e *M. pernicioso*. Controle: fitopatógeno crescendo na ausência dos voláteis do agente de biocontrole; Tratamento BDA: fitopatógeno crescendo na presença dos voláteis do agente de biocontrole em meio BDA; Tratamento MEA: fitopatógeno crescendo na presença dos voláteis do agente de biocontrole em meio MEA. *Trichoderma* sp. nov. MTS17C contra *A. welwitschiae* (A). *Trichoderma* sp. nov. MTS17C contra *M. pernicioso* (B). *Trichoderma* sp. nov. 49 contra *A. welwitschiae* (C). *Trichoderma* sp. nov. 49 contra *M. pernicioso* (D). *Trichoderma* sp. nov. MTS29 contra *A. welwitschiae* (E). *Trichoderma* sp. nov. MTS29 contra *M. pernicioso* (F)..... 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados nas reações de PCR.....	26
Tabela 2. Reações das PCRs com 25 µL.....	27
Tabela 3. Programas das PCRs utilizadas no termociclador.....	27
Tabela 4. Número de acesso do NCBI Genbank das sequências incluídas nas análises filogenéticas.....	28
Tabela 5. Amplitude radial (mm) das colônias de <i>Trichoderma</i> sp. MON24, <i>T. breve</i> e <i>T. zelobreve</i> , após 72 h, a 25 °C, nos meios CMD, SNA e BDA.....	34
Tabela 6. Comparação microscópica entre as espécies de <i>T. breve</i> e <i>T. zelobreve</i> com o isolado <i>Trichoderma</i> sp. MON24 em meio BDA e SNA a 25 °C.....	35
Tabela 7. Amplitude radial (mm) das colônias de <i>Aspergillus</i> sp. AMSO53 e <i>A. brevijan</i> us, em 14d, a 25 °C, nos meios CYA, MEA, CZ e CREA.....	39
Tabela 8. Comparação das características microscópicas entre <i>Aspergillus</i> sp. AMSO53 e <i>Aspergillus brevijan</i> us Hubka <i>et al.</i> , 2015.....	40
Tabela 9. Valores de identidade de <i>A. brevijan</i> us com espécies da seção <i>Jani</i>	42
Tabela 10. Percentual de inibição micelial dos fitopatógenos no 10° dia.....	55

RESUMO

CONCEIÇÃO, TAINÁ DELMONDES SANTOS, Bacharel em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 05 de 2023. Registro de ocorrência de *Aspergillus brevijanus* e taxonomia e potencial de biocontrole de fitopatógenos de novas espécies de *Trichoderma*.

Os fungos desempenham papel fundamental na ciclagem de nutrientes e podem produzir enzimas com grande potencial econômico. Portanto, é importante conhecer a diversidade de microorganismos nesses ambientes e explorar seu potencial biotecnológico. A taxonomia dos fungos utiliza características morfológicas, fisiológicas e genéticas para classificá-los, com a abordagem polifásica sendo a mais utilizada. O gênero *Aspergillus* é amplamente distribuído e adaptável, usado na produção de enzimas, alimentos, medicamentos e biocombustíveis, mas algumas espécies podem produzir micotoxinas. O gênero *Trichoderma* é importante na indústria e agricultura, sendo usado na biorremediação de resíduos poluentes, produção de enzimas industriais e controle biológico de doenças de plantas. A pesquisa e aproveitamento desses fungos são relevantes para ecologia, conservação e biotecnologia. Portanto, o objetivo deste trabalho é fazer o registro de ocorrência de *Aspergillus brevijanus* e a descrição polifásica de uma nova espécie de *Trichoderma*, bem como, testar o potencial de biocontrole de três novas espécies desse gênero. Os isolados foram reativados em meio de cultura, o DNA foi extraído e sequenciado para análises filogenéticas. A caracterização morfológica dos isolados foi realizada. As análises filogenéticas indicaram que o *Trichoderma* sp. MON24 é uma nova espécie pertencente ao clado *Harzianum* e *Aspergillus* sp. AMSO53 é o primeiro registro de ocorrência de *A. brevijanus*. Para os ensaios de biocontrole, os fitopatógenos foram inoculados em meio de cultura e foi feito o ensaio de cultura pareada e produção de compostos voláteis. Os três isolados de *Trichoderma* demonstraram capacidade de inibir os fitopatógenos testados. Esses resultados destacam a importância do estudo da diversidade da microbiota bem como a exploração de seu potencial biotecnológico no contexto do biocontrole.

Palavras-chave: Funga, Diversidade, Biocontrole.

ABSTRACT

CONCEIÇÃO, TAINÁ DELMONDES SANTOS, Bacharel em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 05 de 2023. Record of occurrence of *Aspergillus brevijanus* and taxonomy and biocontrol potential of phytopathogens of new species of *Trichoderma*.

Fungi play a key role in nutrient cycling and can produce enzymes with great economic potential. Therefore, it is important to know the diversity of microorganisms in these environments and explore their biotechnological potential. The taxonomy of fungi uses morphological, regulatory and genetic characteristics to classify them, with the polyphasic approach being the most used. The genus *Aspergillus* is widely distributed and adaptable, used in the production of enzymes, food, medicine and biofuels, but some species can produce mycotoxins. The genus *Trichoderma* is important in industry and agriculture, being used in the bioremediation of pollutant residues, production of industrial enzymes and biological control of plant diseases. The research and use of these fungi are relevant for ecology, conservation and biotechnology. Therefore, the objective of this work is to register the occurrence of *Aspergillus brevijanus* and the polyphasic description of a new species of *Trichoderma*, as well as to test the biocontrol potential of three new species of this genus. The isolates were reactivated in the culture medium, the DNA was extracted and sequenced for phylogenetic analysis. The morphological characterization of the isolates was performed. Phylogenetic analyzes indicated that *Trichoderma* sp. MON24 is a new species belonging to the clade *Harzianum* and *Aspergillus* sp. AMSO53 is the first occurrence record of *A. brevijanus*. For biocontrol assays, phytopathogens were inoculated in culture medium and paired culture and production of volatile compounds were tested. The three *Trichoderma* isolates showed the ability to inhibit the phytopathogens tested. These results highlight the importance of studying the diversity of the mycobiota as well as exploring its biotechnological potential in the context of biocontrol.

Key-words: Fungus, Diversity, Biocontrol.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 TAXONOMIA DOS FUNGOS	12
2.2 IMPORTÂNCIA DO GÊNERO <i>Aspergillus</i>	13
2.3 IMPORTÂNCIA DO GÊNERO <i>Trichoderma</i>	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
CAPÍTULO 1: TAXONOMIA DE <i>Aspergillus</i> AMSO53 e <i>Trichoderma</i> sp. nov. MON24	
1 INTRODUÇÃO.....	24
2 MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	25
2.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	25
2.3 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE REGIÕES DOS GENES <i>rpb2</i> , <i>tef1</i> , <i>benA</i> E <i>cal</i> (<i>CaM</i>).....	26
2.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	28
2.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	29
3 RESULTADOS.....	30
3.1 POSIÇÃO FILOGENÉTICA DE <i>Trichoderma</i> sp. MON24.....	30
3.2 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DE <i>Trichoderma</i> sp. MON24.....	31
3.3 POSIÇÃO FILOGENÉTICA DE <i>Aspergillus</i> sp. AMSO53.....	36
3.4 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DE <i>Aspergillus</i> sp. AMSO53.....	37
4 DISCUSSÃO.....	40
5 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
CAPÍTULO 2: POTENCIAL PARA BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS POR TRÊS NOVAS ESPÉCIES DE <i>Trichoderma</i>	
1 INTRODUÇÃO.....	49
2 MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	50
2.2 ENSAIOS DE CULTURA PAREADA E COMPOSTOS VOLÁTEIS.....	50
3 RESULTADOS.....	51
3.1 ENSAIOS DE CULTURA PAREADA.....	51
3.2 ENSAIOS DE COMPOSTOS VOLÁTEIS.....	54
4 DISCUSSÃO.....	56
5 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas de restinga, presentes no bioma da Mata Atlântica, são caracterizados por uma diversidade de formações vegetacionais, possui características como temperaturas elevadas, períodos de seca e escassez de nutrientes no solo (ANDRADE, 2013; BRASIL, 1999). A ocupação humana tem causado impactos significativos nesses ecossistemas, resultando na perda de biodiversidade, incluindo a microbiota, que possui um potencial biotecnológico ainda pouco explorado (SANTOS; MEDEIROS, 2003; KEMENES, 2003).

Da mesma forma, no cerrado, há uma lacuna de conhecimento quando se trata da diversidade da microbiota do solo (FRANÇOSO *et al.*, 2015; STRASSBURG *et al.*, 2017; PROCÓPIO; BARRETO, 2021). O cerrado é fortemente afetado pela atividade humana, resultando no esgotamento de recursos naturais e na ameaça à sua rica biodiversidade (SANO *et al.*, 2008; DE CASTRO *et al.*, 2008).

Os fungos desempenham um papel fundamental na ciclagem de nutrientes desses ecossistemas e também possuem a capacidade de produzir enzimas com potencial econômico em diversas indústrias, como biocombustíveis, têxtil e farmacêutica além de desempenharem um papel importante na redução de impactos ambientais, como a contaminação por petróleo (FRAC *et al.*, 2018; DRUZHININA; KUBICEK, 2016; RAVEENDRAN *et al.*, 2018; ABDEL-AZEEM *et al.*, 2019). Nesse contexto, os gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* são amplamente utilizados.

Especificamente, os fungos do gênero *Trichoderma* possuem grande relevância biotecnológica, sendo empregados na produção de medicamentos, biocombustíveis, tintas e tecidos (DRUZHININA; KUBICEK, 2016). Atuam também como agentes de biocontrole contra fungos e nematóides fitopatogênicos (FERREIRA *et al.*, 2008). Suas ações de biocontrole incluem competição, antibiose, micoparasitismo e indução de resistência (BETTIOL, 1991).

A utilização de microorganismos no controle biológico de doenças fitopatogênicas surge como uma alternativa viável e sustentável para reduzir a dependência de defensivos agrícolas prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente (MEYAR *et al.*, 2019; MAGALHÃES *et al.*, 2017). Para isso, é fundamental conhecer os microorganismos presentes no ambiente e explorar seu potencial biotecnológico.

A classificação dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* tem sido aprimorada

através do uso de técnicas de filogenia molecular, o que permite uma melhor discriminação entre as espécies e a reorganização taxonômica desses gêneros. A abordagem de identificação polifásica, que integra diferentes métodos, contribui para uma descrição mais precisa da diversidade de fungos filamentosos (SAMSON *et al.*, 2014). Portanto, o objetivo deste trabalho é fazer o registro de ocorrência de *Aspergillus brevijanusi* e a descrição polifásica de uma nova espécie de *Trichoderma*, bem como, testar o potencial de biocontrole de três novas espécies desse gênero.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TAXONOMIA DOS FUNGOS

Os fungos são organismos eucariotos, heterotróficos, uni ou pluricelulares. Apresentam distribuição cosmopolita e possuem importância biotecnológica e ecológica. Participam da decomposição de matéria orgânica, principalmente vegetal, sendo fundamentais na ciclagem de nutrientes da cadeia alimentar. Além disso, as plantas possuem associações simbióticas com os fungos, conhecidas como micorrizas, o que permitem a absorção de minerais e água do solo (TORTORA *et al.*, 2012).

A taxonomia de fungos é um campo amplo e complexo da biologia que se dedica à classificação e nomeação de fungos com base em suas características morfológicas, fisiológicas e filogenéticas. Estudos moleculares iniciados na década de 1990 utilizando análises de gene de RNA ribossomal realizado por White *et al.*, permitiu a reorganização sistemática da taxonomia fúngica. Entretanto, por muito tempo, a classificação fúngica foi associada às plantas, e somente em 1969, Whittaker propôs um sistema de divisão com cinco reinos, criando o Reino *Fungi*, e separando-os das plantas.

A nomenclatura dos fungos é regida pelo Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas (ICBN). Mudanças feitas neste código no XVIII Congresso Internacional de Botânica em Melbourne, Austrália em 2011, estabeleceram a abordagem de "um fungo, um nome", unificando os gêneros que antes eram divididos entre teleomorfos, a fase sexuada do indivíduo, e anamorfos, a fase assexuada (MCNEILL *et al.*, 2012).

A abordagem polifásica para identificar espécies é a mais utilizada atualmente, e integra características morfológicas, fisiológicas e filogenéticas. O método filogenético aplicado é a concordância genealógica utilizando genes não relacionados, buscando identificar independência evolutiva nas linhagens (TAYLOR *et al.*, 2000).

A taxonomia de fungos continua a ser um campo de pesquisa em constante evolução, à medida que novas espécies são descobertas e a compreensão da filogenia e biologia de fungos é aprimorada. A taxonomia é fundamental para a identificação e classificação precisa de espécies fúngicas e é uma base importante para estudos sobre ecologia, conservação e biotecnologia de fungos.

2.2 IMPORTÂNCIA DO GÊNERO *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus*, pertencente ao Reino Fungi, e está classificado no Domínio *Eukarya*, Filo *Ascomycota*, Classe *Eurotiomycetes*, Ordem *Eurotiales* e Família *Aspergillaceae*. O nome do gênero foi proposto em 1729 pelo padre Pier Antonio Micheli, inspirado nos conidióforos assexuais que se assemelham a um, um instrumento religioso utilizado para aspergir água benta.

O gênero *Aspergillus* é composto por mais de 590 espécies (MYCOBANK, 2023) que são encontradas em diversos ambientes naturais, que possuem capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais. Além disso, elas possuem uma diversidade metabólica significativa, o que lhes permite colonizar uma variedade de substratos, como solo, rochas e matéria orgânica em decomposição (LEVIĆ *et al.*, 2013; PALACIOS-CABRERA *et al.*, 2005; ABDEL-AZEEM *et al.*, 2019).

Muitas espécies de *Aspergillus* são utilizadas nas indústrias de alimentos, bebidas e higiene devido à produção de enzimas e metabólitos. Essas enzimas, como amilase, lipases e celulases têm diversas aplicações industriais. Por exemplo, as celulases são usadas na indústria têxtil e as lipases são amplamente utilizadas nas indústrias de detergentes e cosméticos (RAVEENDRAN *et al.*, 2018; ABDEL AZEEM *et al.*, 2019) Além disso, a espécie *Aspergillus niger* é utilizada na produção de ácido cítrico, que é um importante aditivo alimentar (SHOW *et al.*, 2015).

Alguns fungos do gênero *Aspergillus* podem produzir micotoxinas, que são substâncias tóxicas que podem contaminar alimentos e causar intoxicações em humanos e

animais. A aflatoxina, produzida pela espécie *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, é uma das micotoxinas mais conhecidas e pode causar intoxicação em humanos e animais (KAMEI; WATANABE, 2005; KUMAR *et al.*, 2017).

Os fungos do gênero *Aspergillus* também são utilizados na produção de medicamentos, utilizada em transplantes de órgãos, e no tratamento de doenças cardiovasculares, por exemplo, como também na produção de biocombustíveis, como o etanol, a partir de resíduos agrícolas (BIZUKOJC; LEDAKOWICZ, 2009; RAVEENDRAN *et al.*, 2018; ABDEL- AZEEM *et al.*, 2019).

2.3 IMPORTÂNCIA DO GÊNERO *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma*, pertencente ao domínio *Eukarya*, Reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, classe *Sordariomycetes*, ordem *Hypocreales* e família *Hypocreaceae*. Possui espécies altamente versáteis e desempenham um papel significativo tanto em termos ecológicos quanto biotecnológicos. Com mais de 400 espécies (MYCOBANK, 2023), esses fungos possuem uma notável capacidade de adaptação, permitindo sua sobrevivência em uma ampla variedade de ambientes naturais e climas diversos (CHAVERRI *et al.*, 2011; LÓPEZ-QUINTERO *et al.*, 2013).

As espécies de *Trichoderma* apresentam diversas estratégias para a aquisição de nutrientes, incluindo saprófitas, micotróficas e interações biotróficas com plantas. Essa habilidade permite que eles sejam encontrados em matéria orgânica vegetal em decomposição, solo, ambiente rizosférico e até mesmo nos tecidos internos das plantas (CHAVERRI *et al.*, 2011; LÓPEZ-QUINTERO *et al.*, 2013; MUKHERJEE *et al.*, 2013; RUIZ *et al.*, 2013).

Trichoderma desempenha um papel importante tanto na indústria quanto na agricultura. Esses fungos são utilizados na biorremediação de resíduos poluentes, incluindo metais pesados e toxinas presentes no ambiente (HARMAN, 2006; SCHUSTER e SCHMOLL, 2010). Além disso, eles produzem enzimas de interesse industrial, como quitinases, celulasas e proteases, que têm aplicações em vários setores, incluindo no controle de fungos fitopatogênicos (TROIAN *et al.*, 2004).

Na agricultura, *Trichoderma* desempenha diversas funções benéficas. Ele atua como agente de controle biológico de doenças de plantas, promove o crescimento das

plantas e ajuda na redução dos efeitos de estresses abióticos nelas. Esses fungos também contribuem para a disponibilidade e uso de nutrientes nos ecossistemas agrícolas e podem induzir mecanismos de defesa nas plantas contra fitopatógenos (ETHUR *et al.*, 2001; MAKETON *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2009; MARRASCHI *et al.*, 2018; SOUSA *et al.*, 2021; TYŚKIEWICZ *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2022).

Devido ao seu desempenho positivo na agricultura, existem diversos produtos comerciais à base de *Trichoderma* disponíveis no mercado, incluindo biofungicidas e biopesticidas (WOO *et al.*, 2014; GUPTA *et al.*, 2016). Além disso, pesquisas têm revelado o potencial desse gênero na produção de compostos com uso farmacêutico, incluindo metabólitos com atividades antibióticas, antifúngicas e anticâncer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AZEEM, A M. *et al.* *Aspergillus*: Biodiversity, Ecological Significances, and Industrial Applications. *In: Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi*. p. 121-179, 2019.

ANDRADE, J. **Fungos celulolíticos da formação arbustiva aberta da restinga de Guaibim, Bahia**. 2013. 90 p. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola.) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2013.

BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças em plantas**. Jaguariuna, SP: Embrapa, P 388, 1991.

BIZUKOJC, M.; LEDAKOWICZ, S. Physiological, morphological and kinetic aspects of lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus*. **Biotechnology journal**, v. 4, n. 5, p. 647-664, 2009.

BRASIL. Resolução do CONAMA n. 261, de 30 de junho de 1999. Define os parâmetros básicos para análise dos estágios sucessionais de vegetação de restinga para o Estado de Santa Catarina. 1999.

CHAVERRI, P.; *et al.* *Trichoderma amazonicum*, a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. **Mycologia**, v. 103, n. 1, p. 139-151, 2011.

DE CASTRO, A. P. *et al.* Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. **Archives of Microbiology**, v. 190, n. 2, p. 129-139, 2008.

DRUZHININA, I.S.; KUBICEK, C.P. Familiar Stranger: Ecological Genomics of the Model Saprotroph and Industrial Enzyme Producer *Trichoderma reesei* Breaks the Stereotypes. **Advances in Applied Microbiology**, Academic Press, New York, vol 95. pp 69–1, 2016.

ERTHUR, L. *et al.* SELEÇÃO DE *Trichoderma* spp. Visando Ao Controle De *Sclerotinia sclerotiorum*, in vitro. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 885887, 2001.

FERREIRA, P. A. *et al.* Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. **Trópica–Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 2, n. 3, p. 15-21, 2008.

FRAC, M. *et al.* Fungal biodiversity and their role in soil health. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 707, 2018.

FRANÇOSO, R. D. *et al.* Habitat loss and the effectiveness of protected areas in the cerrado biodiversity hotspot. **Natureza & Conservação**, v. 13, n. 1, p. 35-40, 2015.

GUPTA, S.; DIKSHIT, A. K. Biopesticides: An ecofriendly approach for pest control. **Journal of Biopesticides**, v. 3, n. Special Issue, p. 186, 2010.

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 190-194, 2006.

KAMEI, K.; WATANABE, A. *Aspergillus* mycotoxins and their effect on the host. **Medical mycology**, v. 43, n. 1, p. S95-S99, 2005.

KEMENES, A. Distribuição espacial da flora terrestre fanerogâmica do Parque Nacional Marinho de Abrolhos, BA. **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, n 2. p. 141–150, 2003.

KUMAR, P. *et al.* Aflatoxins: a global concern for food safety, human health and their management. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2170, 2017.

LEVIĆ, J. *et al.* An outbreak of *Aspergillus* species in response to environmental conditions in Serbia. **Pesticidi i fitomedicina**, v. 28, n. 3, p. 167-179, 2013.

LÓPEZ-QUINTERO, C. A. *et al.* DNA barcoding survey of *Trichoderma* diversity in soil and litter of the Colombian lowland Amazonian rainforest reveals *Trichoderma strigosellum* sp. nov. and other species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, n. 5, p. 657-674, 2013.

MAGALHÃES, V. C *et al.* *Burkholderia* isolates from a sand dune leaf litter display biocontrol activity against the bole rot disease of *Agave sisalana*. **Biological Control**, p. 41- 48, 2017.

MAKETON, M. *et al.* Greenhouse Evaluation of *Bacillus subtilis* AP01 And *Trichoderma harzianum* AP001 In Controlling Tobacco Diseases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 296300, 2008.

MARRASCHI, R. *et al.* A protocol for selection of *Trichoderma* spp. to protect grapevine pruning wounds against *Lasiodiplodia theobromae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 213221, 2019.

MCNEILL J. *et al.* **International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants** (Melbourne Code), 2012.

MEYER, M. *et al.* **Trichoderma Uso na Agricultura**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa, P 538, 2019.

MUKHERJEE, P. K. *et al.* *Trichoderma* in agriculture, industry and medicine: an overview. **Trichoderma biology and applications**. Boston: **CAB International**, p. 1-9, 2013.

MYCOBANK database. Disponível em : www.mycobank.org. Acesso em: maio de 2023.

NORVEL, L.L. Fungal nomenclature: 1. Melbourne approves a new CODE. **Mycotaxon**, v. 116, p. 481-490, 2011.

PALACIOS-CABRERA, H. *et al.* Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 24- 28, 2005.

PERRONE, G. *et al.* Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in mycology**, v. 59, p. 53-66, 2007.

PROCÓPIO, L.; BARRETO, C. The soil microbiomes of the Brazilian Cerrado. **Journal of Soils and Sediments**, v. 21, p. 2327-2342, 2021.

RAVEENDRAN, S. *et al.* Applications of microbial enzymes in food industry. **Food technology and biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 16-30, 2018.

ROCHA, R. *et al.* Selection of Endophytic Fungi from Comfrey (*Symphytum officinale* L.) For *In Vitro* Biological Control of The Phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 7378, 2009.

RUIZ, N. *et al.* Marine-derived *Trichoderma*: A Source of New Bioactive Metabolites.

Trichoderma: biology and applications, p. 247, 2013.

SAMSON, R. A. *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 78, p. 141-173, 2014.

SANO, S. M. *et al.* **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008.

SANTOS, C. R.; MEDEIROS, J. D. A. A ocupação humana das áreas de preservação permanente, vegetação fixadoras de dunas de Morro das Pedras, Santa Catarina - SC, Brasil. **Revista de Estudos Ambientais**, Blumenau, v. 5, n. 1, p. 22-41, 2003.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787-799, 2010.

SHOW, P. L. *et al.* Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 3, p. 271-283, 2015.

SILVA, L. *et al.* *Trichoderma*: Suas Interações E Uma Abordagem Metodológica Aplicada ao Estudo de Compostos Orgânicos Voláteis para o Mofo Branco E Promoção De Crescimento De Plantas. **Revisão Anual de Patologia em Plantas**, v. 28, n. 7, p. 163-183, 2022.

SOUSA, W. N. *et al.* Evaluation of *Trichoderma* spp. Isolates in Cocoa Seed Treatment and Seedling Production. **Plants**, v. 10, p. 210, 2021.

STRASSBURG, B. B. N. *et al.* Moment of truth for the Cerrado hotspot. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, n. 4, p. 1-3, 2017.

TAYLOR, J. W. *et al.* Phylogenetic Species Recognition and Species Concepts in Fungi. **Fungal genetics and biology**, v. 31, n. 1, p. 21-32, 2000.

TORTORA, G.J. *et al.* **Microbiologia**. 10^o ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TROIAN, R. F. *et al.* 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.

TYŚKIEWICZ, R. *et al.* *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. **International Journal of Molecular Sciences**. v 23. P 128, 2022.

WHITE, T.J. *et al.* **PCR Protocols and Applications A Laboratory Manual**. Academic Press, 1990.

WHITTAKER, R.H. New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. **Science**. V. 163.P150–16.

WOO, S. L. *et al.* *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. **The Open Mycology Journal**, v. 8, n. 1, 2014.

CAPÍTULO 1: TAXONOMIA DE *Aspergillus* sp. AMSO53 e *Trichoderma*
sp. MON24

RESUMO

CONCEIÇÃO, TAINÁ DELMONDES SANTOS, Bacharelado em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 05 de 2023. Taxonomia de *Aspergillus* sp. AMSO53 e *Trichoderma* sp. MON24.

O cerrado é um bioma conhecido como savana brasileira, que apresenta grande biodiversidade, incluindo muitas espécies endêmicas. No entanto, a atividade agropecuária intensa na região tem levado à degradação desse ambiente, assim como a restinga, um ecossistema que está perdendo sua biodiversidade devido às ações antrópicas. Apesar da importância dos fungos na ciclagem de matéria orgânica da cadeia alimentar, e na produção de diversos produtos úteis, poucos estudos têm sido realizados para avaliar a diversidade da microbiota presente nesses ecossistemas. Com o objetivo de ampliar o conhecimento da diversidade taxonômica da microbiota da restinga e do cerrado na Bahia, foi realizado um trabalho de descrição polifásica de uma nova espécie de *Trichoderma* e de um registro de ocorrência de uma espécie do gênero *Aspergillus*. Os isolados foram reativados em ágar extrato de malte (MEA) 20% e incubados em BOD a 25 °C por quatro dias. O DNA foi extraído e fragmentos dos genes barcodes *tef1*, *rpb2*, *benA* e *CaM* foram amplificados por PCR e sequenciados para as análises filogenéticas. Além disso, foi feita a caracterização morfológica dos isolados. Os resultados indicaram que o isolado *Trichoderma* sp. MON24 é uma nova espécie pertencente ao clado *Harzianum* e *Aspergillus* sp. AMSO53 é um registro de ocorrência de *A. brevijanensis*, pertencente à seção *Jani*. *Trichoderma* sp. MON24 apresenta pústulas brancas e verdes agregadas e solitárias, com conidióforo de tipo *Trichoderma*. Já *Aspergillus* sp. AMSO53 tem colônias aveludadas e flocosas, com micélio branco e rosa, e conidióforos uni e bisseriados. Estes resultados contribuem para a ampliação do conhecimento da diversidade de fungos filamentosos presentes na restinga e no cerrado baiano.

Palavras-chave: Biodiversidade, Funga, Micobiota.

ABSTRACT

CONCEIÇÃO, TAINÁ DELMONDES SANTOS, Bacharelado em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 05 de 2023. Taxonomy of *Aspergillus* sp. AMSO53 and *Trichoderma* sp. MON24. Orientador: Phellippe Arthur Santos Marbach.

The cerrado is a biome known as the Brazilian savannah, which has great biodiversity, including many endemic species. However, the intense agricultural activity in the region has led to the degradation of this environment, as well as the restinga, an ecosystem that is losing its biodiversity due to anthropic actions. Despite the importance of fungi in the cycling of organic matter in the food chain, and in the production of various useful products, few studies have been carried out to assess the diversity of the mycobiota present in these ecosystems. With the aim of expanding knowledge of the taxonomic diversity of the mycobiota of the restinga and cerrado in Bahia, a polyphasic description of a new species of *Trichoderma* and a record of the occurrence of a species of the genus *Aspergillus* was carried out. The isolates were reactivated in 20% malt extract agar (MEA) and incubated in BOD at 25 °C for four days. DNA was extracted and fragments of the *tefl*, *rpb2*, *benA* and *CaM* barcode genes were amplified by PCR and sequenced for phylogenetic analyses. In addition, the morphological characterization of the isolates was performed. The results indicated that the isolated *Trichoderma* sp. MON24 is a new species belonging to the *Harzianum* clade and *Aspergillus* sp. AMSO53 is an occurrence record of *A. brevijanous*, belonging to the *Jani* section. *Trichoderma* sp. MON24 presents white and green pustules aggregated and solitary, with a conidiophore of the type *Trichoderma*. *Aspergillus* sp. AMSO53 has velvety and flaky colonies, with white and pink mycelium, and uni and biseriate conidiophores. These results contribute to the expansion of knowledge of the diversity of filamentous fungi present in the restinga and in the Bahian cerrado.

Key-word: Biodiversity, Fungi, Mycobiota.

1 INTRODUÇÃO

O cerrado é um bioma com uma grande biodiversidade, sendo conhecido como a savana brasileira (SANO *et al.*, 2008). Este bioma contém um número significativo de espécies endêmicas. No entanto, é o segundo bioma mais impactado do Brasil devido à atividade humana, perdendo apenas para a Mata Atlântica (DE CASTRO *et al.*, 2008). As mudanças resultam principalmente do avanço indiscriminado da agropecuária, resultando no esgotamento dos recursos naturais e colocando as espécies em risco de extinção. Além disso, pouco se sabe sobre a diversidade da microbiota do solo desse bioma (FRANÇOSO *et al.*, 2015; STRASSBURG *et al.*, 2017; PROCÓPIO; BARRETO, 2021).

A restinga é outro ecossistema que está perdendo sua biodiversidade devido à ocupação humana (SANTOS; MEDEIROS, 2003). Além disso, a recuperação é lenta, e é considerado um ambiente vulnerável que precisa ser estudado e conservado (KEMENES, 2003). A Área de Proteção Ambiental (APA) de Guaibim, BA, faz parte de uma das restingas do litoral baiano que apresentam alto nível de degradação causada pelo homem. Apesar de ser pouco frequentada, a praia recebe uma grande quantidade de lixo que se acumula (MARTINS, 2012).

Os fungos desempenham um papel fundamental na ciclagem de nutrientes desses ecossistemas, contribuindo para o retorno de matéria orgânica no ambiente e garantindo a manutenção do equilíbrio ecológico (FRAC *et al.*, 2018). Esses organismos também produzem enzimas de interesse econômico, principalmente proteases, amilases, lipases e celulases, que são utilizadas na indústria têxtil, produção de biocombustíveis, papel, detergentes, cosméticos, entre outros (RAVEENDRAN *et al.*, 2018; ABDEL-AZEEM *et al.*, 2019). Espécies do gênero *Trichoderma* são usadas na produção de biocombustíveis, na indústria têxtil e farmacêutica (DRUZHININA; KUBICEK, 2016). O último setor também conta com a contribuição de espécies do gênero *Aspergillus*, como *A. niger*, e *A. parasiticus*, que produzem metabólitos secundários utilizados para fabricar antibióticos, compostos com ação anti-inflamatória, imunossupressora e despigmentante (BIZUKOJC; LEDAKOWICZ, 2009; BRACARENSE, 2014). Espécies de *Aspergillus* também são usadas para reduzir os impactos causados pela contaminação do petróleo, além de contribuir para a fabricação de plásticos e lubrificantes (PASSOS *et al.*, 2009).

Dois importantes gêneros de fungos filamentosos são *Aspergillus* e *Trichoderma*, com aproximadamente 590 e 400 espécies, respectivamente (MYCOBANK, 2023). Entretanto, antigamente, a taxonomia desses fungos era feita com base em suas

características morfofisiológicas. No entanto, essa classificação não representava a verdadeira diversidade desses gêneros devido à limitação do número de variações de caracteres e à presença de espécies crípticas. Para solucionar esse problema, a filogenia molecular foi utilizada para melhorar a discriminação entre as espécies e reorganizar os gêneros. Esse método, que integra diferentes abordagens, é chamado de identificação polifásica.

Portanto, o objetivo deste capítulo é fazer a descrição polifásica do isolado de uma nova espécie de *Trichoderma* e fazer a descrição de um novo registro de ocorrência de uma espécie pertencente ao gênero *Aspergillus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Os isolados de *Aspergillus* e *Trichoderma* utilizados são pertencentes à coleção do Laboratório de Biologia Evolutiva localizado na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. *Aspergillus* sp. AMSO53 T1 e *Aspergillus* sp. AMSO53 T2 foram coletados do solo do cerrado, na cidade de Cocos (S 14° 11' 02" O 44° 32' 02"), Bahia. Já *Trichoderma* sp. MON24 foi isolado da serrapilheira na Restinga de Guaibim (13° 16' 10"S 38° 57' 33" W), Bahia.

2.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Os isolados foram cultivados em meio ágar extrato de malte (MEA) 20%, incubados em BOD a 25 °C por quatro dias. Em seguida, foi utilizado o método Doyle e Doyle (1990). Em cadinhos estéreis, o micélio fúngico foi transferido para maceração com adição de nitrogênio líquido, e, em seguida, 1mL do tampão de extração CTAB foi adicionado. O material foi transferido para um tubo eppendorf de 2,0 mL e colocado em banho maria a 65 °C por 30 minutos, com agitação a cada 10 minutos. Posteriormente, acrescentou-se 650 µL de clorofórmio: isoamílico (CIA-24:1) e foi misturado manualmente até a formação da emulsão. Os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 5 minutos e 400 µL do sobrenadante foi coletado, repetindo-se 3x essa etapa. Foi adicionado

o mesmo volume de isopropanol ao sobrenadante coletado, e em seguida, colocado em um ultrafreezer (– 80 °C) por 10 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado por 5 min a 12000 rpm, formando o pellet e o sobrenadante foi descartado. Este pellet foi lavado duas vezes com etanol 70% e secado em temperatura ambiente dentro de uma capela de fluxo previamente limpa e ligada. Para a ressuspensão do pellet, foi adicionado 50 µL de água ultra pura e 1,5 µL de RNase, e incubado por 30 minutos em banho-maria a 37 °C.

2.3 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE REGIÕES DOS GENES *rpb2*, *tef1*, *benA* E *cal* (*CaM*).

Os genes *rpb2*, *tef1* e *cal* são *barcodes* utilizados para identificação de espécies do gênero *Trichoderma*, já *benA*, *rpb2* e *CaM* são *barcodes* para *Aspergillus*. Sendo assim, os fragmentos desses genes foram amplificados utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os primers utilizados na PCR estão descritos na tabela 1. Os componentes das reações e programações do termociclador estão especificados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 1. Primers utilizados nas reações de PCR.

Gene	Primer	Sequência	Sentido	Tamanho (pb)	Referência
<i>benA</i>	bt2a	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC	Forward	550	Glass; donaldson, 1995
	bt2b	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	Reverse		
<i>CaM</i>	CMD5	CCG AGT ACA AGG ARG CCT TC	Forward	580	Hong <i>et al.</i> , 2006
	CMD6	CCG ATR GAG GTC ATR ACG TGG	Reverse		
<i>rpb2</i>	5F	GAY GAY MGW GAT CAY TTY GG	Forward	1000	Liu <i>et al.</i> , 1999
	7cR	CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT	Reverse		

	278F	CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG	Forward		Druzhinina <i>et al.</i> , 2005
<i>tefl</i>	TEF1- LLrev	AAC TTG CAG GCA ATG TGG	Reverse	1200	Jaklitsch; voglmayr, 2015
	228F	GAG TTC AAG GAG GCC TTC TCCC	Forward		Carbone; kohn, 1999
<i>cal</i>	737R	CAT CTT TCT GGC CAT CAT GG	Reverse	500	

Tabela 2. Reações das PCRs com 25 µL.

Reagentes	<i>rpb2</i>	<i>tefl</i>	<i>benA</i>	<i>cal</i>	<i>CaM</i>
Água ultrapura (µl)	14,3	11,8	14,6	13,3	12,3
Tampão 10x	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
dNTP (2,5 mM)	2,0	2,5	2,0	2,0	2,0
Primer 1 (10 pmol/µl)	1,0	2,0	0,75	1,0	2,0
Primer 2 (10 pmol/µl)	1,0	2,0	0,75	1,0	2,0
Taq polimerase (5 U/µl)	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2
DNA	2,0	2,0	2,0	3,0	2,0

Tabela 3. Programas das PCRs utilizadas no termociclador.

Regiões genicas	Desnaturação inicial	Ciclos	Desnaturação	Anelamento	Alongação	Extensão final
<i>tefl</i>	94 °C – 5'	40	94 °C – 30 "	50 °C – 30 "	72 °C – 90"	72°C – 6'
<i>rpb2</i>	94°C – 2'	35	94 °C – 30"	55 °C – 45"	72 °C – 1'	72°C – 2'
<i>cal</i> (<i>CaM</i>)	95 °C – 2'	38	93 °C – 30"	50°C – 30"	72 °C – 1'	72 °C – 10'
<i>benA</i>	94 °C – 3'	35	94 °C – 30"	58 °C – 45"	72 °C – 1' 30"	72 °C – 5'

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit comercial *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit GE Healthcare* e confirmados através da eletroforese em gel de agarose a 1%. Posteriormente, enviados para o sequenciamento na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS). Os eletroferogramas foram editados no DNADragon 4.4.2.

2.4 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando as sequências de nucleotídeos obtidas neste trabalho e também sequências homólogas recuperadas nas bases de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (tabela 4). As sequências recuperadas foram escolhidas mediante a comparação das identidades conferidas pela ferramenta BLASTn. O alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos foi feito e editado manualmente no MEGA 5.2. Foram realizadas análises filogenéticas pelo método da máxima verossimilhança utilizando árvores concatenadas contendo três (*Aspergillus*) ou dois (*Trichoderma*) genes diferentes, a fim de se analisar a concordância genealógica. As espécies utilizadas para gerar a árvore estão descritas na Tabela 4. A confiabilidade da topologia das árvores foi verificada pelo método de *bootstrap*.

Tabela 4. Número de acesso do NCBI Genbank das sequências incluídas nas análises filogenéticas.

Espécie	isolado	<i>benA</i>	<i>CaM</i>	<i>rpb2</i>	<i>tef1</i>
<i>Aspergillus janus</i>	NRRL 1787	EU014076.1	EF669536.1	EF669620.1	-
<i>Aspergillus brevijanús</i>	NRRL 1935	EU014078.1	EF669540.1	EF669624.1	-
<i>Aspergillus trisporus</i>	CCDCA:FI15	MF616387	MN013146	MF616389	-
<i>Aspergillus luppiae</i>	NRRL 6326	EU014079.1	EF669575.1	EF669659.1	-
<i>Aspergillus flavipes</i>	NRRL 302	EU014085.1	EF669549.1	EF669633.1	-

<i>Aspergillus iizukae</i>	NRRL 3750	EU014086.1	EF669555.1	EF669639.1	-
<i>Aspergillus carneus</i>	CBS 494.65	FJ491723.1	FJ531220.1	EF669653.1	-
<i>Aspergillus niger</i>	NRRL 326	LC589349.1	LC589323.1	EF661058.1	-
<i>Trichoderma harzianum</i>	CBS 226.95	-	-	AF545549.1	AF534621.1
<i>Trichoderma brunneoviride</i>	CBS121130	-	-	EU498357.1	EU498316.1
<i>Trichoderma afroharzianum</i>	GJS 04-186	-	-	FJ442691.1	FJ463301.1
<i>Trichoderma inhamatum</i>	CBS 273.78	-	-	FJ442725.1	AF348099.1
<i>Trichoderma guizhouense</i>	HGUP0038	-	-	JQ901400.1	JN215484.1
<i>Trichoderma pyramidale</i>	CBS:135574 S73	-	-	KJ665334.1	KJ665699.1
<i>Trichoderma corneum</i>	CBS 100541	-	-	KJ842183.1	AY937431.1
<i>Trichoderma bannaense</i>	HMAS:248840	-	-	KY687979.1	KY688037.1
<i>Trichoderma breve</i>	HMAS 248844	-	-	KY687983.1	KY688045.1
<i>Trichoderma rugulosum</i>	SFC20180301- 001	-	-	MH025986.1	MH025984.1
<i>Trichoderma asiaticum</i>	YMF1.00352	-	-	MH158994.1	MH183183.1
<i>Trichoderma zeloharzianum</i>	YMF1.00268	-	-	MH158996.1	MH183181.1
<i>Trichoderma azevedoi</i>	CEN1422	-	-	MK696821.1	MK696660.1
<i>Trichoderma zelobreve</i>	CGMCC 3.19695	-	-	MN605872.1	MN605883.1

2.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Os isolados foram reativados em meio de cultura MEA 20%. Em seguida, foi feita suspensão de esporos com 1 mL de ágar- água, utilizando 3 µL dessa suspensão para a inoculação.

Para *Trichoderma* sp. MON24, os meios de cultura usados para a caracterização

foram farinha de milho dextrose ágar (CMD), sintético nutriente ágar (SNA) e o batata dextrose ágar (BDA), adicionando 20 mL em cada placa de plástico, e colocado em incubadora BOD a 25 °C por 14 dias. O crescimento da colônia foi medido após 72h. A cor e o tipo de crescimento da colônia, a formação do micélio aéreo, o início da produção de pústulas e pigmentos solúveis foram analisados. Para as características microscópicas, foi feito o microcultivo em placa de Petri, e as estruturas foram analisadas entre 7 a 10 dias. As lâminas foram feitas com ácido láctico e observadas no microscópio óptico. As estruturas medidas foram o comprimento e largura dos conídios, clamidósporos, pústulas e das células que sustentam as fialides, e comprimento, largura e largura da base das fialides.

Para *Aspergillus* sp. AMSO53 T1 e *Aspergillus* sp. AMSO53 T2, os meios de cultura usados para a caracterização foram o ágar Czapek extrato de levedura (CYA), ágar extrato de malte (MEA), ágar dicloran 18% glicerol (DG18), ágar de extrato de levedura sacarose (YES), ágar aveia (OA), ágar Czapek (CZ), e ágar creatina sacarose (CREA), adicionando 20 mL em cada placa de plástico, e colocado na incubadora BOD a 25 °C por 14 dias. Placas adicionais em CYA foram incubadas a 37 °C e 40 °C. Características como coloração e textura do verso e reverso da colônia, grau de esporulação, produção de exsudato e pigmento solúvel foram analisados utilizando a cartela de cores ISCC-NBS (KELLY; JUDD, 1965). Para as características microscópicas, também foi feito o microcultivo, com estruturas analisadas entre 7 a 10 dias. As características observadas foram: tamanho e forma das estipes, métulas, fialides, vesículas e conídios. Foram feitas fotos da colônia no 14º dia, e as estruturas microscópicas foram registradas com o microscópio Zeiss Imager. A2 AXIO e Leica.

3 RESULTADOS

3.1 POSIÇÃO FILOGENÉTICA DE *Trichoderma* sp. MON24

Em análises preliminares utilizando as sequências adquiridas dos isolados deste estudo (*tefl*, *rpb2* e *cal*) revelaram por utilização da ferramenta BLASTn uma identidade abaixo de 98% para os diferentes genes quando comparada ao banco de dados (NCBI) das

sequências tipo das espécies do gênero *Trichoderma*. O resultado da árvore filogenética realizada a partir das sequências de nucleotídeos dos genes *tefl* e *rpb2* indica que *Trichoderma* sp. MON24 é uma nova espécie do gênero *Trichoderma*. As espécies mais próximas desse isolado são *T. breve* (CHEN; ZHUANG, 2017) e *T. zelobreve* (GU *et al.*, 2020), descritas pela primeira vez na China, e são pertencentes ao clado *Harzianum* (Figura 1).

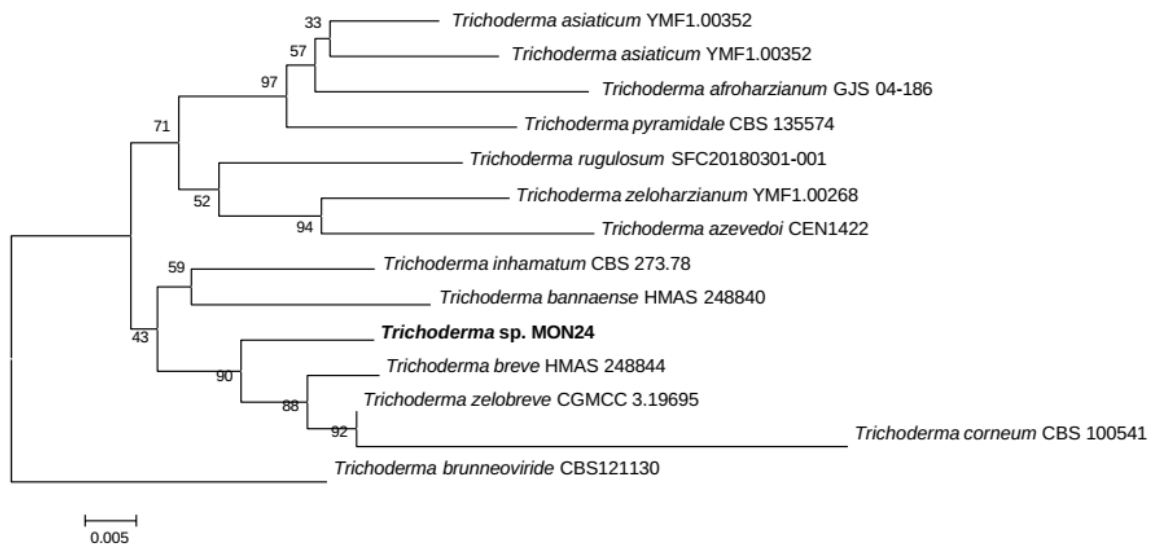


Figura 1. Árvore filogenética das espécies de *Trichoderma* pelo método de máxima verossimilhança baseado no alinhamento múltiplo combinado das sequências de nucleotídeos dos genes *tefl* e *rpb2*. *Trichoderma brunneoviride* CBS 121130 foi usado como grupo externo. Foram usadas apenas sequências de nucleotídeos dos tipos das espécies.

3.2 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DE *Trichoderma* sp. MON24

Trichoderma sp. DA CONCEIÇÃO, T. D. S.; SALES, L. S.; ANDRADE, J. P.;
MARBACH, P. A. S.

Fig. 2

MycoBank: Ainda não depositado.

Etimologia: Ainda não definida.

Tipo: Bahia, distrito de Valença - praia de Guaibim (13°18'03.1"S/ 38°57'57.6"W), coletado de serapilheira em uma região de Mata no dia 10/11/2012. Material Tipo MON24, preservado em estado inativo (Castellani) na conservação e utilização da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Em PDA após 72h, raio da colônia 47 – 56 mm, micélio cobrindo a placa após 5d a 25°C. Hifas aéreas a partir de 3d, inicialmente hialinas, passando para branco esverdeado, com crescimento halocêntrico. Conidiação após 3d, com formação de pústulas solitárias e agregadas, brancas e verde escuras, inicialmente formando um halo ao redor do inóculo.

Conidiação após 3 d, formada em hifas aéreas e pústulas, pústulas brancas e verde-escuras, solitárias e agregadas, surgindo próximo ao inóculo e na região mediana da placa. (0,2-) 0,4 – 0,6 (- 0,8) x 0,10 – 0,5 11d (n = 20). Nenhum odor distinto observado. Nenhum pigmento observado. Conidióforos trichoderma-like. Fialides dispostas frouxamente, solitárias ou pareadas, lageniformes e ampuliformes 3 – 6 (-8) x 2 - 4 µm, l/w 1,3 x 2,0 (- 2,3), 1 – 2 µm largura da base µm (n = 60), Células que nascem Fialides 4 – 7 (-9) x 2 – 3 µm (n = 30). Conídios verdes, lisos, subglobosos, globosos e ovóides, 2 – 4 x 2 – 3 µm, l/w 1,0 – 1,5 (n = 60). Clamidósporos intercalados ou terminais, globosos a subglobosos 4 – 7 (-9) x 3 – 6,1/w 1,3 – 1,8 (n = 30).

Em CMD após 72h, raio da colônia 44 – 48 mm, micélio cobrindo a placa após 5d a 25°C. Colônia inicialmente vegetativa, se tornando aérea em 4 dias, inicialmente hialina, e posteriormente, branco esverdeada, com crescimento irregular. Conidiação após 5d, formada em hifas aéreas epústulas brancas e verdes escuras, solitárias e agregadas, surgindo inicialmente próximo ao inóculo e na região mediana da placa, se espalhando após 7d.

Em SNA após 72h, raio da colônia 30 – 48 mm, micélio cobrindo a placa após 5d a 25°C. Colônia inicialmente vegetativa tornando-se aérea em 4d. Inicialmente hialina, se tornando branco esverdeada, com crescimento irregular. Conidiação após 4d, formada em hifas aéreas e pústulas brancas e verdes escuras, solitárias e agregadas, surgindo próximo ao inóculo e na região mediana da placa.

Nota: Em análises preliminares utilizando as sequências adquiridas dos isolados deste estudo (*tefl1*, *rpb2* e *cal*) revelaram por utilização da ferramenta BLASTn uma identidade

abaixo de 98% para os diferentes genes quando comparada ao banco de dados das sequências tipo das espécies do gênero *Trichoderma*. Além disso, a espécie descrita demonstra características morfológicas e morfofisiológicas, quando comparada ao tipo de *T. breve*, como, menor taxa de crescimento em todos os meios de cultura em 25 °C. Contudo, devido ao alto nível de similaridade morfológica dentro do clado *Harzianum*, algumas espécies possuem características morfológicas idênticas e sendo assim, identificadas como espécies crípticas, dificultando dessa maneira a delimitação morfológica entre as espécies pertencente a esse clado, necessitando assim de mais estudos para alcançar a concepção taxonômica a nível de espécie.

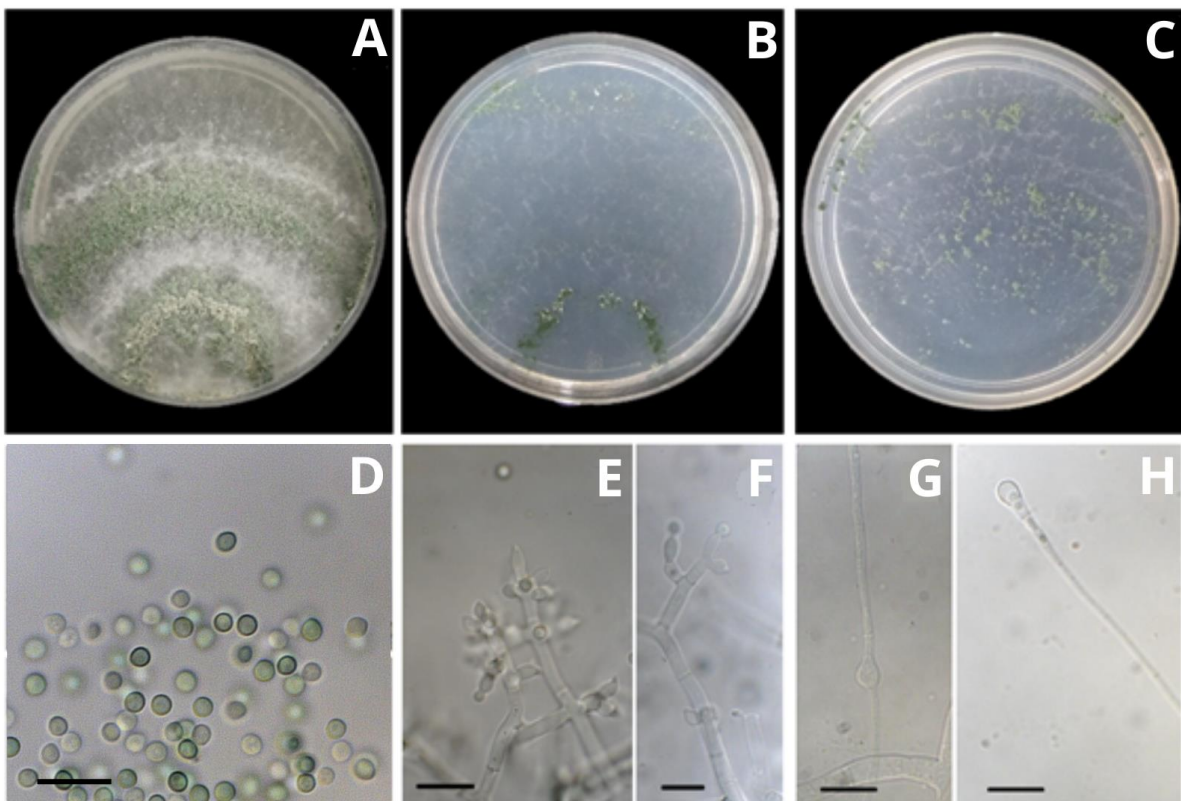


Figura 2. *Trichoderma* sp. MON24. Culturas em 7d a 25 °C: BDA (A); SNA (B); CMD (C). Estruturas microscópicas em BDA a 25 °C (D – H). Conídios (D); conidióforos e filialides (E, F); clamidósporos: intercalar (G) e terminal (H). Barra de escala = 10 μm.

Com a descrição das estruturas macromorfológicas do isolado *Trichoderma* sp. MON24 observou-se que em meio CMD, o isolado apresentou um crescimento irregular e conidiação após o 5d, diferindo de *T. breve*, cuja conidiação se deu após 2d e seu crescimento foi em zonas concêntricas. *T. zelibreve* exibiu crescimento aéreo imperceptível. Em SNA, o crescimento foi irregular e as pústulas surgiram com mais intensidade próximo ao inóculo. Já *T. breve* apresentou pústulas em anéis concêntricos irregulares, e *T. zelibreve* teve um crescimento regularmente circular. Em BDA, *T. breve* e *Trichoderma* sp. MON24 se assemelham quanto ao tipo de crescimento em anéis concêntricos apresentando micélio denso branco e esverdeado. Diferentemente de *T. zelibreve* que possuiu crescimento circular irregular e colônia amarelo-esbranquiçada. Houve também diferenças entre as taxas de crescimento das colônias nos diferentes meios de cultura (Tabela 5).

Tabela 5. Amplitude radial (mm) das colônias de *Trichoderma* sp. MON24, *T. breve* e *T. zelibreve*, após 72 h, a 25 °C, nos meios CMD, SNA e BDA.

		Amplitude radial das colônias		
		<i>Trichoderma</i> sp. MON24	<i>Trichoderma breve</i> CHEN; ZHUANG, 2017.	<i>Trichoderma zelibreve</i> GU <i>et al.</i> , 2020.
Tamanho da Colônia (mm)	CMD	44 – 48	67 – 72	11 – 12
	SNA	30 – 37	54 – 55	62 – 63
	BDA	47 – 56	71 – 72	55 – 58

As estruturas microscópicas de *Trichoderma* sp. MON24 também foram comparadas com as espécies mais próximas (Tabela 6). Ambos possuem conidióforo *Trichoderma-like*, fialide ampuliforme e langeliforme, e conídios subglobosos a ovóides, com exceção de *T. breve*, que não apresenta este último. Não foram observadas diferenças nas medições do isolado deste estudo com *T. breve* e *T. zelibreve*, com exceção da presença de clamidósporos em meio SNA, ausente neste último.

Tabela 6. Comparação microscópica entre as espécies de *T. breve* e *T. zelibreve* com o isolado *Trichoderma* sp. MON24 em meio BDA e SNA a 25 °C.

Espécies	<i>Trichoderma</i> sp. MON24	<i>Trichoderma breve</i> CHEN; ZHUANG, 2017.	<i>Trichoderma</i> sp. MON24	<i>Trichoderma zelibreve</i> GU <i>et al.</i> , 2020.
Meios de cultura	BDA	BDA	SNA	SNA
C x L do conídio	2 – 4 x 2 – 3	2,5 – 3,5 (–3,9) x 2,5 – 3,1	2 – 3 x 2 – 3	(2,0–) 2,3–2,6 (–2,9) x (1,5–) 1,8 – 2,2 (–2,5)
C/L conídio	1 – 1,5	1 – 1,3	1 – 1,5	(0,8–) 1,1 – 1,4 (–1,7)
C x L da célula que surgem fialides	4 – 7 (–9) x 2 – 3	–	5 – 7 (–11) x 2 – 3	–
L da base do fialide	1 – 2	1,4 – 2,5	1 – 3	1,4 – 2,1
C x L fialide	3 – 6 (–8) x 2 – 4	6,7–10,0 (–12,2) x 2,8–3,9	3 – 5 (–7) x 2 – 4	(3,5–) 4,0–6,0 (–7,0) x (2,2–) 2,6–3,2 (–3,5)
C/L da fialide	1,3 – 2,0 (–2,3)	(1,7–) 2,2–3,4 (–4,4)	1,3 – 2,0	(1,1–) 1,4 – 2,1 (–2,5)
C x L do Clamidósporo	4 – 7 (–9) x 3 – 6	4,1 – 7,6 x (2,8–) 3,5 – 6,2	4 – 7 (–9) x 2 – 6	–
C/L do Clamidósporo	1,3 – 1,8	1,0 – 1,4 (–1,8)	1,3 – 1,7 (–2,0)	–

Características Microscópicas µm

3. 3 POSIÇÃO FILOGENÉTICA DE *Aspergillus* sp. AMO53

Em análises preliminares utilizando as sequências adquiridas dos isolados *Aspergillus* sp. AMOSO53 T1 e *Aspergillus* sp. AMOSO53 T2 deste estudo (*benA*, *rpb2* e *CaM*) revelaram por utilização da ferramenta BLASTn uma identidade acima de 98% para os diferentes genes quando comparada ao banco de dados (NCBI) das sequências tipo da espécie *Aspergillus brevijanus*. O resultado da árvore filogenética realizada a partir das sequências de nucleotídeos dos três genes indica que os isolados de estão intimamente relacionados com *A. brevijanus*, indicando que eles pertencem a mesma espécie (Figura 3). Portanto, esses isolados representam um novo registro de ocorrência dessa espécie. *Aspergillus brevijanus* faz parte da seção *Jani*, que possui apenas três espécies: *A. brevijanus*, *A. janus* e *A. trisporus*, todas isoladas de solo sendo México, Panamá e Brasil, respectivamente.

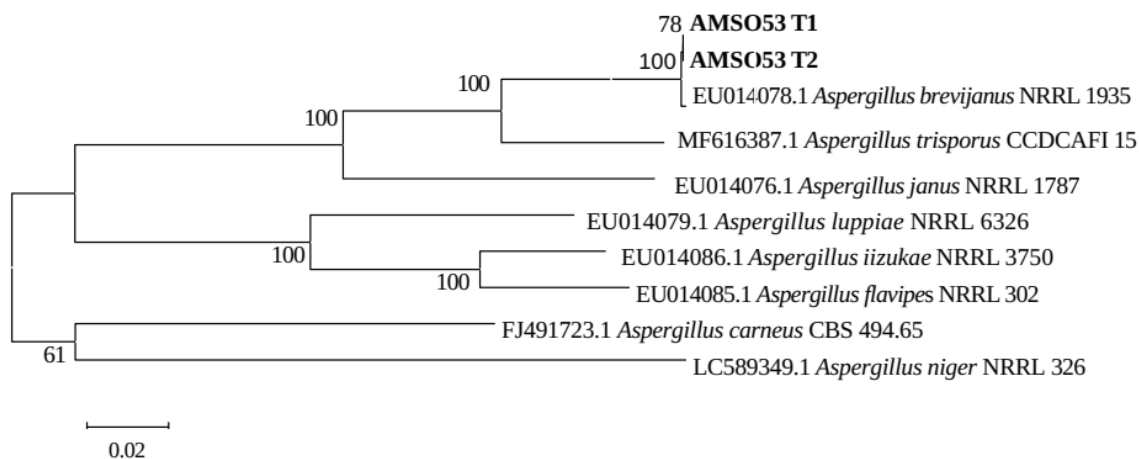


Figura 3. Árvore filogenética das espécies de *Aspergillus* pelo método de máxima verossimilhança baseado no alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos dos genes *benA*, *rpb2* e *CaM*. *Aspergillus niger* NRRL 326 foi usado como grupo externo. Foram usadas apenas sequências de nucleotídeos dos tipos das espécies.

3.4 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DE *Aspergillus* sp. AMSO53

Características macroscópicas: colônias em **CYA** 25 °C, 14d: 20 – 26 mm, velutinosa, radial e concentricamente enrugada, micélio branco (n° 263), esporulação moderada a densa amarelo laranja pálido (n° 73), branco (n° 263), verde escuro (n° 146), exsudato às vezes amarelo, pigmento solúvel às vezes amarelo vívido (n° 82), reverso amarelo laranja escuro (n° 72), laranja forte (n° 50). Colônias em **MEA** 25 °C, 14 d: 17 – 25 mm, velutinosa, micélio branco (n° 263), radialmente enrugado, esporulação moderada variando de amarelo laranja claro (n° 70) a verde amarelado escuro (n° 137), exsudato claro, pigmento solúvel amarelo vívido (n° 82), reverso laranja forte (N° 8. 50). Colônias em **DG18** 25 °C, 14 d: 16 – 18 mm, velutinosa à flocosa, micélio branco (n° 263), radialmente enrugado, esporulação moderada verde pálido (n° 149) a verde-claro moderado (n°144), sem exsudato, pigmento solúvel amarelo vívido (n° 82) a forte amarelo laranja (n° 68), e reverso amarelo laranja forte (n° 68). Colônias em **YES** 25 °C, 14 d: 23 – 27 mm, velutinosa, micélio branco (n° 263), radialmente enrugado, esporulação moderada a denso verde escuro (n° 146), amarelo claro (n° 86), rosa amarelado pálido (n° 31), sem exsudato, pigmento solúvel laranja vívido (n° 48), e no reverso laranja forte (n° 50) e laranja vívida (n° 48). Colônias em **OA** 25 °C, 14 d: 23 – 33mm, flocosa, plana, micélio branco (n° 263), esporulação amarelo acinzentado escuro moderado (n° 103), exsudato e pigmento solúvel ausente. Colônias em **CZ** 25 °C, 14 d: 20 – 23 mm, flocosa, plana, micélio branco (n° 263), esporulação cinza-oliva (n° 113), exsudato e pigmento solúvel ausente. Colônias em **CREA** 25 °C, em 14 d: 12 – 26 mm, flocosa, plana, esporulação verde amarelo vívido (n° 115), sem produção de ácido. Colônias crescidas em **CYA** 37 °C, e ausência de crescimento em 40 °C.

Características microscópicas em **MEA** 25 °C, 7 a 10 dias: Cabeça conidial radial e colunar, bisseriada às vezes unisseriada. Estipes incolores com paredes lisas e não septadas, raramente curvada, com comprimento (6 –)14 – 82 (– 100) µm e largura 2 – 4 µm. Vesícula globosa, piriforme e espatulada com comprimento 2 – 9 µm e largura 2 – 6 (– 8) µm. Fialides cobrindo um a dois terços da superfície da vesícula, com tamanho 3 – 8 µm. Conídios verdes, lisos e espiculados, globoso, subglobosos e ovoides, 2 – 4 µm de comprimento e largura.

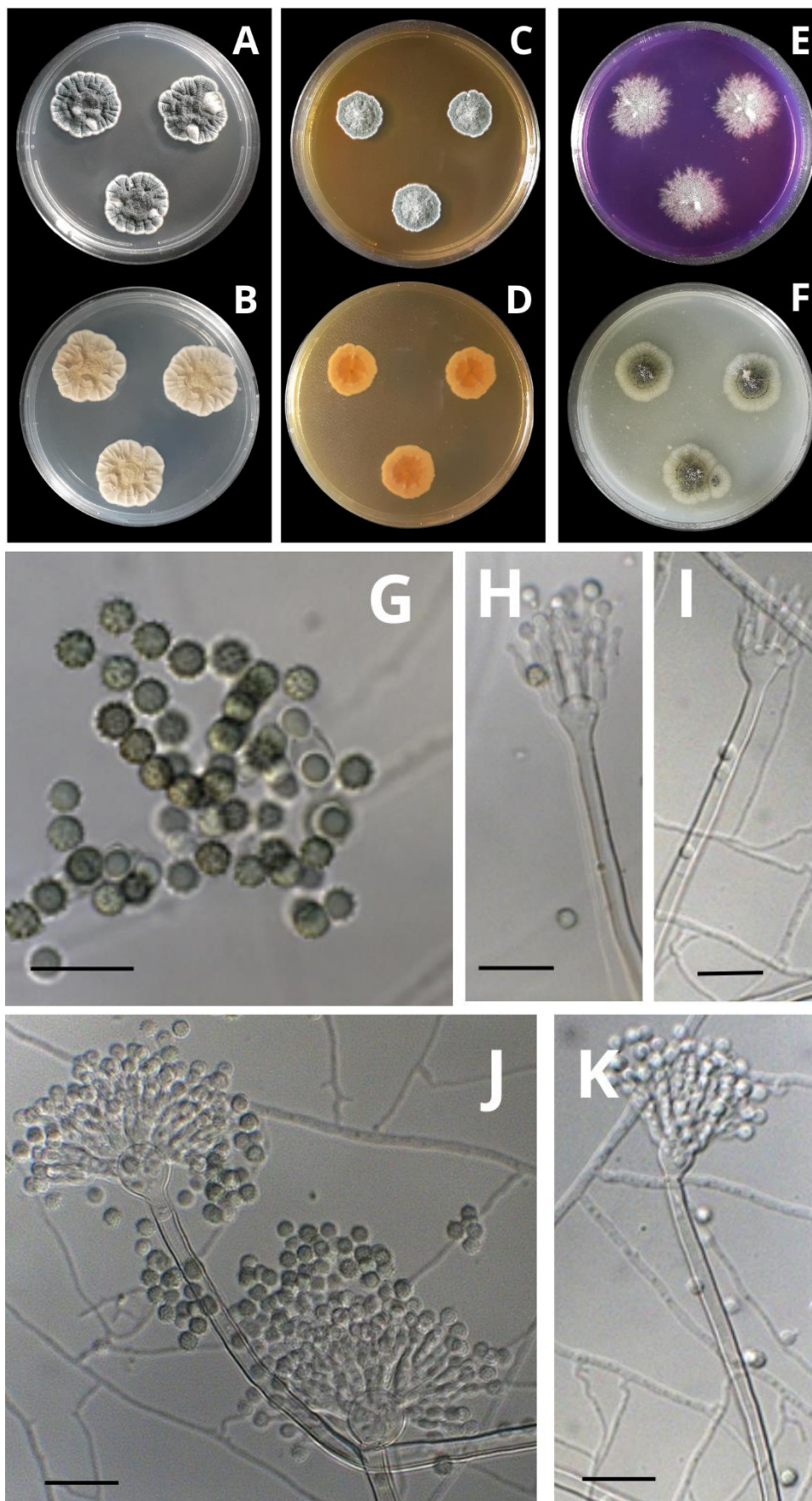


Figura 4. *Aspergillus* sp. AMSO53 culturas em 14d a 25 °C: CYA verso (A), reverso (B); MEA verso (C), reverso (D) CREA (E); AO (F). Conídios (G). Conidióforos (H – K). Barra de escala = 10 μ m.

Comparando a descrição morfológica dos isolados de *Aspergillus* sp. AMSO53 com a descrição atualizada de *A. brevivanus* feita por Hubka *et al.*, 2015 observamos que eles se assemelham quanto a coloração nos meios MEA, CZ e não há produção de ácido no meio CREA. As colônias cresceram à 37 °C, porém não houve crescimento em 40 °C. Em CYA houve diferenças na coloração da colônia, no qual *A. brevivanus* apresentou colônias azul acinzentado escuro e esporulação com segmentos brancos, já *Aspergillus* sp. AMSO53 teve micélio branco e esporulação variando de amarelo laranja pálido a verde escuro. Houve também diferenças no tamanho das colônias em todos os meios avaliados (Tabela 7). Nas estruturas microscópicas foi possível notar diferenças também nos tipos de cabeça conidial, tipo e tamanho das vesículas, e tamanho das estipes e fialides (Tabela 8).

Tabela 7. Amplitude radial (mm) das colônias de *Aspergillus* sp. AMSO53 e *A. brevivanus*, em 14d, a 25 °C, nos meios CYA, MEA, CZ e CREA.

Amplitude radial das colônias		
Meio de Cultura	<i>Aspergillus</i> sp. AMSO53	<i>Aspergillus brevivanus</i> Hubka <i>et al.</i> , 2015
CYA	20 – 26	28 – 44
MEA	17 – 25	28 – 35
CZ	20 – 23	30 – 31
CREA	12 – 26	21 – 22

Tabela 8. Comparação das características microscópicas entre *Aspergillus* sp. AMSO53 e *Aspergillus brevijanans* Hubka *et al.*, 2015.

Espécies	<i>Aspergillus</i> sp. AMSO53	<i>Aspergillus brevijanans</i> Hubka <i>et al.</i> , 2015
Meios de cultura	MEA	MEA
Conidióforo	Unisseriado e Bisseriado	Bisseriado
Cabeça conidial	Radial e Colunar	Radial
Vesícula	Globosa, piriforme e espatulada	Piriformes a subclavadas
Vesícula C x L	2 – 6 (– 9) x 2 – 6 (– 8) μm	9 – 20 x 8 – 18 μm
Estipe C x L	(6 –)14 – 82 (– 100) x 2 – 4 μm	55 – 120 x 3 – 4,5 (– 6) μm
Fialide C	3 – 8 μm	4,5 – 6,5 μm
Conídios C x L	2 – 4 x 2 – 4 μm	(2,2 –) 2,5 – 3,1 (– 4) μm

Características Microscópicas

4 DISCUSSÃO

As alterações no Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas têm exigido a aplicação de apenas um nome para cada fungo, independentemente de sua reprodução sexuada ou assexuada (MCNEILL *et al.* 2012). Com a revisão do gênero, o nome *Trichoderma*, por ter sido atribuído primeiramente, obteve prioridade sobre *Hypocrea*, tendo suas espécies renomeadas (BISSETT *et al.*, 2015). Características morfológicas e fisiológicas dos fungos, como cor, crescimento da colônia, tipo de conidióforo, tamanho das fialides, conídios, clamidósporos, bem como a produção de odor e pigmentos solúveis, desempenham um papel importante na taxonomia, pois são utilizados para a descrição da espécie e a diferenciação entre seções ou gêneros. No entanto, muitos fungos possuem espécies crípticas, ou seja, espécies diferentes que são morfológicamente indistinguíveis. Portanto, a incorporação de métodos moleculares desempenha um papel crucial na discriminação dessas espécies (DRUZHININA *et al.*, 2010).

Atualmente, a abordagem polifásica, que integra características morfológicas, fisiológicas e filogenéticas, é a mais amplamente utilizada para identificar espécies (TAYLOR *et al.*, 2000). O método filogenético aplicado é a concordância genealógica, que utiliza genes não relacionados para buscar independência evolutiva nas linhagens. No presente trabalho, o isolado de *Trichoderma* descrito como uma nova espécie foi isolado da restinga da Guaibim, um ecossistema impactado pela ação antrópica, com poucos estudos voltados a conservação do ambiente. O isolado desse estudo pertence ao clado *Harzianum* que é o segundo maior em número de espécies, representando aproximadamente um quarto do gênero. Esse clado abriga um complexo de espécies intimamente relacionadas e que exibem pouca ou nenhuma diferenciação morfológica (CHAVERRI *et al.*, 2015). Nas comparações filogenéticas, as espécies mais próximas do isolado deste estudo foram *T. breve* e *T. zelobreve*, que foram inicialmente descritas na China. *T. zelobreve* difere de *T. breve* por possuir fialides mais curtas, conídios menores e uma taxa de crescimento maior (GU *et al.*, 2020). De acordo com Chen & Zhuang (2017), *T. breve* possui semelhanças morfológicas na colônia e taxa de crescimento com *T. Harzianum*, mas não está filogeneticamente relacionado a ele.

Uma dificuldade enfrentada na identificação e descrição de espécies fúngicas é além da presença de espécies crípticas ou com pouca variação morfológica, a falta de padronização, tanto nas descrições morfológicas, como é o caso de *T. breve* e *T. zelobreve* que são espécies próximas e mesmo assim, a caracterização micromorfológica foi feito em meios de cultura diferentes, dificultando assim a comparação entre as espécies. Além disso, a falta de padronização nas sequências depositadas no banco de dados, principalmente do gene *tefl* para espécies de *Trichoderma* também representa um problema. Sequências incompletas, ou apenas em regiões muito conservadas dificultam a discriminação da espécies e a interpretação da real história evolutiva. Portanto, as informações contidas no banco de dados devem ser curadas e usada com parcimônia para evitar erros de identificação.

As análises filogenéticas demonstraram que os isolados de *Aspergillus* estudados fazem parte da espécie *A. brevijanus*, que foi inicialmente descrita no México. Essa espécie não possui nenhum registro de ocorrência desde que foi descrita pela primeira vez. Além disso, *A. brevijanus* apresenta baixa identidade com as sequências das espécies mais próximas da seção, depositadas no NCBI (Tabela 9). Os isolados deste estudo representam o primeiro registro de ocorrência dessa espécie, sendo isolada do solo do cerrado baiano,

mostrando a importância da conservação do ambiente e de estudos de diversidade voltados a microbiota. Além disso, essa espécie apresenta aplicação biotecnológica, pois produz metabólitos que são utilizados como anti-helmíntico (LI *et al.*, 2022).

Tabela 9. Valores de identidade de *A. brevijanús* com espécies da seção *Jani*.

	Identidade com as espécies mais próximas		
	<i>Aspergillus brevijanús</i>		
	<i>BenA</i>	<i>CaM</i>	<i>rpb2</i>
<i>Aspergillus trisporus</i>	91,03%	87,95%	91,91%
<i>Aspergillus Jani</i>	80,36%	80,61%	88,15%

A. brevijanús era conhecida como *A. janús* variedade *brevis*, próxima de *A. janús*, e fazia parte da seção Flavipedes (VARGAS *et al.*, 2005). Entretanto, análise feitas por Peterson (2008) demonstraram que os isolados representavam linhagens distintas, dessa forma, a variedade foi elevada à classificação de espécie. Uma ementa na descrição da espécie foi feita por Hubka e colaboradores (2015). Eles também concluíram nesse trabalho que *A. janús* e *A. brevijanús* formavam um grupo separado de Flavipedes, e, portanto, propuseram a criação de uma nova seção chamada de *Jani*, no qual incluíram essas duas espécies. Posteriormente uma terceira espécies foi incluída nessa seção, *A. trisporus*, isolada no solo do Brasil (SOUZA *et al.*, 2019).

Apesar de representarem a mesma espécie, os isolados tiveram diferenças morfológicas principalmente quanto ao tamanho das colônias, sendo menores do que o *A. brevijanús* em todos os meios avaliados. As características microscópicas também apresentaram menores valores nas vesículas, estipes e fialides. Essas diferenças podem sugerir uma variação intraespecífica devido às diferentes condições ambientais. Entretanto, as sequências de *CaM* dos isolados desse estudo ficaram mais curtas devido ao uso de primers diferentes daqueles utilizados na descrição de *A. brevijanús*. A falta de uma parte mais variável desse gene pode resultar em diferenças filogenéticas, sendo necessária a adição dessa região para confirmação do resultado.

5 CONCLUSÃO

As análises morfológicas e filogenéticas indicam que *Trichoderma* sp. MON24 representa uma nova espécie de *Trichoderma* pertencente ao clado *Harzianum* e *Aspergillus* sp. AMSO53 T1 e *Aspergillus* sp. AMSO53 T2 representam o primeiro registro de ocorrência da espécie *Aspergillus brevijanous*, entretanto, em virtude da diferenças morfológicas, é necessário análises filogenéticas adicionais para confirmação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AZEEM, A M. *et al.* *Aspergillus*: Biodiversity, Ecological Significances, and Industrial Applications. *In: Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi*. p. 121-179, 2019.

BIZUKOJC, M.; LEDAKOWICZ, S. Physiological, morphological and kinetic aspects of lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus*. **Biotechnology journal**, v. 4, n. 5, p. 647-664, 2009.

BRACARENSE, A. A. P.; TAKAHASHI, J. A. Modulation of antimicrobial metabolites production by the fungus *Aspergillus arasiticus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 313-321, 2014.

CARBONE I.; Kohn L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous *ascomycetes*. **Mycologia**, v.91, p 553-556, 1999.

CHEN, K.; ZHUANG, E. Discovery from a large-scaled survey of *Trichoderma* in soil of China. **Nature**, p. 1-37, 2017.

DE CASTRO, A. P; *et al.* Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. **Archives of Microbiology**, v. 190, n. 2, p. 129-139, 2008.

- DOYLE, J. J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.
- DRUZHININA, I. S. *et al.* An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 10, p. 813-828, 2005.
- DRUZHININA, I.S.; KUBICEK, C.P. Familiar Stranger: Ecological Genomics of the Model Saprotroph and Industrial Enzyme Producer *Trichoderma reesei* Breaks the Stereotypes. **Advances in Applied Microbiology**, Academic Press, New York, vol 95. pp 69–1, 2016.
- FRAC, M. *et al.* Fungal biodiversity and their role in soil health. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 707, 2018.
- FRANÇOSO, R. D. *et al.* Habitat loss and the effectiveness of protected areas in the cerrado biodiversity hotspot. **Natureza & Conservação**, v. 13, n. 1, p. 35-40, 2015.
- GLASS, N. L.; DONALDSON, G.C. Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n.4, p. 1323–1330. 1995.
- GU, X. *et al.* Four new species of *Trichoderma* in the *Harzianum* clade from northern China. **MycologyKeys**, v. 73, p. 109-132, 2020.
- HONG, S. *et al.* Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 477–486, 2006.
- JAKLITSCH, W.M *et al.* *Hypocrea voglmayrii* sp. nov. from the Austrian Alps represents a new phylogenetic clade in *Hypocrea/Trichoderma*. **Mycologia**. v.97, p 1365–1378, 2005.
- KELLY, K.; JUDD, D., B. ISCC-NBS color-name charts illustrated with centroid colors. National Bureau of Standards circular, 1965.
- KEMENES, A. Distribuição espacial da flora terrestre fanerogâmica do Parque Nacional Marinho de Abrolhos, BA. **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, n 2. p. 141– 150, 2003.
- Li H, M. P M, *et al.* Discovery of brevijanazines from *Aspergillus brevijanans* reveals the molecular basis for p-nitrobenzoic acid in fungi. **Chemical Communications**, v. 58, n.43, p. 6296-6299, 2022.

- LIU, Y. J.; WHELEN, S.; HALL, B. D. Phylogenetic relationship among *ascomycetes*: evidence from na RNA polymerse II subunit. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 12, p. 1799-1808, 1999.
- MARTINS, M. L. L. Fitofisionomia das formações vegetais da Restinga da Área de Proteção Ambiental (APA) de Guaibim, Valença, Bahia, Brasil. **Revista brasileira de Biociência**, Porto Alegre, v. 10, n. 1, p. 66-73, 2012.
- MCNEILL J. *et al.* **International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants** (Melbourne Code), 2012.
- PASSOS, C. T. DOS *et al.* Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. isolada de um solo contaminado do sul do Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 950-954, 2009.
- PROCÓPIO, L.; BARRETO, C. The soil microbiomes of the Brazilian Cerrado. **Journal of Soils and Sediments**, v. 21, p. 2327-2342, 2021.
- RAVEENDRAN, S. *et al.* Applications of microbial enzymes in food industry. **Food technology and biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 16-30, 2018.
- SANO, S. M. *et al.* **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008.
- SANTOS, C. R.; MEDEIROS, J. D. A. A. ocupação humana das áreas de preservação permanente, vegetação fixadoras de dunas de Morro das Pedras, Santa Catarina - SC, Brasil. **Revista de Estudos Ambientais**, Blumenau, v. 5, n. 1, p. 22-41, 2003.
- SOUZA, S.C *et al.* *Aspergillus trisporus*: A new Jani section species from Brazilian soil. **Journal of Fungal Biology**, v.9, n.1, p. 175-186, 2019.
- STRASSBURG, B. B. N. *et al.* Moment of truth for the Cerrado hotspot. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, n. 4, p. 1-3, 2017.

CAPÍTULO 2: POTENCIAL PARA BIOCONTROLE DE
FITOPATÓGENOS POR TRÊS NOVAS ESPÉCIES DE *Trichoderma*

RESUMO

CONCEIÇÃO, TAINÁ DELMONDES SANTOS, Bacharelado em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 05 de 2023. Potencial para biocontrole de fitopatógenos por três novas espécies de *Trichoderma*. Orientador: Phellippe Arthur Santos Marbach.

O controle biológico é uma alternativa no manejo de doenças e pragas na agricultura, que visa reduzir a utilização de produtos químicos nocivos ao meio ambiente e à saúde humana. Fungos do gênero *Trichoderma* estão entre os microrganismos mais utilizados no controle biológico. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antagonístico *in vitro* de *Trichoderma* sp. nov. MTS17C, *Trichoderma* sp. nov. 49 e *Trichoderma* sp. nov. MTS29. Os fitopatógenos utilizados foram: *Aspergillus welwitschiae*, causador da podridão vermelha do sisal e *Moniliophthora perniciosa*, causador da vassoura de bruxa do cacauero. Para os ensaios de antagonismo, os fitopatógenos foram inoculados em meio ágar batata dextrose (BDA) a 8 cm de distância do agente de biocontrole. A produção de compostos voláteis inibidores de fungos fitopatogênicos foi avaliada inoculando os fitopatógenos em BDA no centro da placa, e em outra placa, o agente de biocontrole foi inoculado tanto em BDA quanto em ágar extrato de malte (MEA). As placas foram sobrepostas, seladas e incubadas em BOD à 25 °C. A avaliação da inibição foi feita comparando o crescimento da colônia na presença e ausência do agente de biocontrole. Os três isolados demonstraram potencial antagonístico contra os fitopatógenos testados, apresentando os mecanismos de antibiose e micoparasitismo. Esses resultados indicam a importância de explorar a diversidade de *Trichoderma*, uma vez que espécies diferentes possuem potencial biotecnológico a ser explorado na agricultura.

Palavras-chave: : Biocontrole; Funga; *Trichoderma*.

ABSTRACT

CONCEIÇÃO, TAINÁ DELMONDES SANTOS, Bacharelado em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 05 de 2023. Potential for biocontrol of phytopathogens by three new species of *Trichoderma*. Orientador: Phellippe Arthur Santos Marbach.

Biological control is an alternative in the management of diseases and pests in agriculture, which aims to reduce the use of chemicals that are harmful to the environment and human health. Fungi of the genus *Trichoderma* are among the microorganisms most used in biological control. The objective of this work was to evaluate the in vitro antagonistic potential of *Trichoderma* sp. nov. MTS17C, *Trichoderma* sp. nov. 49 and *Trichoderma* sp. nov. MTS29. The phytopathogens used were: *Aspergillus welwitschiae*, which causes red rot in sisal, and *Moniliophthora perniciosa*, which causes witches' broom in cacao. For the antagonism assays, the phytopathogens were inoculated in potato dextrose agar (PDA) medium 8 cm away from the biocontrol agent. The production of volatile compounds that inhibit phytopathogenic fungi was evaluated by inoculating the phytopathogens in PDA in the center of the plate, and in another plate, the biocontrol agent was inoculated both in PDA and in malt extract agar (MEA). The plates were overlaid, sealed and incubated in BOD at 25°C. The evaluation of the inhibition was made comparing the growth of the colony in the presence and absence of the biocontrol agent. The three isolates showed antagonistic potential against the phytopathogens tested, showing the mechanisms of antibiosis and mycoparasitism. These results indicate the importance of exploring the diversity of *Trichoderma*, since different species have biotechnological potential to be explored in agriculture.

Key-word: Biocontrol; Funga; *Trichoderma*.

1 INTRODUÇÃO

As restingas são ecossistemas pertencentes ao bioma Mata Atlântica que possuem diferentes formações vegetacionais e enfrentam temperaturas elevadas, períodos de seca e pouca disponibilidade de nutrientes no solo (ANDRADE, 2013; BRASIL, 1999). De acordo com a Resolução do CONAMA nº 261/1999 (BRASIL, 1999), as restingas formam um complexo vegetacional que depende mais da natureza do solo do que do clima, sendo encontradas em praias, cordões arenosos, dunas e terraços.

O solo das restingas é pobre em nutrientes, portanto, os fungos celulolíticos têm grande importância na contribuição de matéria orgânica desse ecossistema. No entanto, em comparação com os conhecimentos acerca da vegetação e da fauna das restingas, nota-se que o conhecimento sobre a microbiota é menor. A restinga é um ecossistema que sofre grande impacto causado pela ação antrópica, o que pode resultar na perda de grande parte da biodiversidade da microbiota com potencial biotecnológico (ANDRADE, 2013).

Os fungos do gênero *Trichoderma* são amplamente utilizados em diversas áreas da biotecnologia, como na produção de remédios, biocombustíveis, tintas e tecidos (DRUZHININA; KUBICEK, 2016). Além disso, espécies de *Trichoderma* são usadas como agentes de biocontrole para diversos fungos e nematoides que causam doenças em plantas (FERREIRA *et al.*, 2008). Os mecanismos de ação direta que tornam indivíduos desse gênero atrativos para o biocontrole variam desde competição, antibiose e micoparasitismo, além de induzirem resistência sistêmica a fitopatógenos (BETTIOL, 1991; HARMAN *et al.*, 2004; MEYAR *et al.*, 2019).

O sisal (*Agave sisalana*) é uma das principais fontes de fibras biodegradáveis e possui grande importância econômica no Brasil. No entanto, uma das principais doenças que afeta essa planta é a podridão vermelha do sisal, cujo agente etiológico é *Aspergillus welwitschiae*, um fungo oportunista com comportamento necrotrófico (DUARTE *et al.*, 2018). Outra doença que afeta a produção agrícola do Brasil, principalmente na Bahia, é a vassoura de bruxa do cacaueteiro (*Theobroma cacao*), causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (EVANS, 1981). Essa doença gerou impactos na Mata Atlântica e problemas sociais, como desemprego e êxodo rural (MICHEREFF, 2001).

Para controlar doenças em plantas, muitas vezes são utilizados defensivos agrícolas que tem efeitos nocivos a saúde e ao meio ambiente. Por esse motivo, a redução do uso desses produtos químicos tem sido incentivada e o uso de microrganismos para o

controle biológico se apresenta como uma alternativa viável para o manejo dessas doenças no campo (MEYAR *et al.*, 2019). Nesse sentido, é importante conhecer os microrganismos presentes no ambiente e estudar seu potencial biotecnológico.

Portanto, o objetivo deste capítulo é avaliar o potencial para biocontrole de fitopatógenos de três novas espécies do gênero *Trichoderma*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Os isolados *Trichoderma* sp. nov. MTS17C, *Trichoderma* sp. nov. MTS29 e *Trichoderma* sp. nov. 49 representam novas espécies de *Trichoderma* e foram utilizados como agentes de biocontrole nos experimentos. Estes isolados são pertencentes à coleção do Laboratório de Biologia Evolutiva (LABEV) localizado na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). *Trichoderma* sp. nov. MTS17C e *Trichoderma* sp. nov. MTS29 fazem parte do clado *Spirale* e *Chlorosporum*, respectivamente, e foram isolados de serrapilheira da Formação Arbustiva Aberta da Área de Proteção Ambiental (APA) da Restinga de Guaibim, Bahia (13° 16' 10"S 38° 57' 33" W), já *Trichoderma* sp. nov. 49, pertence ao clado *Spirale*, e foi isolado de folhas coletadas em ninhos de formiga (*Atta sexdens rubropilosa*) na Mata do Seu Nico (Fazenda Bonsucesso) em Viçosa, Minas Gerais, (20°45'23"S 42°52'23"W) pelo grupo de pesquisadores da Universidade Federal de Viçosa (UFV) (ROCHA *et al.*, 2017).

2.2 ENSAIOS DE CULTURA PAREADA E COMPOSTOS VOLÁTEIS

Os ensaios de cultura pareada e produção de compostos voláteis foram realizados de acordo com Magalhães *et al.*, (2017), utilizando *Aspergillus welwitschiae*, agente etiológico da podridão vermelha do sisal e *Moniliophthora perniciosa*, causador da vassoura de bruxa do cacauero.

Foram feitas suspensões de esporos de 1,0 mL de ágar-água dos isolados utilizando

5 µl parainoculação, com exceção da *M. Perniciosa*, no qual utilizou-se disco de 5 mm de diâmetro do micélio feito com colônias crescidas previamente entre 10 à 12 dias. Para os testes de cultura pareada, os fitopatógenos foram inoculados em meio batata dextrose e agar (BDA) na placa de Petri a 8 cm de distância dos agentes antagonistas. As placas foram seladas com 2 voltas de papel filme, e em seguida, foram incubadas em BOD a 25 °C.

Já para os ensaios de compostos voláteis, os fitopatógenos foram inoculados em BDA no centro da placa de Petri, e em outra placa, o agente de biocontrole foi inoculado em dois meios diferentes: extrato de malte (MEA) e BDA. Em seguida, as placas com os fitopatógenos e os agentes de biocontrole foram sobrepostas e seladas com 6 voltas de papel filme para formar uma atmosfera compartilhada, e posteriormente foram incubadas em BOD a 25 °C.

Para os dois testes realizados, os fitopatógenos e os agentes de biocontrole cultivados isoladamente nas mesmas condições foram usados como controle experimental. A avaliação da inibição dos fitopatógenos foi feita comparando o crescimento do fitopatógeno na presença e na ausência do agente de biocontrole ou dos compostos voláteis produzidos. O percentual de inibição foi avaliado no último dia de cada experimento, utilizando médias e seguindo a fórmula: $\left(1 - \frac{\text{Média do tratamento}}{\text{Média do controle}}\right) \times 100$.

Ambos experimentos tiveram quatro repetições cada, e foram integralmente repetidos duas vezes. Nos ensaio de cultura pareada, o teste t studente foi feito no BioEstat 5.3 para avaliar a diferença entre as médias a 5% de significância, já para os ensaios de compostos voláteis, foi feito o teste de Tukey a 5% de significância.

3 RESULTADOS

3.1 ENSAIOS DE CULTURA PAREADA

Os ensaios de cultura pareada demonstraram que os isolados de *Trichoderma* apresentaram um rápido crescimento inibindo o avanço micelial dos dois fitopatógenos testados. Esse padrão de competição foi o mais observado, com exceção de *Trichoderma* sp. nov. MTS29, no qual apresentou um halo de inibição indicando antibiose na presença de *A. welwitschiae* (Figura 5).

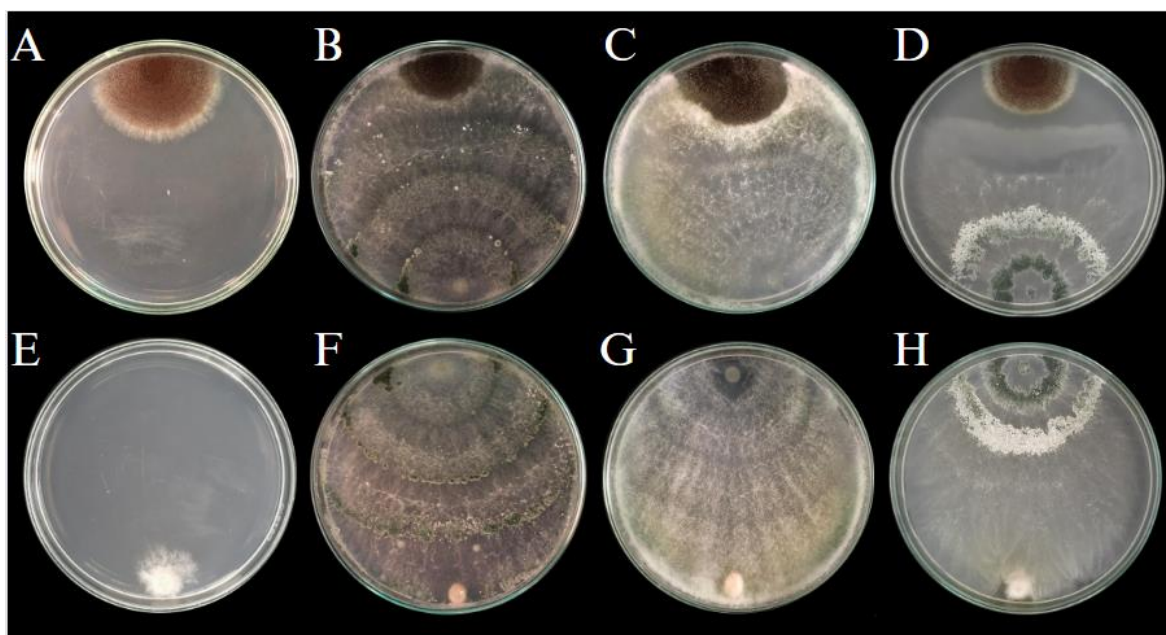


Figura 5. Ensaio de cultura pareada. Controles: *A. welwitschiae* (A) e *M. perniciososa* (E). Tratamentos: *Trichoderma* sp. nov. MTS17C contra *A. welwitschiae* (B) e *M. perniciososa* (F); *Trichoderma* sp. nov. 49 contra *A. welwitschiae* (C) e *M. perniciososa* (G); *Trichoderma* sp. nov. MTS29 contra *A. welwitschiae* (D) e *M. perniciososa* (H).

O resultado dos experimentos indicou que a presença dos agentes de biocontrole reduziu o crescimento micelial dos dois fitopatógenos (Figura 6). O isolado *Trichoderma* sp. nov. MTS17C inibiu significativamente *A. welwitschiae* no quinto dia, já contra *M. perniciososa*, a diferença foi observada no quarto dia (Figura 6. A). *Trichoderma* sp. nov. 49 inibiu os dois fitopatógenos somente a partir do quinto dia. Foi possível notar que *A. welwitschiae* na presença do *Trichoderma* apresentou maior crescimento no segundo dia, indicando que *Trichoderma* pode ter produzido substâncias difusíveis no meio que tenha estimulado o crescimento de *A. welwitschiae* (Figura 6. B). O isolado *Trichoderma* sp. nov. MTS29 apresentou inibição significativa contra *A. welwitschiae* no terceiro dia, já contra *M. perniciososa*, se mostrou mais eficiente, sendo significativo a partir do segundo dia (Figura 6. C).

Os agentes de biocontrole *Trichoderma* sp. nov. MTS17C e *Trichoderma* sp. nov. 49 foram mais eficazes na inibição de *A. welwitschiae* e *M. perniciososa*, respectivamente, em comparação com *Trichoderma* sp. nov. MTS29, mesmo que este último tenha apresentado a inibição mais precoce para ambas as espécies. O percentual de inibição mais alto foi observado para *Trichoderma* sp. nov. MTS17C contra *A. welwitschiae*, com 23,10%, enquanto para *M. perniciososa*, *Trichoderma* sp. nov. 49 mostrou melhor inibição (Tabela 9).

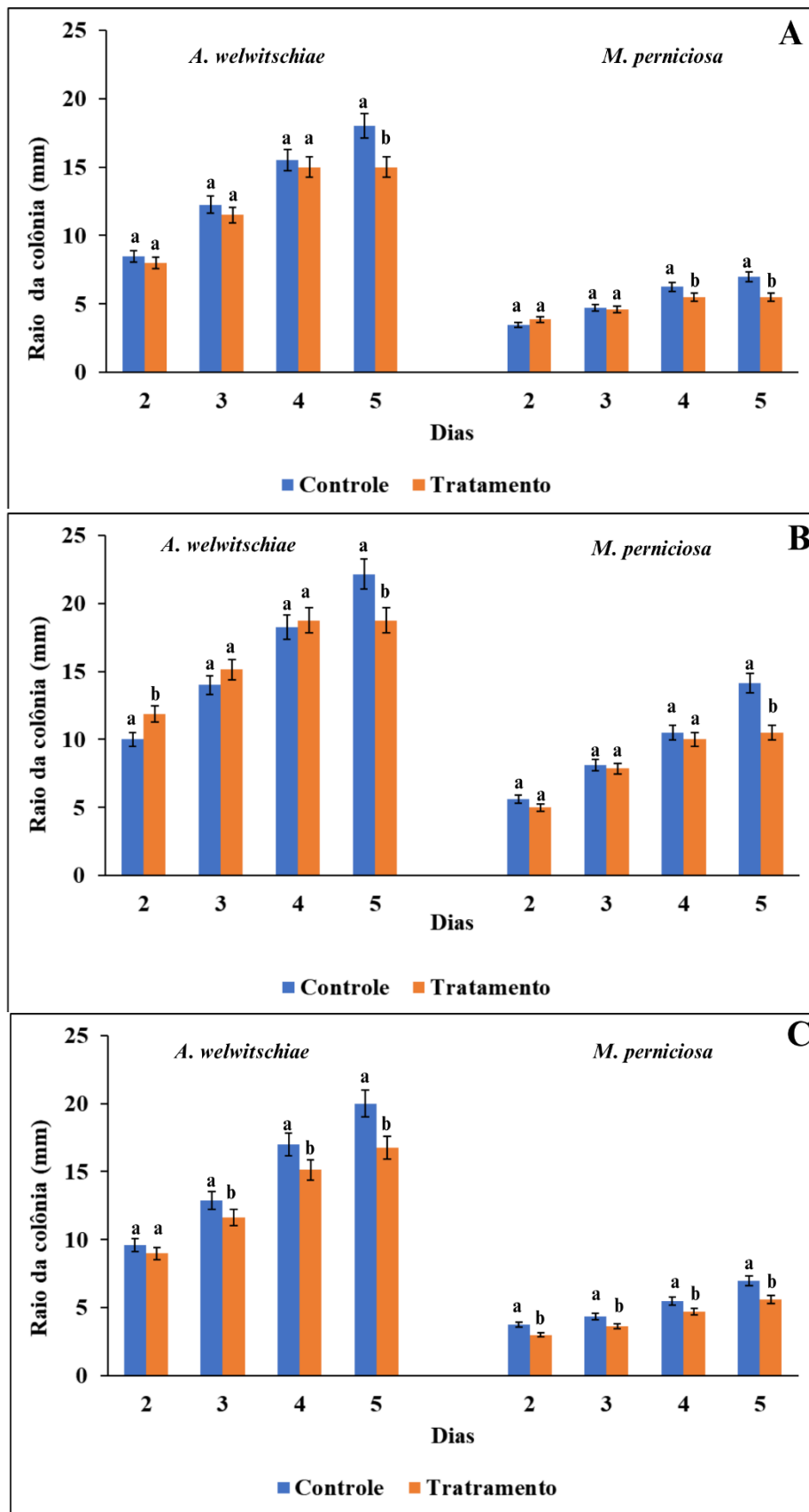
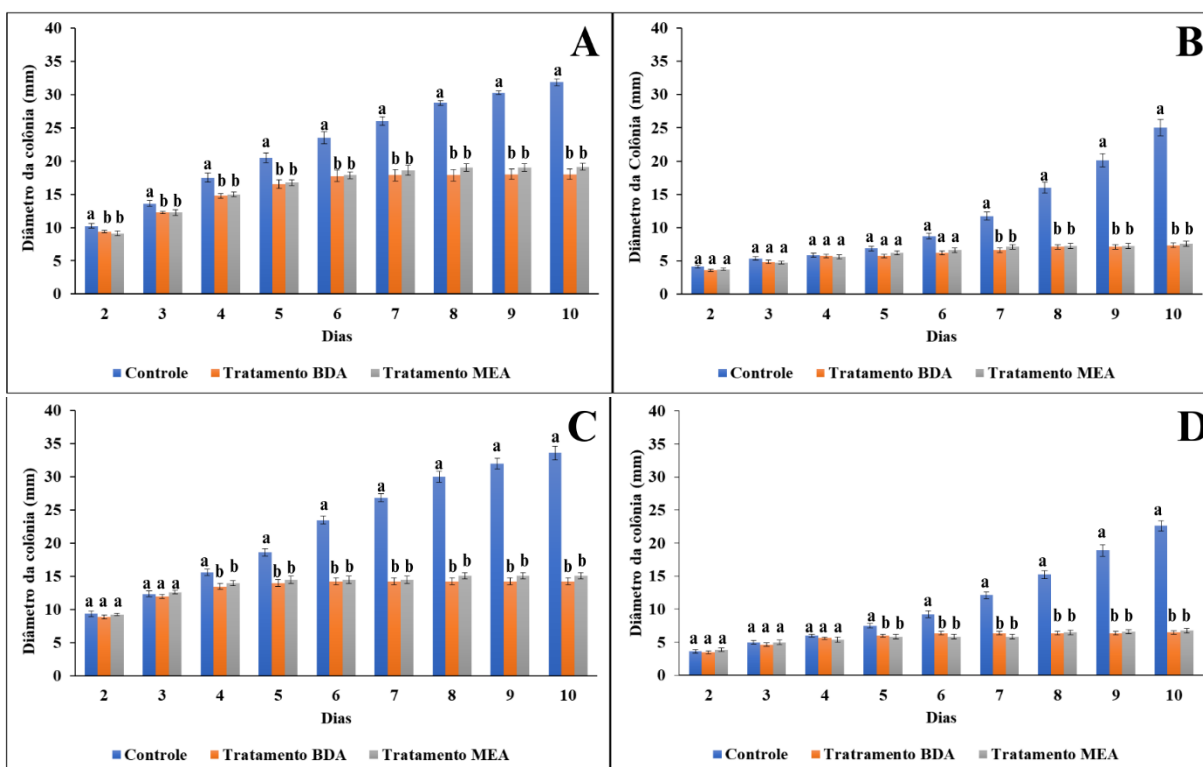


Figura 6. Ensaio de cultura pareada. Controle: fitopatógeno crescendo na ausência do agente de biocontrole. Tratamento: fitopatógeno crescendo na presença do agente de biocontrole. *Trichoderma* sp. nov. MTS17C (A); *Trichoderma* sp. nov. 49 (B); *Trichoderma* sp. nov. MTS29 (C).

3.2 ENSAIOS DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

Os três isolados foram eficientes na produção de compostos voláteis, resultando na redução do crescimento micelial dos dois fitopatógenos nos meios MEA e BDA testados (Figura 7). *Trichoderma* sp. nov. MTS17C obteve um melhor desempenho na inibição de *A. welwitschiae*, reduzindo significativamente o crescimento micelial já no segundo dia (Figura 7. A). Em relação *M. pernicioso*, a diferença foi somente a partir do sétimo dia (Figura 7. B). *Trichoderma* sp. nov. 49 também foi eficiente na inibição dos fitopatógenos, com diferença significativa no quarto dia para *A. welwitschiae* e no quinto dia para *M. pernicioso* (Figura 7. C – D). Já o isolado *Trichoderma* sp. nov. MTS29 foi capaz de inibir significativamente o crescimento dos fitopatógenos a partir do quinto dia para o meio BDA. No entanto, no meio MEA, a inibição somente foi significativa a partir do sexto dia para *A. welwitschiae* e no oitavo dia para *M. pernicioso* (Figura 7. E – F).

Observou-se variação nos percentuais de inibição dos fitopatógenos de acordo com o meio de cultura utilizado. No entanto, exceto por *Trichoderma* sp. nov. MTS29, que apresentou melhor desempenho na inibição de *M. pernicioso* em meio BDA, essas diferenças entre os meios testados não foi significativa. *Trichoderma* sp. nov. 49 foi o isolado que apresentou melhor inibição dos dois fitopatógenos em ambos os meios de cultura avaliados, seguido por *Trichoderma* sp. nov. MTS17C (Tabela 10).



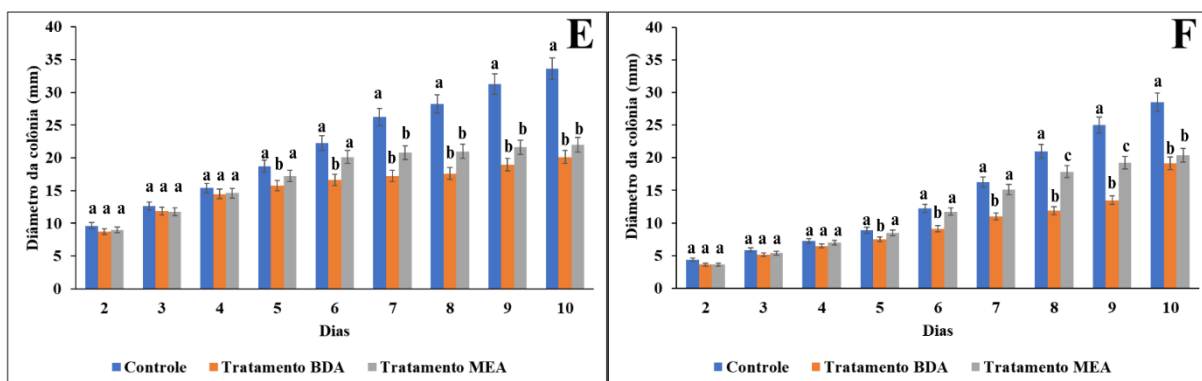


Figura 7. Atividade de compostos voláteis contra *A. welwitschiae* e *M. perniciosa*. Controle: fitopatógeno crescendo na ausência dos voláteis do agente de biocontrole; Tratamento BDA: fitopatógeno crescendo na presença dos voláteis do agente de biocontrole em meio BDA; Tratamento MEA: fitopatógeno crescendo na presença dos voláteis do agente de biocontrole em meio MEA. *Trichoderma* sp. nov. MTS17C contra *A. welwitschiae* (A). *Trichoderma* sp. nov. MTS17C contra *M. perniciosa* (B). *Trichoderma* sp. nov. 49 contra *A. welwitschiae* (C). *Trichoderma* sp. nov. 49 contra *M. perniciosa* (D). *Trichoderma* sp. nov. MTS29 contra *A. welwitschiae* (E). *Trichoderma* sp. nov. MTS29 contra *M. perniciosa* (F).

Tabela 10. Percentual de inibição micelial dos fitopatógenos no 10º dia.

Ensaio de Cultura Pareada			
	<i>Trichoderma</i> sp. nov. MTS17C	<i>Trichoderma</i> sp. nov. 49	<i>Trichoderma</i> sp. nov. MTS29
<i>A. welwitschiae</i>	22,07%	15,25%	16,25%
<i>M. perniciosa</i>	21,43%	25,66%	19,64%
Ensaio de Compostos Voláteis			
Meio BDA			
	<i>Trichoderma</i> sp. nov. MTS17C	<i>Trichoderma</i> sp. nov. 49	<i>Trichoderma</i> sp. nov. MTS29
<i>A. welwitschiae</i>	43,53%	57,62%	40,15%
<i>M. perniciosa</i>	70,50%	71,27%	32,89%
Meio MEA			
	<i>Trichoderma</i> sp. nov. MTS17C	<i>Trichoderma</i> sp. nov. 49	<i>Trichoderma</i> sp. nov. MTS29
<i>A. welwitschiae</i>	40%	55,01%	34,57%
<i>M. perniciosa</i>	69,50%	70,16%	28,50%

4 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a biotecnologia tem se interessado pelo estudo do gênero *Trichoderma*, especialmente no contexto da agricultura, devido aos benefícios que esse gênero pode proporcionar às plantas, como ação de biofertilizante e promoção do crescimento vegetal (SILVA *et al.*, 2022). Vários estudos demonstraram a eficácia de espécies desse gênero no controle de fitopatógenos, utilizando mecanismos de ação direta, como competição, parasitismo e antibiose (ETHUR *et al.*, 2001; MAKETON *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2009; MARRASCHI *et al.*, 2018; SOUSA *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2022).

Uma das características mais atrativas de *Trichoderma* é o seu rápido crescimento, o que o torna promissor para uso na agricultura (BETTIOL, 1991; MEYER, 2019). Nos ensaios de cultura pareada, observou-se que os isolados de *Trichoderma* cresceram rapidamente, e na maioria dos casos, cobriu a colônia dos fitopatógenos, podendo indicar uma estratégia de micoparasitismo. Esse mecanismo envolve a colonização e destruição do patógeno por meio da invasão do micélio de *Trichoderma* no tecido do fitopatógeno, ou por meio da produção de enzimas extracelulares que causam a lise celular do agente patogênico (BETTIOL, 1991; TYSKIEWICZ *et al.*, 2022). O micoparasitismo tem grande importância em espécies utilizadas como produto de biocontrole, como *Trichoderma harzianum* (CHAVERRI *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2022).

Foi observado antibiose em *Trichoderma* sp. nov. MTS29 na presença de *A. welwitschiae*. A antibiose é a inibição do crescimento ou viabilidade de um organismo por meio de compostos antimicrobianos produzidos por outro organismo. *Trichoderma* produz uma variedade de metabólitos secundários que possuem atividade antimicrobiana contra patógenos de plantas. Esses compostos podem agir diretamente no patógeno, interferindo em sua estrutura celular, inibindo seu crescimento ou causando sua morte (BETTIOL, 1991; MEYER *et al.*, 2019; TYSKIEWICZ *et al.*, 2022).

Os compostos voláteis são metabólitos secundários com potencial de biocontrole, que podem ser explorados na agricultura (MINERDI *et al.*, 2009; MAGALHÃES *et al.*, 2017; MOYA *et al.*, 2018). Esses compostos incluem álcoois, ésteres, cetonas e terpenos, entre outros, que são liberados para o ambiente e podem interagir com outras espécies de fungos presentes no solo, incluindo patógenos de plantas. Por exemplo, estudos mostraram

que o compostos voláteis como 6-pentil- α -pirona (6-PP), dissulfeto de dimetila, dibenzofurano e metanodiol produzido por *Trichoderma* atua como agente antifúngico, inibindo o crescimento de fungos fitopatogênicos (CASTILLO *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2016; ZEILINGER *et al.*, 2016).

Os resultados dos testes indicaram que a produção desses compostos inibiu o crescimento da colônia dos dois fitopatógenos. Além disso, em relação ao percentual de inibição, os testes de compostos voláteis foram mais eficientes do que os de cultura pareada. Os isolado *Trichoderma* sp. nov. MTS17C e *Trichoderma* sp. nov. 49 que pertencem ao clado *Spirale* foram mais eficientes do que o isolado que pertence ao clado *Chlorosporum*. Embora ainda haja muito a ser investigado sobre a eficácia do controle biológico utilizando compostos voláteis produzidos por *Trichoderma*, os resultados dos estudos sugerem que a produção desses compostos pode ser uma estratégia importante para melhorar a eficácia do controle biológico.

5 CONCLUSÃO

Os isolados que representam novas espécies de *Trichoderma* mostraram capacidade de inibir o crescimento micelial tanto de *Aspergillus welwitschiae* quanto de *Moniliophthora perniciosa*, utilizando mecanismos de antibiose tanto em compostos difusíveis quanto voláteis, o que sugere seu potencial para serem explorados em termos de biocontrole.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, J. **Fungos Celulolíticos Da Formação Arbustiva Aberta Da Restinga De Guaibim, Bahia**. 2013. 90 p. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola.) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2013.

BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças em plantas**. Jaguariuna, SP: Embrapa, P 388, 1991.

BRASIL. Resolução do CONAMA n. 261, de 30 de junho de 1999. Define os parâmetros básicos para análise dos estágios sucessionais de vegetação de restinga para o Estado de Santa Catarina. 1999.

CASTILLO, F.D.H. *et al.* *In Vitro* Antagonist Action of *Trichoderma* Strains Against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**. v. 6, n.3, p. 410-417, 2011.

CHAVERRI, P. *et al.* Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the reidentification of commercial biocontrol strains. **Mycologia**, v. 107, n. 3, p. 558–590, 2015.

CHEN, J.L. *et al.* Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. **Journal of Ginseng Research**, v, 40, n 4, p 315- 324, 2016.

DRUZHININA, I.S.; KUBICEK, C.P. Familiar Stranger: Ecological Genomics of the Model Saprotroph and Industrial Enzyme Producer *Trichoderma reesei* Breaks the Stereotypes. **Advances in Applied Microbiology**, Academic Press, New York, vol 95. P. 69–1, 2016.

DUARTE, E. A. A. *et al.* Putting the mess in order: *Aspergillus welwitschieae* and not *A. niger* is the etiological agent of sisal bole rot disease in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n.1, p. e.1227, 2018.

ERTHUR, L. *et al.* SELEÇÃO DE *Trichoderma* spp. Visando Ao Controle De *Sclerotinia sclerotiorum*, in vitro. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 885887, 2001.

EVANS, H. C. **Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora (Monilia) roreri***. Commonwealth Mycological Institute. Phytopathological Papers, n.24, p. 44, 1981.

FERREIRA, P. A.; LOPES, E.; FREITAS, L. G. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. **Trópica–Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 2, n. 3, p. 15-21, 2008.

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 190-194, 2006.

MAGALHÃES, V. C *et al.* *Burkholderia* isolates from a sand dune leaf litter display biocontrol activity against the bole rot disease of *Agave sisalana*. **Biological Control**, p. 41- 48, 2017.

MAKETON, M. *et al.* Greenhouse Evaluation of *Bacillus subtilis* AP01 And *Trichoderma harzianum* AP001 In Controlling Tobacco Diseases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 296300, 2008.

MEYER, M. *et al.* **Trichoderma Uso na Agricultura**. 1. ed. Brasília,DF: Embrapa, P 538, 2019.

MICHEREFF, S. **Fundamentos de Fitopatologia**. Recife, PE: 2001. 150 p.

MINERDI, D. *et al.* Volatile organic compounds: a potential direct long-distance mechanism for antagonistic action of *Fusarium oxysporum* strain MSA 35. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 844–854, 2008.

MOYA, P. *et al.* Antifungal activity of *Trichoderma* VOCs against *Pyrenophora teres*, the causal agent of barley net blotch. **Journal of Plant Protection Research**, v. 58, n. 1, p. 45–53, 2018.

ROCHA, R. *et al.* Selection of Endophytic Fungi from Comfrey (*Symphytum officinale* L.) For *In Vitro* Biological Control of The Phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 7378, 2009.

ROCHA, S. L. *et al.* Recognition of endophytic *Trichoderma* species by leaf-cutting ants and their potential in a Trojan-horse management strategy. **Royal Society Open Science**, v. 4, p. 1- 14, 2017.

SILVA, L. *et al.* *Trichoderma*: Suas Interações E Uma Abordagem Metodológica aplicada ao Estudo de Compostos Orgânicos Voláteis para o Mofo Branco e Promoção de Crescimento De Plantas. **Revisão Anual de Patologia em Plantas**, v. 28, n. 7, p. 163-183, 2022.

SOUSA, W. N. *et al.* Evaluation of *Trichoderma* spp. Isolates in Cocoa Seed Treatment and Seedling Production. **Plants**, v. 10, p. 210, 2021.

TYSKIEWICZ, R. *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 4, n. 2329, p 1- 28, 2022.

ZEILINGER, S. *et al.* Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics. **Fungal Biology Reviews**, v. 30, n. 2, p 74-90, 2016.