



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



DIVERSIDADE DE ISOLADOS DE *Trichoderma* DO CLADO
Harzianum DA RESTINGA DE GUAIBIM, BA

DJALMA SANTANA NETO

Cruz das Almas
Agosto, 2022

DIVERSIDADE DE ISOLADOS DE *Trichoderma* DO CLADO
Harzianum DA RESTINGA DE GUAIBIM, BA

DJALMA SANTANA NETO

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: Prof. Phellippe Arthur Santos
Marbach

Cruz das Almas
Agosto, 2022

TERMO DE APROVAÇÃO DO TRABALHO DE
CONCLUSÃO DE CURSO

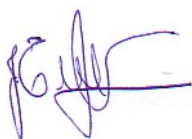
Nome do Aluno

“DIVERSIDADE DE ISOLADOS DE *Trichoderma* DO CLADO
Harzianum DA RESTINGA DE GUAIBIM, BA”

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Phellippe Arthur Santos Marbach - Orientador
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza
Universidade Federal de Lavras



Prof. Dr. Valter Cruz Magalhães
Universidade Federal de Lavras

CRUZ DAS ALMAS
Agosto - 2022

AGRADECIMENTOS

À Deus, os Orixás, em especial a Ogum, e guias espirituais que me guiaram e me fortaleceram nessa jornada.

À UFRB pela estrutura e realização do curso.

À CAPES e CNPQ pelo apoio a pesquisa e concessão de bolsa.

À minha mãe, pai, avó e toda família pelo apoio e ajuda.

Ao meu pai de santo Paulo Sérgio, Éder Souza e toda minha família de santo, por todo cuidado, ensinamento e apoio.

Ao professor Phellippe pela orientação, ensinamento e amizade durante a graduação.

À Jackeline por todo apoio, ensinamento e suporte.

À minha amiga Talita, que tanto me ajudou e apoiou nessa jornada.

À minhas amigas/irmãs que a vida me proporcionou Juliana e Lan <3, não sei o que seria desses anos sem vocês.

As amigas Criszinha e Harisson (Vera Lúcia), por todos os dias de alegria.

À toda equipe do LABEV: Gabriel, Gilcimara, Lenon, Lucas, Matheus e em especial Tainá.

Em especial ao meu amigo Lahiri e Dona Ana que me ajudaram e apoiaram bastante.

Ao meu grupo de amigos que me acompanharam nessa jornada Carl, Carol, Gabriel, Leila, Lincoln e Nicole.

E a todos meus amigos Iza, Larissa, Lílian e Marcela.

Aos professores, técnicos e funcionários que contribuíram para realização dos meus estudos e trabalhos.

À todos que de alguma forma contribuíram na realização dessa grande conquista.

SANTANA NETO, Djalma, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia de 2022.
DIVERSIDADE DE ISOLADOS DE *Trichoderma* DO CLADO *Harzianum* DA RESTINGA DE GUAIBIM, BA. Orientador: Phellippe Arthur Santos Marbach.

RESUMO

Em geral, os estudos sobre a diversidade biológica das restingas são limitados à fauna e flora e o conhecimento sobre a diversidade microbiana desse ecossistema é limitado a poucos estudos sobre fungos micorrízicos e leveduras. Devido às ações antrópicas, grupos taxonômicos estão sendo perdidos sem sequer ser conhecida sua importância biotecnológica. O objetivo desse trabalho foi estudar a diversidade genética de 32 isolados de fungos do gênero *Trichoderma* coletados na mata e moita peridiodicamente inundada da restinga de Guaibim – BA, e estudar a filogenia desses fungos. O estudo de diversidade genética usando o *primer* BOX A 1R mostrou a existência de 12 perfis genéticos distintos entre os 32 isolados de *Trichoderma* analisados. Os 12 perfis remanescentes foram representados por um isolado por perfil. Estes isolados ficaram distribuídos em grupos distintos no dendrograma de similaridade genética obtidos pelo método de agrupamento UPGMA e coeficiente Jaccard a partir dos perfis genéticos do BOX-PCR. Para filogenia molecular o gene barcode *tef-1* (Fator de alongamento 1 alfa) e *rpb2* (segunda maior subunidade da RNA polimerase) foi sequenciado e comparados com genes ortólogos dos tipos das espécies depositados na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). A identificação molecular de 12 isolados revelou que eles são relacionados com espécies do Clado *Harzianum*, próximos aos isolados *Trichoderma breve* e *Trichoderma zelobreve* e representam no mínimo 3 espécies novas.

Palavras chave: BOX-PCR, *Harzianum*, *tef-1*, *rpb2*

SANTANA NETO, Djalma, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia de 2022.
DIVERSITY OF ISOLATES OF *Trichoderma* FROM THE CLADE *Harzianum* FROM THE RESTINGA DE GUAIBIM, BA. Advisor: Phellippe Arthur Santos Marbach.

ABSTRACT

In general, studies on the biological diversity of restingas are limited to fauna and flora and knowledge about the microbial diversity of this ecosystem is limited to few studies on mycorrhizal fungi and yeasts. Due to anthropic actions, taxonomic groups are being lost without even knowing their biotechnological importance. The objective of this work was to study the genetic diversity of 32 isolates of fungi of the genus *Trichoderma* collected in the periodically flooded forest and thicket of the restinga of Guaibim - BA, and to study the phylogeny of these fungi. The genetic diversity study using the BOX A 1R primer showed the existence of 12 distinct genetic profiles among the 32 *Trichoderma* isolates analyzed. The 12 remaining profiles were represented by one isolate per profile. These isolates were distributed in distinct groups in the genetic similarity dendrogram obtained by the UPGMA clustering method and Jaccard coefficient from the BOX-PCR genetic profiles. For molecular phylogeny, barcode gene *tef-1* (Elongation factor 1 alpha) and *rpb2* (second largest subunit of RNA polymerase) were sequenced and compared with orthologous genes of types species deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database.). The molecular identification of 12 isolates revealed that they are related to species of the Clade *Harzianum*, close to the isolates *Trichoderma breve* and *Trichoderma zelobreve* and represent at least 3 new species.

Keyword: BOX-PCR, *Harzianum*, *tef-1*, *rpb2*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
2.1 Ecossistema Restinga.....	9
2.2 Gênero <i>Trichoderma</i>	10
2.3 Importância Biotecnológica do gênero <i>Trichoderma</i>	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Microrganismos	13
3.2 Extração de DNA.....	13
3.3 Estudo de variabilidade genética	14
3.4 Dendograma de similaridade.....	14
3.5 Desenho do <i>primer</i> TEF1-R2.....	14
3.6 Amplificação, Purificação e Sequenciamento.....	15
3.7 Análises Filogenéticas.....	16
4.0 RESULTADOS.....	16
5.0 DISCUSSÃO.....	27
6.0 CONCLUSÃO.....	29
7.0 REFERÊNCIAS.....	30

1 INTRODUÇÃO

A restinga é um conjunto de ecossistemas que compreende dezenas de comunidades vegetais florísticas e fisionomicamente distintas, situadas em terrenos predominantemente arenosos (Resolução do CONAMA N° 261/1999). As formações vegetacionais da restinga estabilizam o sedimento arenoso que compõem o solo e também funcionam como refúgio para nidificação e proteção da fauna residente e para a fauna migratória.

A restinga é um ecossistema delicado presente em grande parte do litoral brasileiro, e mesmo sendo uma Área de Proteção Ambiental – APA, tem sido constantemente afetado por ações antrópicas, como expansão imobiliária, depósitos de lixo e desmatamento de área para fins comerciais, como carcinicultura, o que causa impactos ambientais. (BARCELOS et al., 2012; LACERDA; ARAÚJO; MACIEL, 1993).

O solo da restinga é pobre em nutrientes, portanto a ação da microbiota celulolítica é especialmente importante, pois ela contribui para a mineralização da matéria orgânica vegetal e, conseqüentemente, o aporte de nutrientes no solo desse ambiente (BINDSCHIEDLER; CAILLEAU; VERRECCHIA, 2016). Além de desempenhar outras funções, como ocorre com os fungos do gênero *Trichoderma*, que suprimem doenças no solo, induzem o crescimento das plantas e induzem resistência das plantas contra patógenos (BROTMAN et al., 2013; CHAGAS et al., 2017; RESENDE et al., 2003; ZEILINGER et al., 2016).

Na literatura existem diversos estudos relacionados a composição florísticas em ambientes da restinga, como os descritos por Araújo & Lacerda, 1987; Leite & Andrade, 2004; Bourschid & Reis, 2010; Carvalho & Sá, 2011; Menezes et al., 2012; Martins, 2012. Apesar da importância central da microbiota celulolítica nas restingas, estudos relacionados a diversidade genética de microrganismos são escassos, limitando-se apenas a fungos micorrízicos e leveduras, o que indica que fungos filamentosos, como os do gênero *Trichoderma*, são poucos conhecidos nessa região, assim, estudar a diversidade genética de microrganismos destas regiões possibilita o registro de ocorrência e a descrição de novas espécies.

Os fungos do gênero *Trichoderma* tem importância biotecnológica para o biocontrole, em muitos casos substituindo o uso de agrotóxicos e fungicidas, auxiliando no desenvolvimento da agricultura sustentável (BRITO; MILLER; STADNIK, 2010; GALARZA et al., 2015). Isso mostra a importância de preservar a biodiversidade de ecossistemas vulneráveis, como as restingas, uma vez que se compreende a função de *Trichoderma* na ciclagem de nutrientes e nas

complexas interações dentro da biota do solo (HARMAN et al., 2004; HOYOS-CARJAVAL & BISSET, 2011).

Portanto, o objetivo desse trabalho é estudar a diversidade genética e filogenia de fungos do gênero *Trichoderma* da restinga de Guaibim, BA. O estudo contribuirá para aumentar o conhecimento sobre a biodiversidade de fungos celulolíticos da região, podendo assim estimular a sua preservação e a conservação das restingas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ecossistema Restinga

As restingas são regiões próximas a linha da costa, compondo os territórios de praias, cordões arenosos, dunas e depressões, oriundas de processos de sedimentação. (MONTEZUMA, ARAÚJO, 2007). São ambientes formados recentemente nos processos geológicos, no período do quartenário, provenientes de transgressões e regressões marinhas (BARCELOS et al., 2012; MENEZES et al., 2012).

Constituem o bioma de mata Atlântica, sobre as planícies arenosas costeiras, podendo estar próximas ou associadas a outras regiões que fazem parte desse bioma, como os mangues e os tabuleiros arenosos (SILVA et al., 2004).

As restingas são Áreas de Preservação Permanente (APPs), segundo o Código Florestal (Lei Federal nº 4771), pela resolução n.º 303/2002 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e por estar associada ao bioma da Mata Atlântica.

O solo das restingas são compostos por aproximadamente 95% de areia, variando de espodossolo e neossolo quartzarênicos. São pobres em nutrientes e com alto nível de salinidade e acidez, além de passarem por constantes fases de encharcamento, seja por chuva ou por mudanças nos níveis da maré (EMBRAPA, 2006, GOMEZ *et al.*, 2007).

As comunidades vegetacionais são influenciadas pela costa marinha, nas regiões próximas ao mar crescem plantas do tipo herbácea, com até 1 metro de altura. Em seguida, devido a estabilidade do solo, crescem as arbustivas, de 1 m até 5 m de altura. Por fim, as arbóreas, com árvores entre 5 m e 20 m de altura (MARTINS *et al.*, 2008; MONTEZUMA, ARAÚJO, 2007).

O litoral brasileiro tem aproximadamente 9000 km de extensão, dos quais, aproximadamente 5000 km são constituídos por restingas (HOLZER; CRICHYNO; PIRES, 2004). Sua delimitação ocorre de forma distinta, pois, sua formação é descontínua e reduzida a

fragmentos ou manchas de vegetação (REIS, 2006). As restingas tem sido constantemente afetadas por ações antrópicas, como expansão imobiliária, depósitos de lixo e desmatamento de área para fins comerciais, como carcinicultura, o que causa impactos ambientais, tornando-o instável e diferente de outros ambientes, devido a alterações de efeitos naturais e antrópicos, o que ocasiona constantes modificações (BARCELOS et al., 2012).

2.2 Gênero *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* pertencente ao Filo *Ascomycota*, Classe *Sordariomycetes*, subclasse *Hypocreomycetidae*, Ordem *Hypocreales* e Família *Hypocreaceae* (DRUZHININA; SHELEST; KUBICEK, 2012; RAJESH; RAHUL; AMBALAL, 2016). Descrita inicialmente por Persoon, em 1794, atualmente o gênero *Trichoderma* conta com aproximadamente 500 espécies (INDEX FUNGORUM, 2022).

São fungos que possuem pleomorfismo, ou seja, tem ciclo de vida composto por duas fases, apresentando características morfológicas distintas em cada ciclo. A fase anamorfa, determinada *Trichoderma*, compreende a fase assexuada. E a fase teleomorfa, conhecida como *Hypocrea*, compreende a fase sexuada. Devido essa alternância a fase *Hypocrea* chegou a ser considerada um gênero a parte (HARMAN et al., 2004; REYNOLDS, 1987).

Este gênero é composto por fungos filamentosos, ou seja, são constituídos por elementos multicelulares em forma de tubos denominados hifas, cujo conjunto dessas estruturas formam os micélios, que apresentam alta taxa de crescimento. Suas hifas são septadas, e dão origem aos conidióforos, estruturas que formam esporos assexuais denominados conídios ou formam os clamidósporos, que são estruturas de resistência a condições adversas (KUBICEK; HARMAN, 1998).

São organismo de vida livre, cosmopolitas, presentes em diferentes nichos ecológicos e mais abundante em regiões de clima temperado e tropical. É comumente encontrado em quase todo tipo de solo e em regiões que apresentam grande quantidade de matéria orgânica, como madeiras e cascas em decomposição e em serapilheiras, pois, são organismos de natureza saprofítica. Sendo também de natureza endofítica, quando colonizam plantas, iniciando pela superfície externa das raízes podendo se estender até a primeira e segunda camada de epiderme das plantas, que constituem os caules, folhas, flores e frutos (BROTMAN et al., 2013;

KERSHAW; TALBOT, 1998; NAHER et al., 2014; LEE et al., 2012; SAMUELS, 2006; SHORESH; HARMAN; MASTOURI, 2010).

Quando cultivados em meio de cultura apresentam rápido crescimento micelial, com colônias de coloração branca ou verde, que com o crescimento tornam-se cotonoso e compacto, formando tufos, que são aglomerados de hifas, conidióforos e conídios. Os versos das colônias variam de branco, verde, branco esverdeado, amarelo e amarelo esverdeado. A coloração da colônia depende da quantidade e cor dos conídios produzidos (CHEN; ZHUANG, 2017; DEVI et al., 2012; KUBICEK; HARMAN, 1998; MELO; FAULL, 2004; VINALE et al., 2008).

2.3 Importância Biotecnológica

Os representantes do gênero *Trichoderma* são adaptados a distintos nichos ecológicos e onipresentes na maior parte dos tipos de solos, raízes e ambientes foliares (MUKHOPADHYAY & KUMAR, 2020). *Trichoderma* spp. produzem enzimas que são comercializável, atuam na aceleração do crescimento de plantas e biocontrole de fitopatógenos, indicando seu promissor potencial agrícola e industrial (BHARDWAJ & KUMAR, 2017; MCMULLIN et al., 2017).

Diversas espécies de *Trichoderma* são conhecidas pela sua eficiência no controle biológico de pragas, como *T. harzianum*, *T. viride*, *T. atroviride*, *T. longibrachiatum* e *T. hamatum* (MONACO et al., 1991; MUKHOPADHYAY & KUMAR, 2020). O biocontrole é uma estratégia agrícola mais segura que técnicas tradicionais pois não envolve o uso de formulações químicas que possuem efeitos secundários como toxicidade e poluição do solo.

A capacidade antagonista de cepas de *Trichoderma* tem sido largamente estudada e os mecanismos associados incluem competição por espaço e nutrientes, antibiose e micoparasitismo (MUKHERJEE et al., 2013). As interações micoparasitárias ocorrem por meio da produção de enzimas hidrolíticas como quitinase, protease e glucanase e por vias de sinalização que são iniciadas por cepas de *Trichoderma*, como a via por proteína G heterotrimérica, a MAP quinase e a via do AMP cíclico (REITHNER et al., 2005). A proteína G e a MAP quinase estão vinculadas essencialmente na produção e secreção de metabólitos com ação fungicida e no desenvolvimento de estruturas de infecção (MUKHOPADHYAY & KUMAR, 2020). Por outro lado, a via do cAMP promove o enrolamento do micélio de *Trichoderma* spp. em fungos patogênicos inibindo seu crescimento e proliferação (CASTRO et al., 2020; MUKHOPADHYAY & KUMAR, 2020)

Muitas espécies de *Trichoderma* colonizam rapidamente as raízes e brotos de plantas e estabelecem uma relação simbiótica, sendo um importante endófito vegetal para culturas de milho, tomate, algodão e pepino (LOPES et al., 2012; MANGANIELLO et al., 2018; ZHANG et al., 2014). As espécies de *Trichoderma* adentram nas camadas celulares da epiderme do tecido radicular ou pode crescer entre os espaços intracelulares entre a membrana plasmática e a parede celular da planta (NOGUEIRA-LOPEZ et al., 2018). A colonização endofítica por *Trichoderma* pode proporcionar o maior crescimento da planta, aumento de biomassa e do desenvolvimento radicular, maior germinação de sementes, melhoria do vigor foliar e conseqüentemente aumento do rendimento dos cultivares nas lavouras. Em alface foi possível observar os efeitos benéficos de como a produção de exsudatos intensifica a germinação de *T. viride* possibilitando maior colonização na planta (CATSKA; AFIFE & VANCURA, 1975). A relação endofítica é bastante dinâmica, a presença de espécies de *Trichoderma* além de fornecer intermediários para síntese de fitormônios também modulam as concentrações dessas substâncias produzidas pelas plantas (GUZMÁN-GUZMÁN et al., 2019)

Além de contribuir com o crescimento e produtividade das plantas, *Trichoderma* spp. também induzem a supressão de doenças no solo, além de auxiliar na biorremediação de substâncias xenobióticas e pesticidas com alta persistência no ambiente (HARMAN et al., 2004; HOYOS-CARJAVAL & BISSET, 2009). Nos últimos anos mais de 1.000 metabólitos foram isolados de *Trichoderma* (ZEILINGER et al., 2016). Muitos desses metabólitos secundários são proeminentes agentes anti-fitopatogênicos e antibióticos. Recentemente, KHAN et al. (2020) caracterizaram 45 metabólitos oriundos de *Trichoderma* com elevada ação fungicida. Compostos bioativos como a ciclopentanona e a cisplatina produzidos por representantes do gênero apresentam significativa ação anticâncer e são candidatos na confecção de novos medicamentos para o tratamento de câncer de pulmão (YOU et al., 2010; ZHENG et al., 2011).

As espécies de *Trichoderma* são produtoras eficientes de muitas enzimas extracelulares usadas comercialmente. As celulasas e demais enzimas que quebram polímeros complexos são usadas na indústria têxtil realizando a biolimpeza de resíduos, impurezas, e promovendo maciez e branqueamento ao algodão (KUNAMNENI et al., 2014). No setor alimentício, as enzimas são empregadas na suplementação alimentar das aves no intuito de garantir maior digestibilidade da hemicelulose presente nos grãos (KUNAMNENI et al., 2014). As celulasas obtidas de *T. reesei*, por outro lado, são empregadas na produção de biocombustíveis de segunda geração a partir de

resíduos celulolíticos (SCHUSTER & SCHMOLL, 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Foram utilizados 32 isolados do gênero *Trichoderma* sp. coletados na Restinga de Guaibim, Bahia, que estão armazenados no acervo micológico do Laboratório de Biologia Evolutiva – LABEV na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB. O local de coleta foi separado em regiões, Mata Norte (MTN), Mata Sul (MTS), Moita Norte (MTN) e Moita Sul (MOS).

Para o isolamento dos fungos, foi realizado seu crescimento em meio BDA e incubadas a 28° C até ocorrer a esporulação. Em seguida, foi adotada a técnica de diluição seriada até 10⁻⁴ e posteriormente alíquotas com 100 microlitros (µl) foram transferidas para placas de Petri com meio BDA e espalhados com alça de drigalski. Após 20 horas de incubação a 28° C, foi observada em microscópio óptico na objetiva de 10x culturas isoladas deste fungo, que foi transferida para placa com meio BDA, obtendo cultura pura deste microrganismo. E, após sua esporulação foram conservados em método de Castellani.

3.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método Doyle e Doyle (1990) com adaptações. O micélio fúngico foi transferido para cadinhos estéreis, onde ocorreu maceração com nitrogênio líquido, em seguida foi adicionado 1 mL do tampão de extração CTAB, o material foi transferido para um tubo do tipo *ependorf* de 2,0 mL e incubados em banho-maria a 65 °C por 30 minutos. Em seguida, foram acrescentados 650 uL de clorofórmio: álcool isoamílico (CIA-24:1) e misturados manualmente até formar uma emulsão. Após formação de emulsão os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 5 minutos e 400 uL do sobrenadante foi coletado, repetindo-se 3x essa etapa. Um volume igual de isopropanol gelado foi adicionado ao sobrenadante coletado e, em seguida, acondicionado por 10 min em um ultrafreezer (– 80 °C). Após esse período, ocorreu a centrifugação por 5 min a 12000 rpm, formando o *pellet* e o sobrenadante descartado. O *pellet* formado foi lavado duas vezes com etanol 70 %, depois secado em temperatura ambiente dentro de uma capela de fluxo previamente limpa e ligada, visando reduzir as chances de contaminação. Posteriormente, o *pellet* seco foi ressuspendido em 50 µL de TE com 1,5 µL de RNase, e incubado por 60 minutos em banho-maria a 37 °C.

3.3 Estudo de Variabilidade Genética

Para a análise de variabilidade genética foi utilizada a técnica Rep-PCR, baseado na amplificação DNA de elementos BOX PCR. Na amplificação dos elementos BOX foi utilizado o *primer* BOXA 1R (5'- CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3'). Todas as reações de BOX-PCR tiveram um volume final de 25 µl, contendo: 10X PCR buffer (2,5 µL), DNA (1,5 µL), 0,25 mM MgCl₂ (6,0 µL), 2 mM dNTP (7,1 µL), Primer 0.8 pmol/ µL BOXA (5,0 µL), uma unidade de 5 U/ µL Taq polimerase (0,2) e água mili-Q (2,5 µL). A programação usada para a execução dessa reação foi feita no termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94 °C (5min), 10 ciclos de 94 °C (1min), 40 °C (40s), 72 °C (1min), com extensão final de 72 °C (10min) e outro ciclo, com: desnaturação inicial de 94 °C (5min), 30 ciclos de 90 °C (1min), 48 °C (30s), 72 °C (1min), com extensão final de 72 °C (10min). Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,0 % por 3 horas à 60W e em seguida os géis foram fotodocumentados.

3.4 Dendograma de similaridade

O dendograma de similaridade foi construído utilizando uma matrix de distância no programa Microsoft Office Excel 14.0 (Office 365), analisando a presença e/ou ausência das bandas, atribuindo 0 para a ausência de marca molecular e 1 para a presença. O programa the Past of the Future – PAST3, foi utilizado para construção do dendograma empregando-se o coeficiente de Jaccard e o método Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean - UPGMA. Após a construção do dendograma de similaridade foi analisado os isolados que se mantiveram mais agrupados dos demais isolados.

3.5 Desenho do *primer* TEF1-R2

Foi desenvolvido um *primer* com a finalidade de ser utilizado como um segundo reverso, que está localizado na região III do gene *tef-1* (figura 3), próximo ao começo do grande exón. Foi analisado o alinhamento múltiplo com 1509 sequências do gene *tef-1*, no programa MEGA 6, disponíveis nos no bando de dados do NCBI, em até agosto de 2019. Após observação do alinhamento múltiplo, foi determinada a sequência haplotica, ou seja, sequência de nucleotídeo que é igual na maior quantidade de microrganismos. A sequência haplotica determinada para

desenho do primer foi AAGATGGACACTGCCAACTGG, que estava presente em 1458 isolados, para desenho e síntese do primer TEF1-R2 (5' CCA GGT GGC AGT GTC CAT CCT 3').

3.6 Amplificação, Purificação e Sequenciamento

Para a amplificação do gene *tef-1* foi utilizada a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), foram utilizados os *primers* TEF1-728 F (5' CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG 3'), TEF1-LLErev (5' AAC TTG CAG GCA ATG TGG 3') (DRUZHININA et al., 2005; JAKLITSCH & VOGLMAYR, 2015) e TEF1-R2 (5' CCA GGT GGC AGT GTC CAT CCT 3'). Para o gene *rpb2* foi utilizado os *primers* fRPB2-5F – 5' - (GAY GAY MGW GAT CAY TTY GG) - 3' e fRPB2_7cR – 5' – (CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT) – 3' (LIU et al.1999; CHAVERRI & SAMUELS, 2003),

A reação final para a amplificação do *tef-1* foi de 25 µL, contendo: 11,8 µL de água ultrapura esterilizada; 2,0 µL de 2,5 mM dNTP; 2,0 µL de 25 mM MgCl₂; 2,5 µL de 10X tampão de extração com MgCl₂; 2,0 µL de primer; 0,2 µL de *Taq* Polimerase e 2,0 µL de DNA do isolado selecionado. A programação usada para a execução dessas reações foi feita no termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94 °C (5 min), 40 ciclos de 94 °C (45 s), 57 °C (30 s), 72 °C (30 s), com extensão final de 72 °C (6 min).

Já a reação final para a amplificação do gene *rpb2* foi de 25 µL, contendo: 14,3 µL de água ultrapura esterilizada; 2,0 µL de 2,5 mM dNTP; 2,0 µL de 25 mM MgCl₂; 2,5 µL de 10X tampão de extração com MgCl₂; 1,0 µL de primer; 0,2 µL de *Taq* Polimerase e 2,0 µL de DNA do isolado selecionado. A programação usada para a execução dessas reações foi feita no termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94 °C (2 min), 35 ciclos de 94 °C (30 s), 48 °C (30 s), 72 °C (60 s), com extensão final de 72 °C (10 min).

Para purificação do fragmento foram utilizados aproximadamente 90 µL de reação de PCR, utilizando o kit comercial *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit GE Healthcare* e todos os processos de confirmação da amplificação e purificação foram feitos em eletroforese em gel de agarose a 1% e em seguida enviados para serem sequenciados na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático AB 3500 *Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Por fim, as sequências foram editadas no programa *Chromas 2.6.2 (Technelysium DNA Sequencing Software)*.

3.7 Análises Filogenéticas

As sequências nucleotídicas obtidas do gene *tef-1* e *rpb2* foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando o programa BLASTN (ALTSCHUL, et al., 1997). Em seguida, as sequências nucleotídicas dos genes selecionados dos isolados tipo das espécies mais próximas aos nossos isolados foram recuperados.

O alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas foi feito no MAFFT (KATO; ROZEWICKI; YAMADA, 2019). A edição das sequências, o melhor modelo evolutivo bem como as análises de máxima verossimilhança (MV) foram realizadas no programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013) com 1000 *bootstraps*. As árvores filogenéticas foram construídas com as regiões *tef-1* e *rpb2*. As árvores filogenéticas geradas foram visualizadas e editadas no programa Archaeopterix (HAN; ZMASEK, 2009).

4 RESULTADOS

A análise de diversidade genética por meio do BOX-PCR de 32 isolados de fungos de *Trichoderma* spp. resultou na obtenção de 12 perfis genéticos distintos (figura 1) e os isolados agrupados conforme a tabela 1. Os isolados apresentaram polimorfismo e o tamanho dos fragmentos amplificados ficaram entre 200-1000 pb. O número de marcas moleculares produzidas variou entre 5 e 10 nos diferentes isolados de *Trichoderma*.

Tabela 1 – Perfis genéticos dos 32 isolados distribuídos em 12 perfis distintos com seus respectivos representantes.

Perfil genético	Isolados do gênero <i>Trichoderma</i>
Perfil genético 1	20
Perfil genético 2	MTS32
Perfil genético 3	MTS8A e MTS8B
Perfil genético 4	MON24
Perfil genético 5	MTS23
Perfil genético 6	MTS1A, MTS1B, MTS1C, MTS1D, MTS1E, MTS1F, MTS1G, MTS1H, MTS1I e MTS1J
Perfil genético 7	MTN9A e 9B

Perfil genético 8	22
Perfil genético 9	18
Perfil genético 10	MTS25
Perfil genético 11	MTS3A, MTS3B, MTS3C, MTS3D, MTS3E, MTS3F, MTS3G, MTS3H e MTS3I
Perfil genético 12	MTS4A e MOS4B

Dos 12 perfis genéticos analisados no dendograma de similaridade (figura 1), houve a formação de 5 grupos que apresentam uma certa proximidade genética. Os grupos apresentam uma média de 40% de similaridade, com exceção do último, representado pelo isolados MTS3A e MTS4B, que apresentam 80 % de proximidade, sendo também o único grupo que possui isolados da mesma região. No segundo grupo, representado pelos isolados MTS8A, MON24, MTS23 e MTS1A, houve a formação de subgrupos, onde a proximidade entre eles variam de 70 % a 80 %. Nos demais grupos não houve proximidade de acordo as suas regiões de coleta.

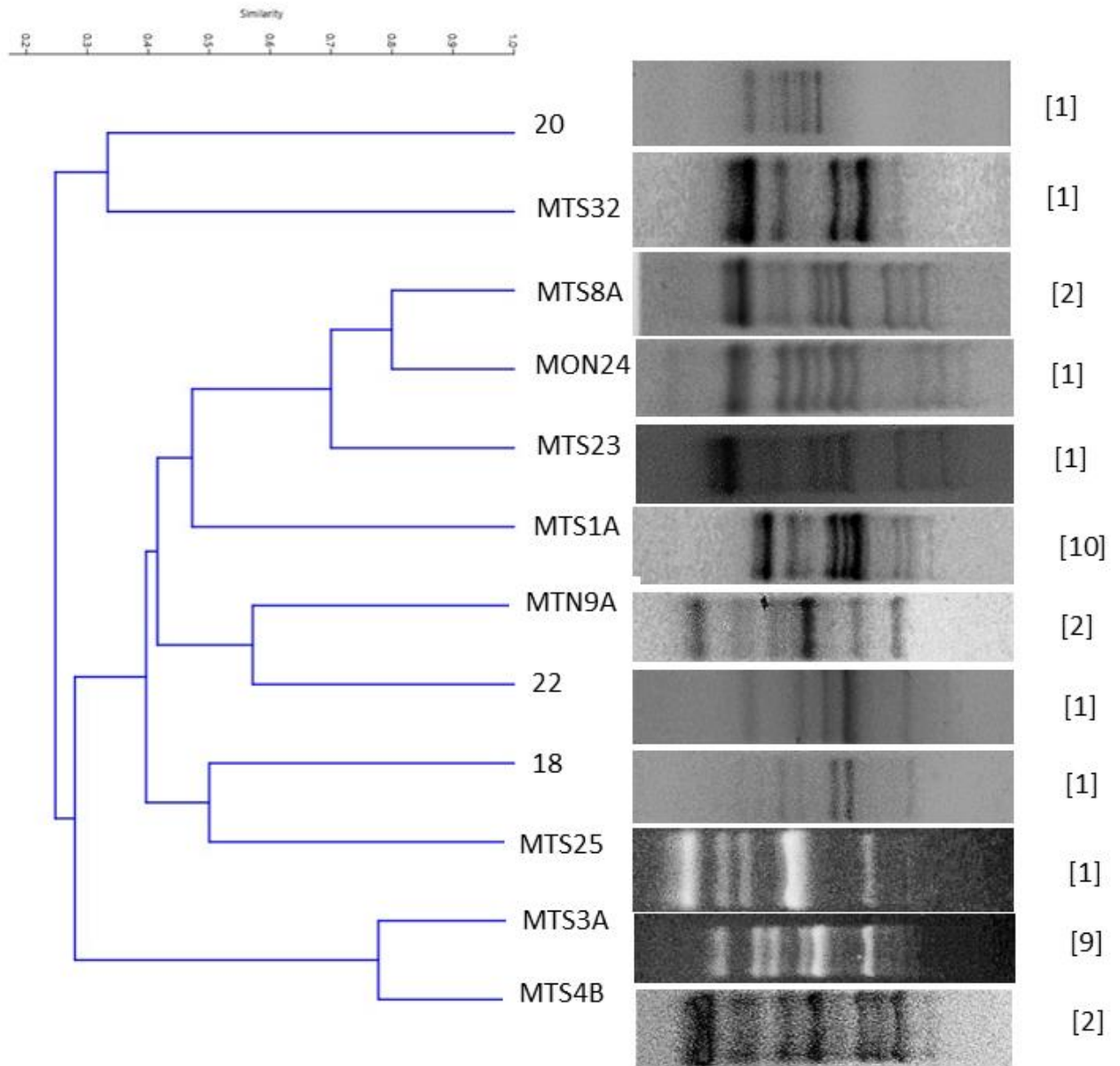


Figura 1: Análise da diversidade dos isolados de *Trichoderma* da restinga de Guaibim – BA. Dendograma de similaridade. Em cada ramo está o isolado que representa cada perfil genético e em colchete a quantidade de isolados representados por cada perfil genético.

Um isolado de cada perfil genético foi selecionado para sequenciamento do gene *tef-1*, apenas dois isolados teve a sequência completa obtida e três isolados de perfis genéticos distintos foram selecionados para sequenciamento do gene da segunda maior subunidade da RNA polimerase (*rpb2*). As sequências de nucleotídeos do *tef-1* e *rpb2* foram comparadas com as sequências de espécies tipo depositadas no banco de dados do NCBI (Tabela 1). Foram obtidas duas partes do gene (figura 3), a região II, correspondente ao quinto íntron, antes do complexo Poli-T, onde todos os isolados estão próximos de *Trichoderma lentiforme*. A região III, que compreende a uma parte do quinto íntron até o sexto éxon, após o Poli-T, os isolados estão próximos de *Trichoderma breve* e *Trichoderma zelobreve*. O sequenciamento completo do gene *tef-1* dos isolados 18 e MTS23 verificou que eles estão próximos de *Trichoderma zelobreve*. Já o sequenciamento do gene *rpb2*, dos isolados 18, MTS23 e MON24 demonstrou que eles estão próximos respectivamente das espécies Tipo de *Trichoderma zelobreve*.

Tabela 2 – Identificação molecular via BLASTn dos isolados de *Trichoderma* utilizando *tef1* e *rpb2*, em comparação com as espécies tipo mais próximas registradas no NCBI.

Região gênica	Isolado	Fragmento (pb)	Closest match BLASTN		
			Identidade (%)	Número de acesso	Espécie (Tipo)
II <i>tef-1</i>	TEF1_F_20	176	98.86%	AF469195.1	<i>T. lentiforme</i>
	TEF1_F_MTS32	167	99.37%	AF469195.1	<i>T. lentiforme</i>
	TEF1_F_MTS8A	118	100%	AF469195.1	<i>T. lentiforme</i>
	TEF1_F_MON24	176	97.66%	AF469195.1	<i>T. lentiforme</i>
	TEF1_F_MTS23	177	97.74%	AF469195.1	<i>T. lentiforme</i>
	TEF1_F_MTS1C	172	97.67%	AF469195.1	<i>T. lentiforme</i>
	TEF1F_MTN9A	175	97.14%	AF469195.1	<i>T. lentiforme</i>
	TEF1_F_22	175	97.71%	AF469195.1	<i>T. lentiforme</i>
	TEF1_F_18	152	97.37%	AF469195.1	<i>T. lentiforme</i>
	TEF1_F_MTS25	175	98.86%	AF469195.1	<i>T. lentiforme</i>
	TEF1_F_MTS3A	142	99.29%	AF469195.1	<i>T. lentiforme</i>
TEF1_F_MOS4B	171	97.66	AF469195.1	<i>T. lentiforme</i>	
III <i>tef-1</i>	TEF1_F_20	854	100%	MN605883.1	<i>T. zelobreve</i>
	TEF1_F_MTS32	899	99.56%	MN605883.1	<i>T. zelobreve</i>
	TEF1_F_MTS8A	698	99.86%	MN605883.1	<i>T. zelobreve</i>
	TEF1_F_MON24	850	100%	MN605883.1	<i>T. zelobreve</i>
	TEF1_F_MTS23	1079	99.54%	MN605883.1	<i>T. zelobreve</i>
	TEF1_F_MTS1C	864	99.54%	MN605883.1	<i>T. zelobreve</i>
	TEF1F_MTN9A	728	100%	MN605883.1	<i>T. zelobreve</i>
	TEF1_F_22	578	100%	AF469195.1 MN605883.1	<i>T. breve</i> e <i>T. zelobreve</i>

	TEF1_F_R_18	1079	99,91%	MN605883.1	<i>T. zelobreve</i>
	TEF1_F_MTS25	469	100%	AF469195.1 MN605883.1	<i>T. breve</i> e <i>T. zelobreve</i>
	TEF1_F_MTS3A	715	99,86%	MN605883.1	<i>T. zelobreve</i>
<i>tef-1</i>	TEF1_18	1245	99,91%	MN605883.1	<i>T. zelobreve</i>
	TEF1_MTS23	1263	99,54%	MN605883.1	<i>T. zelobreve</i>
<i>rpb2</i>	TR 18	1136	96,15%	MN605883.1	<i>T. zelobreve</i>
	MTS23	1139	99,20%	MN605883.1	<i>T. zelobreve</i>
	MON24	1140	97,50%	MN605883.1	<i>T. zelobreve</i>

Devido a presença do Poli-T, que resultou em problema no sequenciamento conforme o eletroferograma (figura 2), foi necessário desenvolver o *primer* TEF1-R2 (5' CCA GGT GGC AGT GTC CAT CCT 3'), para obter o sequenciamento da região após o Poli-T.

Os resultados das análises filogenéticas, que corresponde a região gênica II do gene *tef-1* (figura 4), separou os isolados em 5 possíveis espécies distintas, que estão próximas filogeneticamente entre si. Os isolados MTS8A, MTS3A, MTN9A e MON24 estão separados isoladamente na árvore. Já os isolados 20, 18, MOS4B, 22, MTS23, MTS32, MTS1C e MTS25 estão no mesmo ramo, considerando-os isolados idênticos.

Já as análises levando em consideração a região gênica III (figura 5), separou os isolados em prováveis 7 isolados distintos. Os isolados MTS8A e MTN9A estão separados na árvore, próximos dos isolados que são iguais, MON24, 20 e MTS25. O isolado MTS1C, MTS32 e MTS25 estão no mesmo ramo junto com o isolado *Trichoderma atrobrunneum*, com os isolado 18 e MOS4B próximos. Já os isolados MTS3A e MTN9A, foram agrupados próximos a *Trichoderma corneum*.

A filogenia realizada com o gene *tef-1* completo (figura 6), os isolados 18 e MTS23 estão agrupados distintamente e estão próximos de *Trichoderma zelobreve* e *Trichoderma breve*.

A filogenia com o gene *rpb2* (figura 7), dos isolados 18, MTS23 e MON24, demonstrou que o isolado MTS23 está agrupado e próximo de *Trichoderma breve* e *Trichoderma zelobreve*. Já o MON24 está mais relacionado com *Trichoderma inhamatum* e o 18 está próximo de *Trichoderma afarasin* e *Trichoderma azevedoi*.

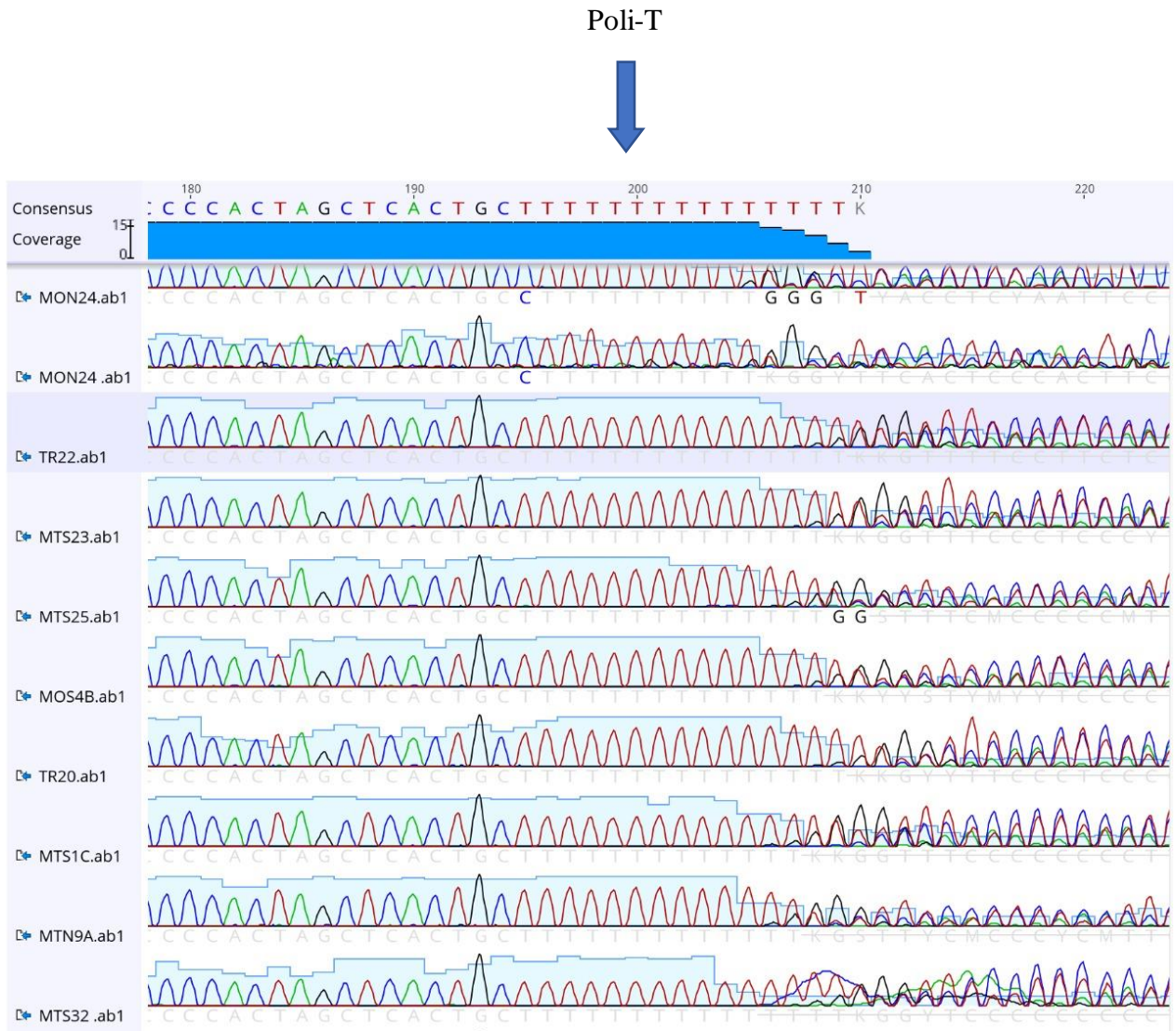
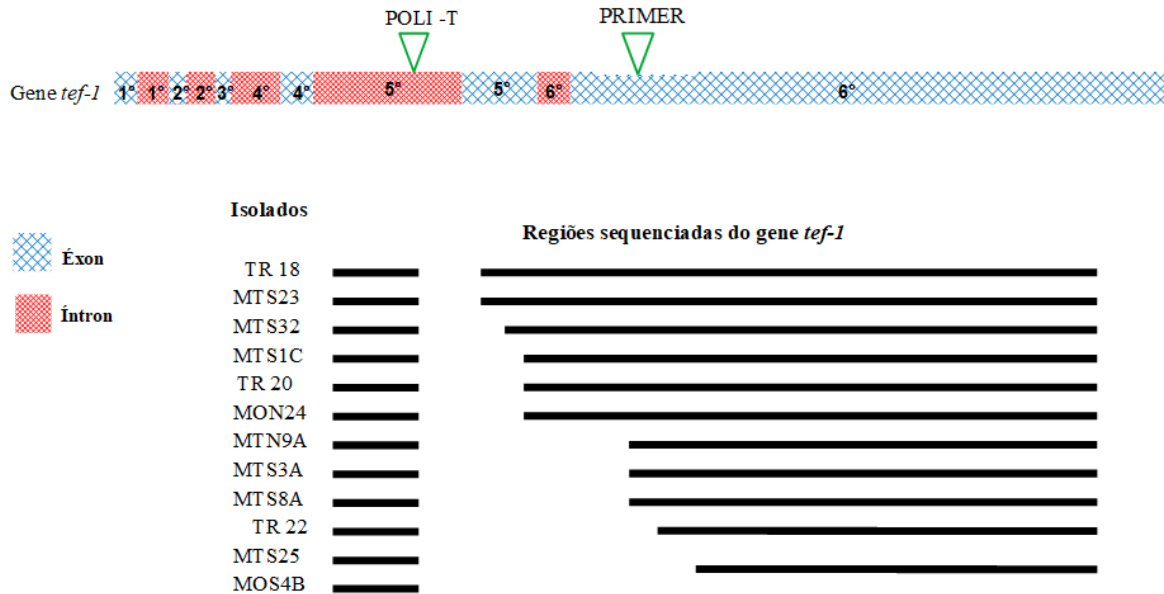


Figura 2: Eletroferograma do *forward* dos isolados do gênero *Trichoderma*.



Haplótipos	Números de sequências
AAGATGGCACTGCCAACTGG	1458
AAGATGGATACTGCCAACTGG	5
AAAATGGCACTGCCAACTGG	1
AAGATGGACACCGCCAACCTGG	26
AAGATGGACACCGCCAATTGG	1
AAGATGGCACTGCCAATTGG	1
AAGATGGACACAGCCAATTGG	3
AAGATGGACACCACCAAGTGG	1
AAGATGGACACCGCCAAGTGG	1
AAGATGGCACTGCCAAGTGG	3
AAGATGGCACTGCCAAATGG	1
AAGATGGCACTGCCGGCTGG	3
AAGATGGCACTGCTGGCTGG	1
AAGATGGCACTGCCGCCTGG	1
AAGATGGACCTTACCAATTGG	3

Figura 3: Esquema do gene *tef-1*, mostrando aonde está localizado o Poli-T e o primer TEF1-R2. Regiões do gene *tef-1* que foi sequenciado de todos os isolados. Tabela com as sequências haplótipas do primer TEF1-R2.

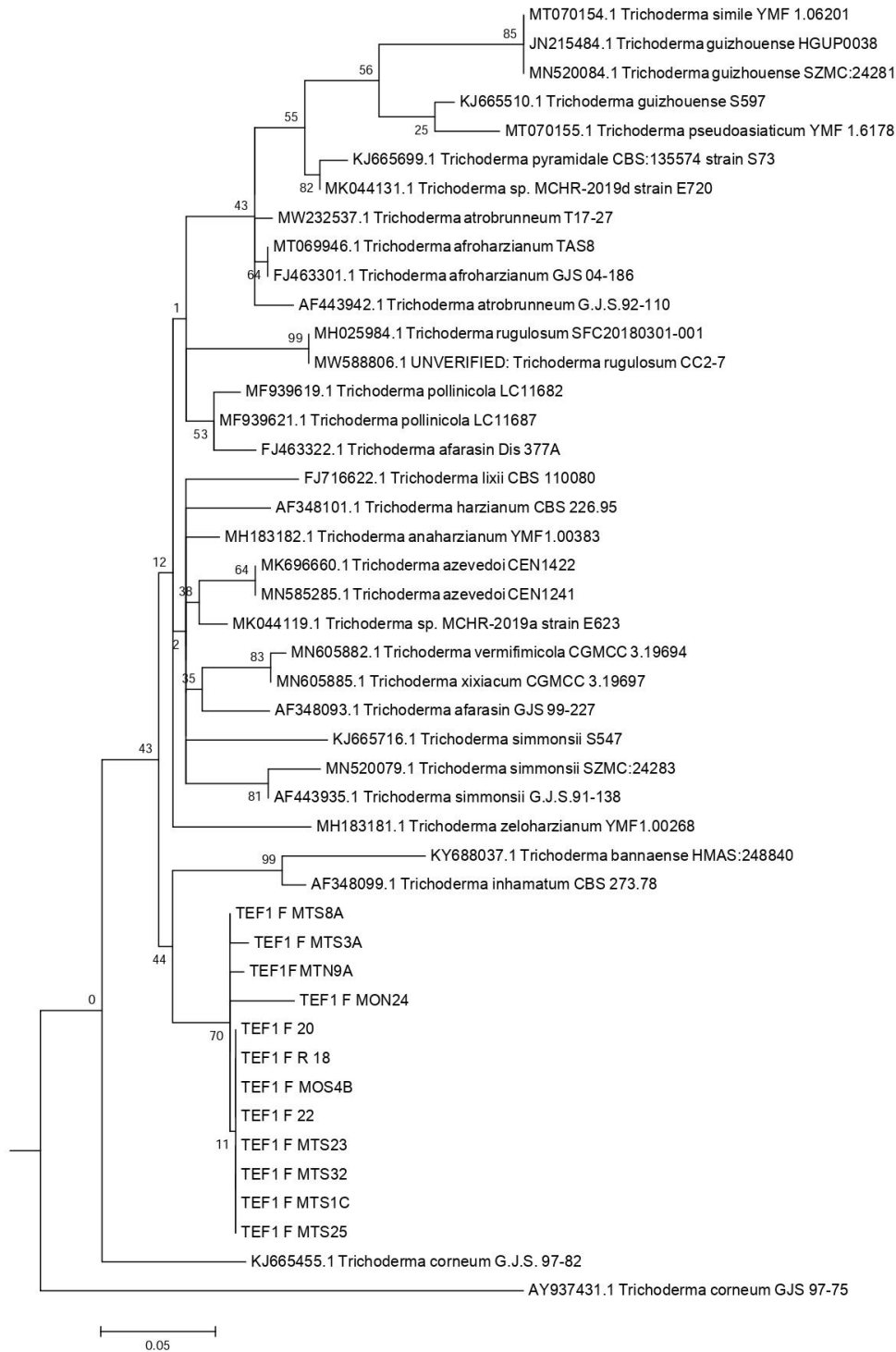


Figura 4: Árvore filogenética da região II (antes do Polit-T) do gene *tef-1*.

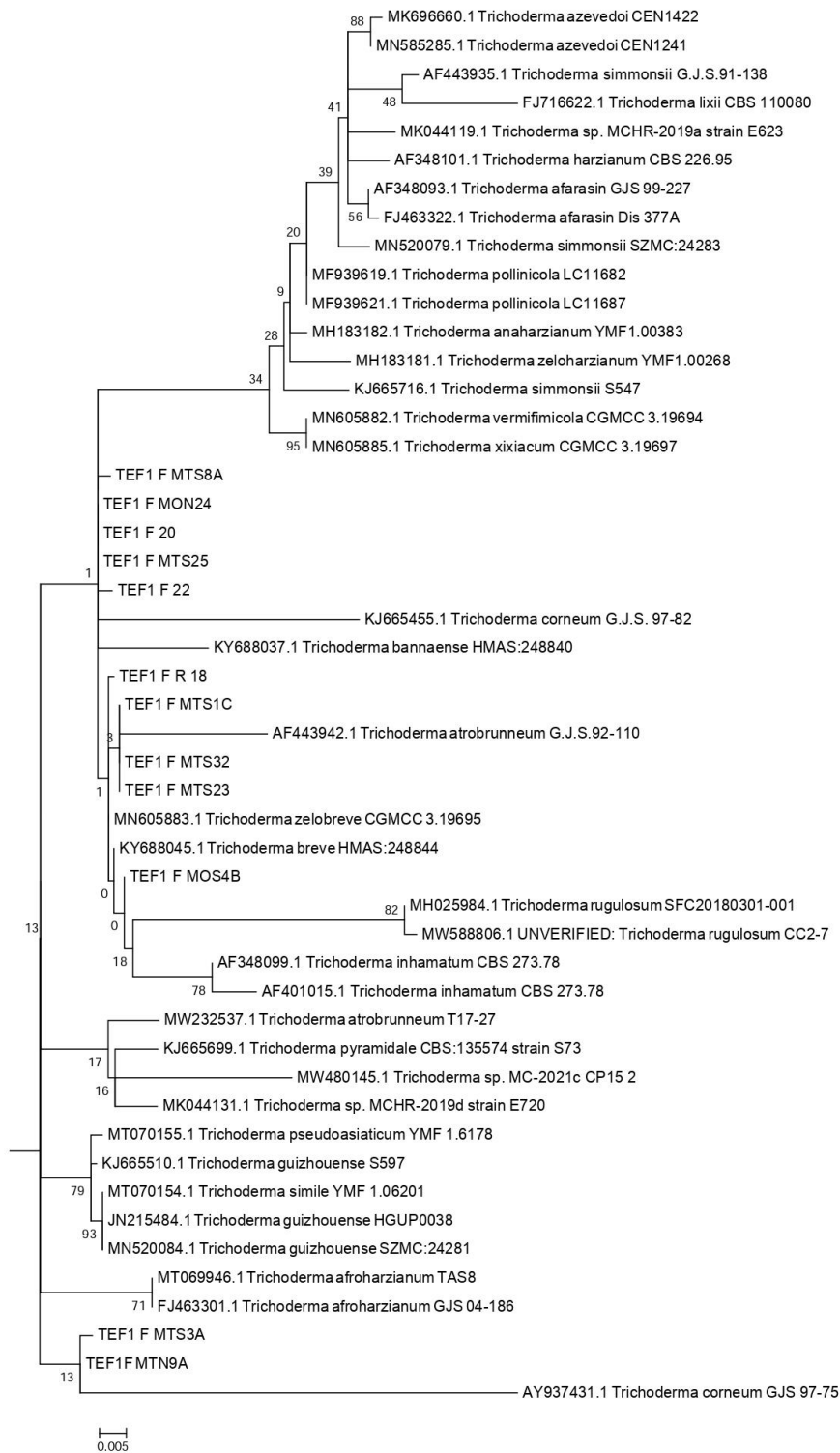


Figura 5: Árvore filogenética da região III (após do poli-T) do gene *tef-1*.

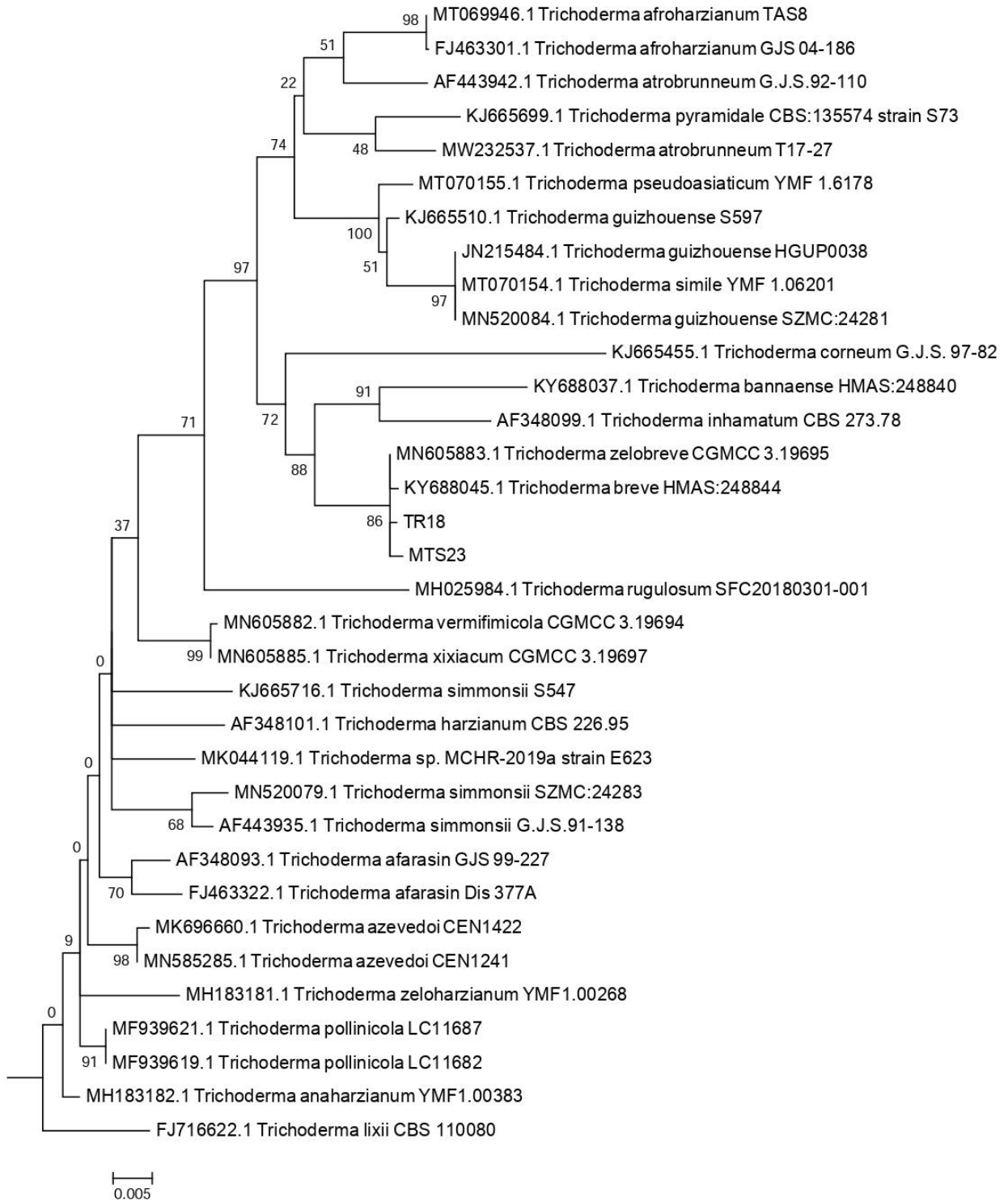


Figura 6: Árvore filogenética do gene *tef-1*.

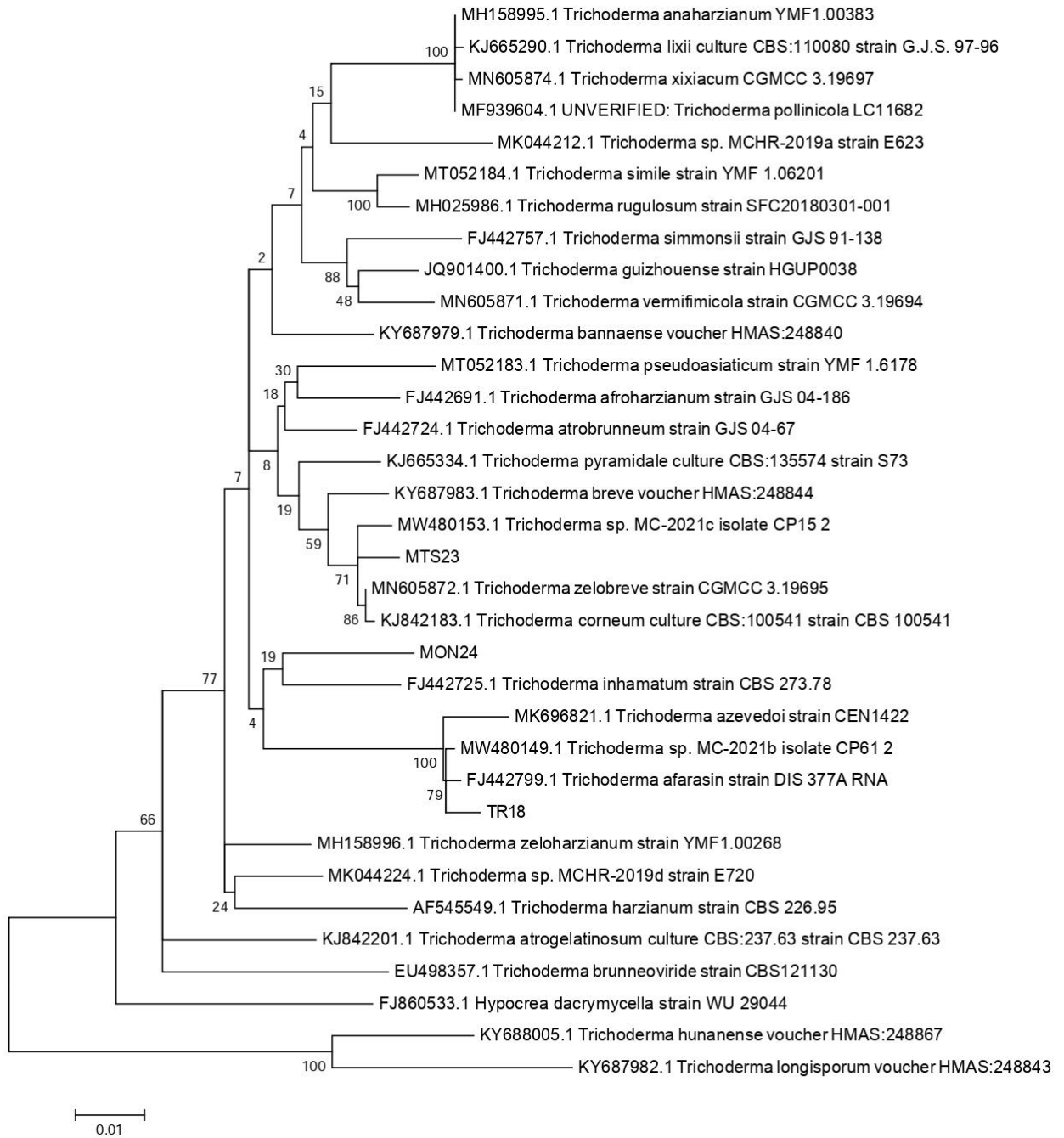


Figura 7: Árvore filogenética do gene *rpb2*.

5 DISCUSSÃO

Os marcadores moleculares começaram a ser utilizados para estudar diversidade genética de microrganismos a partir dos anos de 1980, no ano de 1992 o marcador BOX-PCR começou a ser utilizado, apresentando eficácia em estudos de diversidade genética de microrganismos e para distinguir espécies ou mesmo cepas de uma espécie, uma vez que são analisadas regiões em todo o DNA que apresenta alta taxa de conservação (STERN et al., 1988; MARTIN, et al., 1992; OLIVE et al., 1999; MISHRA, 2015). Nesse estudo, os elementos BOX-PCR foram eficazes para analisar a variabilidade genética e agrupar os isolados em prováveis espécies distintas, mapeamento da taxa população de fungos do gênero *Trichoderma* na restinga de Guaibim – BA, podendo determinar quais isolados devem ser utilizados na filogenia.

O gene *tef-1* é considerado o *barcode* para identificação de fungos do gênero *Trichoderma*, permitindo diferenciar os isolados em nível de espécie e para utilização em análises filogenéticas (CHAVERRI et al., 2015). O gene *RPB2* é utilizado de forma complementar nessas análises, porém é menos informativo quando comparado com o *tef-1*, mas é fundamental para elucidar e garantir maior acuracidade das análises (Jacklist et al.; 2006, 2009,2015; PARK et al., 2006; ZENG & ZHUANG, 2019). Com os produtos de sequenciamento do gene *tef-1* dos fungos do gênero *Trichoderma* da restinga de Guaibim, constatou-se que todos os isolados estão próximos de *T. zelobreve* e *T. breve*.

Chen & Zhuang, em 2017, descreveram *T. breve* de amostras do solo do condado de Yanqing, na China. Gu et al., em 2020, descreveram *T. zelobreve*, coletados de amostras do solo no distrito de Chaoyang, na China, determinando-a como uma espécie irmã de *T. breve*, distinguida apenas por produzir fiálides mais curtas e estreitas, conídios menores e por formar zonas concêntricas em placas de ágar. Ambas fazem parte do clado *Harzianum*, juntamente com as espécies identificadas nesse trabalho.

Após análises das sequências de nucleotídeos do gene *tef-1* dos isolados deste trabalho, constatou-se a presença de um poli-T, que é uma sequência de bases nitrogenadas de timina, na região do grande íntron do *tef-1*, presente também nos isolados de *T. breve* e *T. zelobreve*. Chen & Zhuang e Gu et al., não obtiveram ou depositaram nos bancos de dados do NCBI as sequências completas do gene *tef-1* de *T. breve* e *T. zelobreve*, constando apenas sequências que procedem o poli-T. Para obter a sequência completa do *tef-1* dos isolados deste trabalho, foi desenvolvido o

primer TEF1-R2, onde apenas um único haplótipo é diferente no lado 3' do primer e as últimas 8 bases são idênticas em todos os haplótipos (figura 3), o que corrobora a eficácia do *primer*.

Segundo Cai & Druzhinina, 2021, a região do grande íntron do *tef-1* apresenta maior variabilidade a fim de distinguir isolados do gênero *Trichoderma*. A região que precede o poli-T, corresponde a dois terços do grande íntron, sendo assim, Chen e Zhuang & Gu et al., obtiveram apenas um terço dessa região, e a sequência do gene *tef-1* obtida compreende a região mais conservada e menos informativa do gene, que é o grande éxon. Por isso, quando compara-se as regiões obtidas pelo *primer* reverso dos isolados de *Trichoderma* deste trabalho com *T. zelibreve* e *T. breve*, a similaridade apresentada foi de 99 % à 100 % respectivamente.

Com base na filogenia do gene *tef-1*, dos isolados do gênero *Trichoderma* spp. (figura 4), que compreende a região do grande íntron, antes do poli-t, que não foram sequenciadas para *T. zelibreve* e *T. breve*, é perceptível que há variação entre os isolados, uma vez que apresentaram indels no alinhamento das sequências, pois mesmo sendo uma sequência curta, há separação na filogenia entre os isolados, sugerindo que eles podem ser isolados diferentes. Quando comparada a filogenia da região após o Poli-T (figura 5), houve também separação por filogenia dos isolados.

Quando analisa-se a filogenia do gene *tef-1* por completo (figura 6), os isolados representados estão próximos de *T. zelibreve* e *T. breve*. Mas, como essas espécies não apresentam a sequência do *tef-1* completa, não é possível determinar a real distância dos isolados desse trabalho com os descritos anteriormente, ou até mesmo qual é a distância entre *T. breve* e *T. zelibreve* e qual o seu posicionamento concreto no clado *harzianum*.

Para elucidar a discordância gerada pelos autores Chen e Zhuang & Gu et al., foi sequenciado o gene *rpb2* para determinar que os isolados deste trabalho não são *T. breve* tampouco *T. Zelibreve*. Por filogenia do gene *rpb2* (figura 7), constatou-se que os isolados são espécies distintas entre eles e de *T. breve* e *T. zelibreve*.

6 CONCLUSÃO

Os 32 isolados do Clado *Harzianum* ficaram distribuídos em 12 perfis genéticos distintos de acordo com o marcador BOX-PCR. As filogenias com os genes *tef1* e *rpb2* não são congruentes, contudo indicam que o isolado MTS23 é filogeneticamente relacionado com *T. zelobreve* e os isolados MON24 e TR18 representam novas espécies não relacionadas filogeneticamente.

7 REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ARAUJO, D. S. D.; LACERDA, L. D. A Natureza das restingas. **Ciência hoje**. v. 6, n. 33, p. 42-48. 1987.
- BARCELOS, M. E. F.; RIGUETE, J.R.; SILVA, L. T. P.; FERREIRA JÚNIOR, P. D. Uma visão panorâmica sobre os solos das restingas e seu papel na definição de comunidades vegetais nas planícies costeiras do sudeste do Brasil. **Revista Natureza Online**. v. 10, n. 2, p. 954-959, 2012.
- BHARDWAJ, N. R.; KUMAR, J. Characterization of volatile secondary metabolites from *Trichoderma asperellum*. **Journal of Applied and Natural Science**. v. 9, n. 2, p. 954-959, 2017.
- BINDSCHEDLER, S.; CAILLEAU, G.; VERRECCHIA, E. Role of fungi in the biomineralization of calcite. **Minerals**. v. 6, n. 2, 2016.
- BOURSCHID, K.; REIS, A. Dinâmica da invasão de *Pinus elliottii* Engelm. em restinga sob processo de restauração ambiental no Parque Florestal do Rio Vermelho. **Biotemas**. v. 23, n. 2, p. 23-30, 2010.
- 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.
- BRASIL. Resolução do CONAMA n. 303, de 20 de março de 2002. Define os parâmetros das Áreas de Proteção Permanente, 2002.
- BRITO, F. S.; MILLER, P. R. M.; STADNIK, M. Presença de *Trichoderma* spp. em composto e suas características para o controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 5, n. 1, p. 43-53, 2010.
- BROTMAN, Y.; LANDAU, U.; CUADROS-INOSTROZA, A.; TAKAYUKI, T.; FERNIE, A. R.; CHENT, I.; VITERBO, A.; WILLMITZER, L. *Trichoderma*-Plant Root Colonization: Escaping Early Plant Defense Responses and Activation of the Antioxidant Machinery for Saline Stress Tolerance, **PLoS Pathogens**, v.9, n. 3, 2013.

- CAI, F.; DRUZHININA, I. S. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. **Fungal Diversity**. v. 107, p. 1-69, 2021.
- CARVALHO, D. A. DE; SÁ, C. C. Estrutura do estrato herbáceo de uma restinga arbustiva aberta na APA de Massambaba, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**. v. 62, n. 2, p. 367-378, 2011.
- CASTRO, M. D.; RIVEIRA, M. E.; MARTÍNEZ, I. O.; MEDINA, M. D. C. R.; OSUNA, N. A. I.; FLORES, S. C. TBRG-1 a Ras-like protein in *Trichoderma virens* involved in conidiation, development, secondary metabolism, mycoparasitism, and biocontrol unveils a new family of Ras-GTPases. **Fungal Genetics and Biology**, v. 136, 2020.
- CHAGAS, L. F. B.; CASTRO, H.G.; COLONIA, D. S. O.; CARVALHO FILHO, M. R.; MILLER, L. O.; CHAGAS, A. F. J. Efficiency of *Trichoderma* spp. as a growth promoter of cowpea (*Vigna unguiculata*) and analysis of phosphate solubilization and indole acetic acid synthesis. **Brazilian Journal of Botany**, v. 39, n. 2, p. 437-445, 2016.
- CHAVERRI, Priscila et al. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. **Mycologia**. v. 107, n. 3, p. 558-590, 2015.
- CHEN, K.; ZHUANG, W. Y. Discovery from a large-scaled survey of *Trichoderma* in soil of China. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-37, 2017.
- DEVI, P.; PRABHAKARAN, N.; KAMIL, D.; PANDEY, P.; BORAH, L. Characterization of Indian native isolates of *Trichoderma* ssp. and assessment of their bio-control efficiency against plant pathogens. **African Journal of Biotechnology**. v. 11, n. 85, p. 15150-15160, 2012.
- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem Bull**. v. 1, p.09-11, 1990.
- DRUZHININA, I. S.; KOPCHINSKIY, A. G.; KOMON, M.; BISSET, J.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C. 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.; SHELEST, E.; KUBICEK, C.P. Novel traits os *Trichoderma* predicted through the analyses of its secretome. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 337, p. 1-9, 2012.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2º ed, 2002.

HOLZER, W.; CRICHYNO, J. PIRES, A. C.; Sustentabilidade da urbanização em áreas de restinga: uma proposta de avaliação pós-ocupação. **Paisagem e Ambiente**. v. 19, p. 49-66, 2004.

GALARZA, L.; AKAGI, Y.; TAKAO, K.; KIM, S.; MAEKAWA, N.; ITAI, A.; PERALTA, E.; SANTOS, E.; KODAMA, M. **Characterization of *Trichoderma* species isolated in Ecuador and their antagonistic activities against phytopathogenic fungi from Ecuador and Japan**. **Journal of General Plant Pathology**. v. 81, p. 201-210, 2015.

GOMEZ, F. H.; VIDAL-TORRADO, P.; MACÍAS, F., GHEARDI, B.; PEREZ, X. L. O. Solos sob vegetação de restinga na Ilha do Cardoso (SP). **Revista Brasileira de Ciências do Solo**. v. 3, p. 1563-1580, 2007.

GU, X.; WANG, R.; SUN, Q.; WU, B.; SUN, J. Four new species of *Trichoderma* in the *Harzianum* clade from northern China. **MycoKeys**. Vol. 73, p. 109-132, 2020.

GUZMÁN, P. G.; TRONCOSO, M. D. P.; MONFIL, V. O.; ESTRELLA, A. H. *Trichoderma* species: versatile plant symbionts. **Phytopathology**. v. 109, n. 1, p. 6-16, 2019.

HAN, M. V.; ZMASEK, C. M. phyloXML: XML for evolutionary biology and comparative genomics. **BMC bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2009.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**. v. 2, p. 43-56, 2004.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological control**, v. 51, n. 3, p. 409-416, 2009.

HOYOS-CARVAJAL, L.; BISSETT, J. Biodiversity of *Trichoderma* in Neotropics. **The Dynamical Processes of Biodiversity – Case Studies of Evolution and Spatial Distribution**. v. 2, p. 303-320, 2011.

INDEX FUNGORUM. **Banco de Dados de Taxonomia de Fungos**. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>. Acesso em: 15 julho de 2022.

- JAKLITSCH, W. M.; SAMUELS, G. J.; DODD, S. L.; LU, B.; DRUZHININA, I. S. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. **Studies in Mycology**. v. 56, p. 135-177, 2006.
- JAKLITSCH, W. M.; KOMON, M.; KUBICEK, C. P.; DRUZHININA, I. S. *Hypocrea crystalligena* sp. nov., a common European species with a white-spored *Trichoderma* anamorph. **Mycologia**. v. 98, n. 3, p. 499-513, 2006.
- JAKLITSCH, W. M.; VOGLMAYR, H. Biodiversity of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) in Southern Europe and Macaronesia. **Studies in mycology**, v. 80, p. 1-87, 2015.
- KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in bioinformatics**. v. 20, n. 4, p. 1160-1166, 2019.
- KHAN, R. A. A.; NAJEEB, S.; HUSSAIN, S.; XIE, B. LI, Y. Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic fungi. **Microorganism**. v. 8, n. 6, p. 817, 2020.
- KERSHAW, M. J.; TALBOT, N. J. Hydrophobins and Repellents: Proteins with Fundamental Roles in Fungal Morphogenesis. **Fungal Genetics and Biology**. v. 23, n. 1, p. 18-33, 1998
- KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. *Trichoderma and Gliocladium*. **Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics**. Taylor and Francis Ltd, 1998.
- KUNAMNENI, A.; PLOU, F. J.; ALCALDE, M.; BALLESTEROS, A. *Trichoderma* enzymes for food industries. **Biotechnology and biology of Trichoderma**. p. 339-344, 2014.
- LACERDA, L. D.; ARAUJO, D. S. D.; MACIEL, N. C. Dry coastal ecosystems of the tropical Brazilian coast. **Revista Elsevier**. p. 477- 493, 1993.
- LEE, J.; HUH, N.; HONG, J. H.; KIM, B. S.; KIM, G. H.; KIM, J. J. The antagonistic properties of *Trichoderma* spp. inhabiting woods for potential biological control of wood-damaging fungi. **Holzforschung**. v. 66, n. 7, p. 883-887, 2012.
- LEITE, A. V. L.; ANDRADE, L. H. C. Riqueza de espécies e composição florística em um ambiente de duna após 50 anos de pressão antrópica: um estudo na Praia de Boa Viagem, Recife, PE – Brasil. **Biotemas**. v. 17, N. 1, p. 29-46, 2004.

- MANGANIELLO, G.; SACCO, A.; ERCOLANO, M. R.; VINALE, F.; LANZUISE, S.; PASCALE, A.; NAPOLITANO, M.; LOMBARDI, N.; LORITO, M.; WOO, S. L. Modulation of tomato response to *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* and its secondary metabolite harzianic acid. **Frontiers in microbiology**. v. 9, 2018.
- MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHELL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK, R.; MORRISON, D. A.; BOULNOIS, G. J.; CLAVERY, J. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic acids research**. v. 20, n. 13, p. 3479-3483, 1992.
- MARTINS, S. E.; ROSSI, L.; SALLES, P.; SAMPAIO, P. Caracterização florística de comunidades vegetais de restinga em Bertioga. **Acta Botanica Brasílica**. v. 22, n. 1, p. 249–274, 2008.
- MARTINS, M. L. L. Fitofisionomia das formações vegetais da Restinga da Área de Proteção Ambiental (APA) de Guaibim, Valença, Bahia, Brasil. **Revista brasileira de Biociências**. v. 10, n. 1, p. 66-73, 2012.
- MELO, I. S.; FAULL, J. L. Scanning electron microscopy of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a biocontrol agent of witches' broom disease of cocoa. **Brazilian journal of microbiology**, v. 35, n. 4, p. 330-332, 2004.
- MENEZES, C. M.; SANTANA, F. D.; SILVA, V. S. A.; SILVA, V. I. S.; ARAÚJO, D. S. D. Florística e fitossociologia em um trecho de restinga no Litoral Norte do Estado da Bahia. **Biotemas**. v. 25, n. 1, p. 31-38, 2012.
- MISHRA, R. K.; PANDEY, B. K.; PATHAK, N.; ZEESHAN, M. BOX-PCR-and ERICPCR-based genotyping and phylogenetic correlation among *Fusarium oxysporum* isolates associated with wilt disease in *Psidium guajava* L. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 4, n. 1, p. 25-32, 2015.
- MÓNACO, C.; PERELLÓ, A.; ALIPPI, H. E.; PASQUARÉ, A. O. *Trichoderma* spp.: a biocontrol agent of *Fusarium* spp. and *Sclerotium rolfsii* by seed treatment. **Advances in Horticultural Science**. v. 5, p. 92-95, 1991.

MONTEZUMA, R. C. M.; ARAÚJO, D. S. D. Estrutura da Vegetação de uma Restinga Arbustiva Inundável no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio De Janeiro. **Pesquisas Botânica: Instituto Anchietao de Pesquisas**. n. 58, p. 157-176, 2007.

MUKHERJEE, P.; HORWITZ, B. A.; HERRERA-ESTRELLA, A. H.; SCHMOLL, M.; KENERLEY, C. M. *Trichoderma* research in the genome era. **Annual review of phytopathology**. v. 51, p. 105-129, 2013.

MUKHOPADHYAY, R.; KUMAR, D. *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**. v. 30, n. 1, p. 1-8, 2020.

NAHER, L.; YUSUF, U. K.; ISMAIL, A.; HOSSAIN, K. *Trichoderma* ssp.: a biocontrol agent for sustainable management of plant diseases. **Pak J Bot**, v. 46, n.4, p. 1489-1493, 2014

NOGUEIRA-LOPEZ, G.; GREENWOOD, D. R.; MIDDLEDITCH, M.; WINEFIELD, C.; EATON, C.; STEYAERT, J. M.; MENDOZA-MENDOZA, A. The apoplastic secretome of *Trichoderma virens* during interaction with maize roots shows an inhibition of plant defence and scavenging oxidative stress secreted proteins. **Frontiers in plant science**. v. 9, 2018.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of clinical microbiology**. v. 37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.

PARK, M. S.; BAE, K. S.; YU, S. H. Two new species of *Trichoderma* associated with green mold of oyster mushroom cultivation in Korea. **Mycobiolog**. v. 34, n. 3, p. 111-113, 2006.

PERSOON, C. H. Neuer Versuch einer systematischen Eintheilung der Schwämme. Neues Magazin für die Botanik. v. 1, p. 63-80, 1794.

RAJESH, R. W.; RAHUL, M.S.; AMBALAL, N. S. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. African Journal of Agricultural Research, v. 11, n. 22, p. 1952-1965, 2016.

REITHNER, B.; BRUNNER, K.; SCHUHMACHER, R.; PEISSL, I. SEIDL, V.; KRŠKA, R.; ZEILINGER, S. The G protein α subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. **Fungal Genetics and Biology**. v. 42, n. 9, p. 749-760, 2005.

- REIS, R.C.C. Palmeiras (Arecaceae) das restingas do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 20, n. 3, p.501-512, 2006.
- RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**. v. 28, p. 123-130, 2003.
- REYNOLDS, D. R. Proving the anamorphic connection. Pleomorphic fungi: The diversity and its taxonomic implications. p. 157-180, 1987.
- SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. The American Phytopathological Society. v. 96, n. 2, p. 195-206, 2006.
- SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied microbiology and biotechnology**. v. 87, n. 3, p. 787-799, 2010.
- SHORESH, M.; HARMAN, G.E.; MASTOURI, F. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annual Review Phytopathology*. v. 48, p. 21-43, 2010.
- STERN, M. J.; PROSSNITZ, E.; AMES, G. F. Role of the intercistronic region in post-transcriptional control of gene expression in the histidine transport operon of *Salmonella typhimurium*: involvement of REP sequences. **Molecular microbiology**. v. 2, n. 1, p. 141-152, 1988.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.
- VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; WOO1, S. L.; NIGRO, M.; MARRA, R. LOMBARDI, N.; PASCALE, A.; RUOCCO, M.; LANZUISE, S.; MANGANIELLO, G.; LORITO, M. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. **The Open Mycology Journal**. v. 8, p. 127-139, 2014.
- YOU, J.; DAI, H.; CHEN, Z.; LIU, G.; HE, Z.; SONG, F.; YANG, X.; FU, H.; ZHANG, L.; CHEN, X. Trichoderone, a novel cytotoxic cyclopentenone and cholesta-7, 22-diene-3 β , 5 α , 6 β -triol, with new activities from the marine-derived fungus *Trichoderma* sp. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 37, n. 3, p. 245-252, 2010.

ZEILINGER, S. GRUBER, S.; BANSAL, R.; MUKHERJEE, P. K. Secondary metabolism in *Trichoderma* – chemistry meets genomics. **Fungal biology reviews**. v. 30, n. 2, p. 74-90, 2016.

ZENG, Z. Q.; ZHUANG, W. Y. Two New Species and a New Chinese Record of *Hypocreaceae* as Evidenced by Morphological and Molecular Data. **Mycobiology**. v. 47, n. 3, p. 280-291, 2019.

ZHENG, C. J.; SUN, P. X.; JIN, G. L.; QIN, L. P. Sesquiterpenoids from *Trichoderma atroviride*, an endophytic fungus in *Cephalotaxus fortunei*. **Fitoterapia**. v. 82, n. 7, p. 1035-1038, 2011.