

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
CURSO DE BACHARELADO EM BIOLOGIA

Lucas Souza Sales

DIVERSIDADE GENÉTICA E TAXONOMIA DE FUNGOS FILAMENTOSOS  
CELULOLÍTICOS DO GÊNERO *Trichoderma* DA RESTINGA DE GUAIBIM,  
BAHIA.

CRUZ DAS ALMAS  
BAHIA – BRASIL  
2019

Lucas Souza Sales

DIVERSIDADE GENÉTICA E TAXONOMIA DE FUNGOS FILAMENTOSOS  
CELULOLÍTICOS DO GÊNERO *Trichoderma* DA RESTINGA DE GUAIBIM,  
BAHIA..

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.

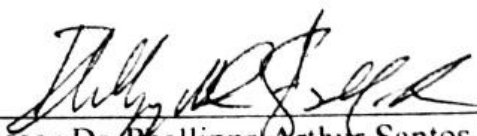
Orientador: Prof<sup>o</sup> Phellippe Arthur  
Santos Marbach

CRUZ DAS ALMAS  
BAHIA – BRASIL  
2019

Lucas Souza Sales

DIVERSIDADE GENÉTICA E TAXONOMIA DE FUNGOS FILAMENTOSOS  
CELULOLÍTICOS DO GÊNERO *Trichoderma* DA RESTINGA DE GUAIBIM,  
BAHIA.

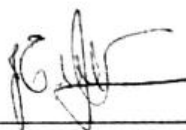
BANCA EXAMINADORA



---

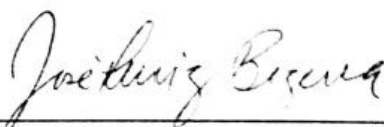
Professor Dr. Phillippe Arthur Santos Marbach  
(orientador)

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)



---

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



---

Professor Dr. José Luiz Bezerra  
Universidade Federal de Pernambuco (UFRB)

CRUZ DAS ALMAS

DEZEMBRO-2019

*Dedico esse trabalho a  
minha mãe, sem seu apoio e  
seu amor, eu não seria  
capaz de seguir em frente.*

## AGRADECIMENTOS

A todos os “moleques” da minha “quebrada”, aqueles que se foram sem oportunidade e aqueles que permanecem vivos, mas não conseguem viver.

Ao meu Pai (Josué Souza Sales), que sempre me deu bons conselhos, apoio moral e financeiro, nunca me deixou desamparado, buscando sempre me dar amor ao máximo, te amo coroa, nunca esqueça isso!

A minha rainha (Júcelia Fonseca Souza), que sempre se mantém preocupada comigo, tentando me mimar ao máximo, sempre me vendo como um menino indefeso, te amo mãe, você é a maior parte de mim.

A minha namorada (Larissa Souza Silva), que ao longo dessa formação sempre esteve presente, dando apoio, carinho, conselhos e muito amor, agradeço sempre pela sua presença na minha vida, te amo.

Ao meu primo Buiú (Josenilto B. Souza) e seu Pai (José Sales Souza) que se foi sem ver esse nosso momento de vitória.

Aos meus orientadores, Phellippe Marbach e Jackeline Andrade, pela dedicação, paciência e incentivo ao longo dessa “jornada inesperada”.

Aos meus amigos que sempre deixaram a vida um pouco mais leve, seja nas conversas diárias, nas festas pontuais e principalmente nas mesas de Magic/Pokémon/BattleScenes, onde alguns momentos são inesquecíveis, agradeço a vocês: Rafael, Daniel, Mauricio, Jhones, Robert, Lincon, Djalma, Zen, Rogger, Ariel, Rafael R.

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela formação;

A toda equipe de estagiários do Laboratório de biologia Evolutiva;

A toda equipe do Laboratório de Réptil e Anfíbio, pelas risadas e brincadeiras;

A todos os professores que contribuíram para minha formação;

A todos que de alguma forma me ajudaram.

Obrigado a todos por todo o apoio, direto ou indiretamente.

## EPÍGRAFE

“A história do pensamento, ou da razão, também é como a corrente de rio. Ela contém todos os pensamentos formulados por gerações de pessoas antes de você; e todos esses pensamentos determinam a sua maneira de pensar do mesmo modo como também o fazem as condições de vida do seu próprio tempo. Assim, não podemos afirmar que determinado pensamento está certo para sempre. Este pensamento pode estar correto no ponto em que você se encontra.”

O Mundo de Sofia – Jostein Gaarder

**SALES, Lucas Souza, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia de 2019. Diversidade genética e taxonomia de fungos filamentosos celulolíticos do gênero *Trichoderma* da Restinga de Guaibim, Bahia.** Orientador: Phellippe Arthur Santos Marbach. Co-Orientadora: Jackeline Pereira Andrade.

## 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 variabilidade genética de 38 isolados celulolíticos do gênero *Trichoderma* coletados na Mata Periodicamente Inundada da restinga de Guaibim, Bahia e realizar a identificação molecular desses fungos. O estudo de diversidade genética usando o *primer* BOX A 1R mostrou a existência de 27 perfis genéticos distintos entre os 38 isolados de *Trichoderma* analisados. Um perfil genético foi representado por quatro isolados e oito perfis diferentes foram observados em 16 isolados, com dois isolados por perfil. Os 18 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 identificação molecular os genes barcodes *teF1* (Fator de alongamento 1 alfa) e RPB2 (RNA polimerase II) foram seqüenciados e comparados com genes ortólogos dos tipos das espécies depositados na base de dados na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). A identificação molecular de 17 isolados revelou que eles são relacionados com espécies dos Clados *Spirale*, *Viride*, *Hypocreanum*, *Harzianum* e *Polysporum*. Análises filogenéticas usando o *teF1* e RPB2 mostraram que a diversidade de espécies dentro do Clado *Spirale* é maior do que a conhecida. Nesse trabalho são descritas duas novas espécies pertencentes ao clado *Spirale*, *Trichoderma* sp. nov. TR01MTS<sup>p21</sup>, TR06MTS<sup>p22</sup> e *Trichoderma* sp. nov. TR13MTS<sup>p25</sup> demonstrando que a diversidade desse clado é maior do que se pensava.

Palavras-chaves: Biodiversidade, Fungo, Restinga.

**SALES, Lucas Souza, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia de 2019. Genetic diversity, molecular identification and taxonomy of *Trichoderma* from Guaibim Restinga, Bahia.** Orientador: Phellippe Arthur Santos Marbach. Co-Orientadora: Jackeline Pereira Andrade.

## 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 activity, taxonomic groups are being lost before we know about their biotechnological importance. The objective of this work was to study the genetic variability of 38 *Trichoderma* cellulolytic isolates collected from the Periodically Flooded Forest of Guaibim restinga, Bahia and to identify these fungi molecularly. The genetic diversity study using the BOX A 1R primer showed the existence of 27 distinct genetic profiles among the 38 *Trichoderma* isolates analyzed. One genetic profile was represented by four isolates and eight different profiles were observed in 16 isolates, with two isolates per profile. The remaining 18 profiles were represented by one isolate per profile. These isolates were distributed in distinct groups in the genetic similarity dendrogram obtained by UPGMA clustering method and Jaccard coefficient from BOX-PCR genetic profiles. For molecular identification, the barcodes *teF1* (translation elongation factor 1 alpha) and *RPB2* (RNA polymerase II) genes were sequenced and compared to orthologous genes of the type species deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. Molecular identification of 17 isolates revealed that they are related to species the clades *Spirale*, *Viride*, *Hypocreanum*, *Harzianum* and *Polysporum*. Phylogenetic analyses using *teF1* and *RPB2* showed that species diversity within the *Spirale* was unnoticed before. In this work we describe two new species belonging in the *Spirale* clade, *Trichoderma* sp. nov TR01MTS<sup>p21</sup>, TR06MTS<sup>p22</sup> and *Trichoderma* sp. nov TR13MTS<sup>p25</sup> demonstrating that the diversity of this clade is greater than previously thought.

Keyword: Biodiversity, Fungus, Restinga.



## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2.REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>12</b>
2.1. Restinga.....	12
2.2. Taxonomia do gênero <i>Trichoderma</i> .....	12
2.3. Importância do gênero <i>Trichoderma</i> .....	14
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>15</b>

\_\_RefHeading\_\_ Toc509434176

**CAPÍTULO 1:** Diversidade genética e taxonomia de fungos filamentosos celulolíticos do gênero *Trichoderma* da restinga de Guaibim, Bahia.: Diversidade genética e identificação molecular dos fungos filamentosos celulolítico do gênero *Trichoderma* da serrapilheira da restinga de Guaibim, Bahia.

<b>3 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>4.MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
4.1Extração de DNA.....	25
4.2 Estudo de variabilidade genética.....	25
4.3 Amplificação e Ssequenciamento .....	26
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
<b>6 DISCUSSÕES.....</b>	<b>30</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>33</b>

**CAPÍTULO 2:** Prospectando a diversidade escondida de espécies nas bases de dados do NCBI: Clado *Spirale* como estudo de caso.

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>2 MATERIAIS E METODOS .....</b>	<b>44</b>
2.1 Recuperação das sequências de <i>T. spirale</i> .....	44
2.2 Análise filogenética.....	44
2.3 Caracterização Morfológica.....	44
2.4 Taxa de Crescimento.....	45
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
3.1 Análise Filogenética .....	47
3.2 Taxa de crescimento.....	51
3.3 Descrição de novas espécies.....	52
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>68</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A restinga vem sofrendo uma continua exploração antrópica devido a sua localização costeira (ROCHA et al., 2009). Esse ecossistema é alvo da constante expansão imobiliária, remoção de areia e da vegetação, utilização para depósito de lixo, além do registro de diversas ocorrências de aberturas de trilhas para facilitar o acesso à praia (AYRES et al., 1994; ROCHA et al., 2009).

Uma forma de minimizar o impacto antrópico é mostrar a importância básica e aplicada da biodiversidade abrigada pelo local, de modo a justificar a criação de áreas de proteção e/ou um melhoramento nas estratégias de preservação ambiental (MARTINS, 2012). A restinga é um ecossistema que abriga uma grande biodiversidade de espécies vegetais (SCHINEIDER et al., 2001; MARTINS et al., 2008; MARTINS et al., 2012; ROCHA et al., 2005), sendo parte dela endêmicas das restingas. De acordo com a base de dados Flora do Brasil 2020 (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do?lingua=en>) até o momento existe registro de 2459 espécies vegetais que ocorrem nas restingas do Brasil, sendo 1300 (52,8%) endêmicas do Brasil, e destas 321 (12,7%) são endêmicas das restingas. Além disso, algumas espécies presentes na restinga são oriundas de ecossistemas adjacentes à restinga durante a sua formação e não são mais encontradas em seus ecossistemas de origem (NARVAES et al., 2009; MARTINS et al., 2019).

Apesar da flora e fauna das restingas serem bem conhecidas existe uma escassez de dados sobre a microbiota desse ambiente, os poucos trabalhos são em sua maioria sobre fungos micorrízicos e leveduras (GOI & SOUZA, 2012; SILVA et al., 2013; CORDAZZO & STÜRMER, 2007; COGLIATTI-CARVALHO et al., 2001; MARTINS et al., 2019). Fungos filamentosos exercem um papel central na mineralização da matéria orgânica vegetal e na disponibilização dos seus nutrientes para a comunidade microbiana do solo e para as plantas (BINDSCHEDLER et al., 2016). Esse papel da comunidade de fungos filamentosos é particularmente importante, contudo, a diversidade de fungos filamentosos das restingas é pouco conhecida.

O gênero *Trichoderma* inclui espécies encontradas no solo, na matéria orgânica vegetal em decomposição e em plantas vivas como endofíticos. Espécies de *Trichoderma* são utilizadas na promoção do crescimento de plantas, no controle

biológico de doenças e pragas agrícolas e na produção de bioetanol, o que mostra o potencial biotecnológico desse gênero (CARVALHO et al., 2011; PATRICIO et al., 2001; DASHTBAN et al., 2010; ANDRADE et al., 2010; SEGARRA et al., 2013; VAN WEES et al., 2008). Atualmente são conhecidas mais de trezentas espécies de *Trichoderma* MycoBank [Banco de dados] disponível em: <http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Rec=39566&Fields=All>. Contudo, segundo um amplo estudo realizada por HU et al. (2019) em ecossistemas chineses, a diversidade das espécies de *Trichoderma* é pelo menos o dobro.

Existe uma escassez de dados sobre diversidade genética e taxonômica do gênero *Trichoderma* nos ecossistemas brasileiros, dentre eles as restingas. Dessa forma este trabalho teve como objetivo estudar a diversidade genética e realizar a identificação molecular de isolados de *Trichoderma* oriundos da serapilheira da restinga de Guaibim, BA.

## **2. – REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 – Restinga**

A Resolução do CONAMA nº 261/1999 define restinga como “um conjunto de ecossistemas que compreende comunidades vegetais florística e fisionomicamente distintas, situadas em terrenos predominantemente arenosos, de origens marinha, fluvial, lagunar, eólica ou combinações destas, de idade quaternária, em geral com solos pouco desenvolvidos. Essas comunidades vegetais formam um complexo vegetacional edáfico e pioneiro, que depende mais da natureza do solo que do clima, encontrando-se em praias, cordões arenosos, dunas e depressões associadas, planícies e terraços.” As restingas atuais tem origem no Holoceno, com as planícies litorâneas formadas por sedimentos que foram depositados em ambientes marinhos, continental ou transicional, no período Terciário ou Quaternário (DIAS & SILVA, 1984). As restingas abrigam diferentes tipos de fisionomias, herbáceas, arbustivas e arbóreas, que recebem a influência marinha e podem apresentar cobertura vegetal em mosaico (MARTINS, 2012; DIAS et al., 2008).

Devido a presença do solo bastante arenoso as plantas da restinga possuem dificuldades para se estabelecerem pelo fato da composição do solo ser essencialmente de quartzo com uma granulometria média entre 0,2 mm e 0,6 mm deixando espaço de ar entre os grão de areia. Essa forma de solo apresenta uma baixa capacidade de retenção de água (AZEVEDO et al., 2014). Associado a esse fator, ocorre uma baixa disponibilidade de nutrientes no solo, forçando as plantas a captar nutrientes da atmosfera ou nutrientes oriundos da vegetação morta que se depositam de forma lenta no solo (AZEVEDO et al., 2014). Devido a esses fatores as plantas tendem a buscar a cooperação com outros organismos que se encontram no solo, como fungos e bactérias que realizam a captação de nutrientes como o nitrogênio (N), ou que promovem um melhor crescimento radicular e aéreo (FREIRE et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2009; AZEVEDO et al., 2014).

### **2.2 – TAXONOMIA DO GENÊRO *Trichoderma***

Persoon descreveu as primeiras espécies de *Trichoderma* em 1794: *T. viride*, *T. globosum*, *T. flavum* e *T. dubium*. Contudo, seu tratamento taxonômico não possuía resolução e todas as espécies encontradas após Persoon foram identificadas como *T.*

*viride*. Em 1969 Rifai em sua monografia do gênero *Trichoderma* adotou o conceito de espécies agregadas e propôs a existência de nove agregados de espécies ou complexos de espécies. Posteriormente, Bissett (1984, 1991<sup>a</sup>, 1991<sup>b</sup>, 1991<sup>c</sup>) revisou os agregados de espécies de Rifai, analisando sua morfologia, macro e microscópicas, e dividiu o gênero em cinco seções: *Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Trichoderma*, *Saturnisporum*, *Hypocreanum* e algumas linhagens solitárias, defendendo a existência de 27 espécies morfológicas.

Com o surgimento das ferramentas moleculares muitas questões taxonômicas foram resolvidas dentro das seções propostas por Bissett e, naturalmente, outras surgiram. Kindermann et al. (1998), foram os primeiros a utilizarem ferramentas moleculares para resolver questões evolutivas e taxonômicas do gênero *Trichoderma*. Eles utilizaram sequências das regiões espaçadoras internas transcritas 1 e 2 do operon dos RNAs ribossomais e encontraram algumas incongruências entre a filogenia molecular baseada no ITS1 e 2 e a classificação morfológica das espécies de *Trichoderma*. Alguns anos depois, Druzhinina et al. (2005), propuseram pela primeira vez uma metodologia direta para identificação das espécies de *Trichoderma* utilizando o ITS como *barcode* do gênero associada a uma plataforma online exclusiva para *Trichoderma*. Posteriormente, com o crescente número de espécies de *Trichoderma* descritas a região ITS se mostrou pouco informativa para separar espécies afins dentro de algumas seções. Assim, outras regiões genômicas passaram a ser usadas para elucidar as relações filogenéticas entre as espécies de *Trichoderma*, como o RNA 18S e 28S, *TeF1*, actina (*act*), calmodulina (*calm*), entre outras (KULLNIG-GRADINGER et al., 2002; CHAVERRI et al., 2003; DRUZHININA, et al., 2005). Dentre estas novas marcas moleculares o *TeF1* era a que possuía uma maior resolução filogenética, portanto ela passou a ser reconhecida como o DNA *barcode* desse gênero (JAKLITSCH 2009, 2011, 2015; CHAVERRI et al., 2015; KUBICEK, et al., 2008). O uso da filogenia molecular na distinção de espécies foi particularmente importante no gênero *Trichoderma* pois existem grandes complexos de espécies crípticas, ou seja, impossíveis de serem distinguidas morfológicamente (CHAVERRI et al., 2015; DRUZHININA et al., 2010; SAMUELS et al., 2010; KUBICEK et al., 2008).

Seguindo as diretrizes do Código Internacional de Nomenclatura (ICN) para algas, fungos e plantas (Código de Melbourne, Art. 14.13), 254 nomes de espécies de *Trichoderma* foram aceitos em 2015 (BISSETT et al. 2015 ). Atualmente, são reconhecidas mais de 300 espécies de *Trichoderma* e, recentemente, HU et al. (2019)

sugeriram que o número de espécies ainda não descritas desse gênero é pelo menos o dobro do número de espécies conhecidas (CHEN & ZHUANG, 2017; QIN, & ZHUANG, 2017; ).

### 2.3 - IMPORTÂNCIA DO GÊNERO *Trichoderma*

Muitas das enzimas produzidas pelas indústrias são de origem fúngica, sendo o gênero *Trichoderma* um dos maiores produtores (ORLANDELLI et al., 2012; SAMUELS, 1996; KUMAR et al., 2012). Espécies desse gênero são utilizadas para a produção de fármacos, comidas, tecidos, tintas, bioetanol e no controle biológico contra fitopatógenos e/ou como promotores de o crescimento vegetal (SLATER et al., 1967; SONG et al., 2019; JIA et al., 2019; CHAVERRI et al., 2015; BRIAN et al., 1946; SILVA et al., 2019; CARVALHO FILHO, et al., 2008). As espécies *T. polysporum* e *T. inflatum* produzem um imunossupressor denominado ciclosporina A (CsA), que regula as respostas das células T. Esse mecanismo de ação quando suprimido pode auxiliar no tratamento de diferentes quadros hospitalares, sendo eles, doenças reumáticas, esquizofrenia, diabetes e no transplantes de órgãos (KUNII et al., 2019; MOON et al., 2019., UTINE et al., 2019).

*T. harzianum*, *T. viride*, *T. virens*, *T. asperellum*, entre outros, são capazes de produzir certas enzimas como a quitinase, xilanase e outras celulasas que possuem diversas aplicações agroindústrias (FELSE et al., 1999; LIU et al., 2006; ABD-AZIZ et al., 2008; LI et al., 2019). Espécies de *Trichoderma* também são usadas como agente de biocontrole contra fungos fitopatogênicos como *Fusarium oxysporum*, responsável por causar a murcha ou amarelecimento em plantas, e *Sclerotinia sclerotiorum* causadora do mofo branco em soja. Além disso, espécies de *Trichoderma* são utilizadas no controle biológico de nematóides (FERREIRA et al., 2008).

Devido a sua importância básica e aplicada existe um esforço sistemático da comunidade científica em estudar e explorar a diversidade taxonômica de *Trichoderma* e nos últimos cinco anos foram descritas 71 novas espécies desse gênero (QIAO et al., 2018). Contudo, ainda existe uma escassez de dados sobre diversidade genética e taxonômica do gênero *Trichoderma* nos ecossistemas brasileiros, dentre eles as restingas.

## REFERÊNCIAS

- ABD-AZIZ, Suraini et al. Effect of agitation and aeration rates on chitinase production using *Trichoderma virens* UKM1 in 2-1 stirred tank reactor. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 150, n. 2, p. 193-204, 2008.
- AFFOKPON, A. et al. Root endophytic status of west African biocontrol agents and implications for root-knot nematode management. **Nematropica**, v. 48, n. 1, p. 92-100, 2019.
- ANDRADE, Jackeline Pereira. Comunidade de fungos filamentosos celulolíticos da restinga de Guaibim–Bahia e seu potencial biotecnológico. 2014.
- AYRES, José Márcio et al. Os corredores ecológicos das florestas tropicais do Brasil. **Sociedade Civil Mimirauá**, Belém, PA (Brasil), 2005.
- AZEVEDO, Nathália Helena et al. Ecologia na restinga: uma sequência didática argumentativa. 2014.
- BINDSCHEDLER, Saskia; CAILLEAU, Guillaume; VERRECCHIA, Eric. Role of fungi in the biomineralization of calcite. **Minerals**, v. 6, n. 2, p. 41, 2016.
- BISSETT, John et al. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. **IMA fungus**, v. 6, n. 2, p. 263-295, 2015.
- BISSETT, John. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. **Canadian journal of botany**, v. 62, n. 5, p. 924-931, 1984.
- BISSETT, John. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. **Canadian journal of botany**, v. 69, n. 11, p. 2357-2372, 1991.<sup>a</sup>
- BISSETT, John. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. **Canadian journal of botany**, v. 69, n. 11, p. 2373-2417, 1991.<sup>b</sup>
- BISSETT, John. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, n. 11, p. 2418-2420, 1991.<sup>c</sup>
- BRIAN, P. W. et al. The production of viridin by pigment - forming strains of *Trichoderma viride*. **Annals of Applied Biology**, v. 33, n. 2, p. 190-200, 1946.
- BUNBURY-BLANCHETTE, Adèle L.; WALKER, Allison K. *Trichoderma* species show biocontrol potential in dual culture and greenhouse bioassays against *Fusarium basal* rot of onion. **Biological control**, v. 130, p. 127-135, 2019.
- CARVALHO FILHO, M. R. et al. Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético in vitro e colonização endofítica de mudas de eucalipto. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2008.

CARVALHO, Daniel DC et al. Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Embrapa Arroz e Feijão-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2011..

CHAVERRI, Priscila et al. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 27, n. 2, p. 302-313, 2003.

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, Kai; ZHUANG, Wen-Ying. Discovery from a large-scaled survey of *Trichoderma* in soil of China. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 9090, 2017.

COGLIATTI-CARVALHO, LUCIANA et al. Variação na estrutura e na composição de *Bromeliaceae* em cinco zonas de restinga no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Macaé, RJ. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 1, p. 1-9, 2001.

CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente (1999) - Resolução CONAMA nº 261, de 30 de Junho de 1999 . Aprova parâmetro básico para análise dos estágios sucessivos de vegetação de restinga para o Estado de Santa Catarina. **Publicado no Diário Oficial da União**, nº 146, 1999.

CORDAZZO, César Vieira; STÜRMER, Sidney Luiz. Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em *Panicum racemosum* (P. Beauv.) Spreng (*Poaceae*) em dunas costeiras do extremo sul do Brasil. 2007.

DASHTBAN, Mehdi et al. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. **Critical reviews in biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 302-309, 2010.

DE OLIVEIRA, JOÃO RICARDO GONÇALVES et al. O papel da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) autóctones no desenvolvimento de espécies vegetais nativas em área de dunas de restinga revegetadas no litoral do Estado da Paraíba. **Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2009.

DIAS, G. T. M.; SILVA, C. G. Geologia de depósitos arenosos costeiros emersos-exemplos ao longo do litoral fluminense. **UFF, Simpósio sobre Restingas Brasileiras**, v. 1, p. 47-60, 1984.

DIAS, Henrique Machado; SOARES, Mário Luiz Gomes. As Fitofisionomias das Restingas do Município de Caravelas (Bahia-Brasil) e os bens e serviços associados. **Boletim técnico-científico do CEPENE**, v. 16, n. 1, p. 59-74, 2008.

DRUZHININA, Irina 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, Irina S. et al. The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, p. 94, 2010.

FELSE, P. Arthur; PANDA, T. Self-directing optimization of parameters for extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in batch mode. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 6-7, p. 563-566, 1999..

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

FRAGA, Marcelo Elias et al. Micobiota do solo de uma área de duna na Restinga da Marambaia, Rio de Janeiro, RJ. **Floresta e Ambiente**, v. 17, n. 1, p. 30-36, 2012.

FREIRE, Maria das Graças Machado et al. Bioprospecção da flora fúngica endofítica da reserva de jurubatiba. **Biológicas & Saúde**, v. 6, n. 21, 2016.

GILLIS, Monique et al. Polyphasic taxonomy. In: **Bergey's Manual® of systematic bacteriology**. Springer, New York, NY, 2001. p. 43-48.

GOI, Silvia Regina; SOUZA, Francisco A. de. Diversidade de microrganismos do solo. **Floresta e Ambiente**, v. 13, n. 2, p. 46-65, 2012.

HE, Anle et al. Reprogrammed endophytic microbial community in maize stalk induced by *Trichoderma asperellum* biocontrol agent against *Fusarium* diseases and mycotoxin accumulation. **Fungal biology**, v. 123, n. 6, p. 448-455, 2019.

HU, Jindong et al. Large - scale *Trichoderma* diversity was associated with ecosystem, climate and geographic location. **Environmental microbiology**, 2019.

JAKLITSCH, W. M.; VOGLMAYR, H. Biodiversity of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) in Southern Europe and Macaronesia. **Studies in mycology**, v. 80, p. 1-87, 2015.

JAKLITSCH, Walter M. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. **Studies in mycology**, v. 63, p. 1-91, 2009.

JAKLITSCH, Walter M. European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores. **Fungal diversity**, v. 48, n. 1, p. 1-250, 2011.

JIA, Mengyun et al. Structural characteristics and functional properties of soluble dietary fiber from defatted rice bran obtained through *Trichoderma viride* fermentation. **Food Hydrocolloids**, v. 94, p. 468-474, 2019.

KINDERMANN, Johanna et al. Phylogeny of the Genus *Trichoderma* Based on Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Region 1 of the rDNA Cluster. **Fungal Genetics and Biology**, v. 24, n. 3, p. 298-309, 1998.

KUBICEK, Christian P.; KOMON-ZELAZOWSKA, Monika; DRUZHININA, Irina S. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 10, p. 753, 2008.

KULLNIG-GRADINGER, Cornelia M.; SZAKACS, George; KUBICEK, Christian P. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. **Mycological Research**, v. 106, n. 7, p. 757-767, 2002.

KUMAR, D. Praveen et al. Studies on exo-chitinase production from *Trichoderma asperellum* UTP-16 and its characterization. **Indian journal of microbiology**, v. 52, n. 3, p. 388-395, 2012.

KUNII, Yasuto et al. Differential protein expression of DARPP-32 versus Calcineurin in the prefrontal cortex and nucleus accumbens in schizophrenia and bipolar disorder. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

LI, Chen et al. Duckweed (*Lemna minor*) is a novel natural inducer of cellulase production in *Trichoderma reesei*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 127, n. 4, p. 486-491, 2019.

LIU, Jia et al. Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2347-2351, 2006.

MARTINS, Márcio Lacerda Lopes. 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, 2012.

MOON, Daeun; KIM, Jinu. Cyclosporin A aggravates hydrogen peroxide-induced cell death in kidney proximal tubule epithelial cells. **Anatomy & cell biology**, v. 52, n. 3, p. 312-323, 2019.

NARVAES, Patrícia; BERTOLUCI, Jaime; RODRIGUES, Miguel Trefaut. Composição, uso de hábitat e estações reprodutivas das espécies de anuros da floresta de restinga da Estação Ecológica Juréia-Itatins, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 2, p. 117-123, 2009.

ORLANDELLI, Ravelly Casarotti et al. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, 2012.

PATRICIO, Flávia RA; KIMATI, Hiroshi; BARROS, Benedito C. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonísticos a *Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, v. 27, n. 2, p. 223-229, 2001.

PERSOON, Ch H. Neuer Versuch einer systematischen Eintheilung der Schwämme. **Neues Magazin für die Botanik**, v. 1, p. 63-128, 1794.

PINTO DA SILVA, Gerarda Beatriz et al. Biological control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) in lettuce using Brazilian *Trichoderma* spp. Strains. **Australian Journal of Crop Science**, v. 13, n. 6, p. 803, 2019.

QIAO, Min et al. Three new species of soil-inhabiting *Trichoderma* from southwest China. **MycKeys**, n. 44, p. 63, 2018.

QIN, Wen-Tao; ZHUANG, Wen-Ying. Seven new species of *Trichoderma* (*Hypocreales*) in the *Harzianum* and *Strictipile* clades. **Phytotaxa**, v. 305, n. 3, p. 121-139, 2017.

RIFAI, M. A. A revision of the genus *Trichoclerma*. **Mycol. Pap.** 116: 1-56. 1969.

ROCHA, Carlos Frederico Duarte et al. CAPÍTULO 13 RÉPTEIS E SUA CONSERVAÇÃO NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.

ROCHA, CF D. et al. Endemic and threatened tetrapods in the restingas of the biodiversity corridors of Serra do Mar and of the Central da Mata Atlântica in eastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, n. 1, p. 159-168, 2005.

SAMUELS, Gary J. et al. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. **Mycologia**, v. 102, n. 4, p. 944-966, 2010.

SAMUELS, Gary J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycological research**, v. 100, n. 8, p. 923-935, 1996.

SCHINEIDER, José Alberto P.; TEIXEIRA, Rogério L. Relacionamento entre anfíbios anuros e bromélias da restinga de Regência, Linhares, Espírito Santo, Brasil. **Iheringia**, v. 91, p. 41-48, 2001.

SEGARRA, Guillem et al. Effectiveness of biological control of *Phytophthora capsici* in pepper by *Trichoderma asperellum* strain T34. **Phytopathologia Mediterranea**, p. 77-83, 2013.

SILVA, Cristiane Figueira da et al. Fauna edáfica em área periodicamente inundável na restinga da Marambaia, RJ. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, n. 3, p. 587-595, 2013.

SILVA, Roberto N. et al. *Trichoderma*/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. **Fungal biology**, v. 123, n. 8, p. 565-583, 2019.

SLATER, G. P. et al. Metabolic products from a *Trichoderma viride* Pers. ex Fries. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 92-96, 1967.

SONG, Yin-Ping et al. Nitrogenous cyclonerane sesquiterpenes from an algicolous strain of *Trichoderma asperellum*. **Organic Chemistry Frontiers**, v. 6, n. 21, p. 3698-3704, 2019.

UTINE, Canan Asli; STERN, Michael; AKPEK, Esen Karamursel. Immunopathological features of severe chronic atopic keratoconjunctivitis and effects of topical cyclosporine treatment. **Ocular immunology and inflammation**, v. 27, n. 7, p. 1184-1193, 2019

VAN WEES, Saskia CM; VAN DER ENT, Sjoerd; PIETERSE, Corne MJ. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 4, p. 443-448, 2008.

Welsh, J., & McClelland, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic acids research**. 18(24), 7213-7218. 1990.

WILLIAMS, John GK, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic acids research**. 18.22: 6531-6535. 1990.

Capítulo 1: Diversidade genética e taxonomia de fungos filamentosos celulolíticos do gênero *Trichoderma* da restinga de Guaibim, Bahia.

**SALES, Lucas Souza, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia de 2019. Diversidade genética e taxonomia de fungos filamentosos celulolíticos do gênero *Trichoderma* da Restinga de Guaibim, Bahia.** Orientador: Phellippe Arthur Santos Marbach. Co-Orientadora: Jackeline Pereira Andrade.

## RESUMO

O gênero *Trichoderma* possui atualmente mais de 300 espécies descritas nos registros bibliográficos, e esse número vem aumentando devido a capacidade de acesso a essa biodiversidade fúngica. Além disso, esse gênero possui uma grande aplicabilidade biotecnológica em diferentes setores, aumentando assim o interesse em novas espécies e em seu potencial desconhecido. O objetivo desse trabalho foi estudar a variabilidade genética de 36 isolados celulolíticos do gênero *Trichoderma* coletados na Mata Periodicamente Inundada da restinga de Guaibim, Bahia e realizar a identificação molecular desses fungos. A extração do DNA foi realizada utilizando o método CTAB usando culturas crescidas em Ágar Extrato de Malte (MEA) 20 % e incubadas em BOD à 28 °C por um período de 4 dias. A diversidade genética dos isolados foi analisada por meio do BOX-PCR. O estudo de diversidade genética usando o *primer* BOX A 1R mostrou a existência de 27 perfís genéticos distintos entre os 38 isolados de *Trichoderma* analisados, sendo um perfil genético representado por quatro isolados, oito perfis representados por dois isolados e 18 perfis representados por um isolado. Estes isolados ficaram distribuídos em dois grupos distintos no dendrograma de similaridade genética obtidos pelo método de agrupamento UPGMA e coeficiente Jaccard a partir dos perfis genéticos do BOX-PCR. A identificação molecular de 17 isolados feita a partir do sequenciamento de regiões dos genes *teF1* e *RPB2* mostrou que eles são relacionados com espécies dos Clados *Spirale*, *Viride*, *Hypocreanum*, *Harzianum* e *Polysporum* e que alguns isolados são potencialmente novas espécies.

Palavras-chaves: Biodiversidade, Fungo, Restinga.

**SALES, Lucas Souza, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia de 2019. Genetic diversity, molecular identification and taxonomy of *Trichoderma* from Guaibim Restinga, Bahia.** Orientador: Phellippe Arthur Santos Marbach. Co-Orientadora: Jackeline Pereira Andrade.

#### ABSTRACT

The genus *Trichoderma* currently has more than 300 species described in bibliographic records, and this number has been increasing. Moreover, this genus has great biotechnological applicability in different sectors, thus increasing the interest in new species and their unknown potential cellulolytic. The objective of this work was to study the genetic variability of 36 *Trichoderma* isolates collected from the Periodically Flooded Forest of Guaibim restinga, Bahia and to identify these fungi molecularly. DNA extraction was performed using the CTAB method using cultures grown on 20% Malt Extract Agar and incubated at 28 ° C for a period of 4 days. The genetic diversity of the isolates was analyzed by BOX-PCR. The genetic diversity study using the BOX A 1R primer showed 27 distinct genetic profiles among the 38 *Trichoderma* isolates analyzed, one genetic profile represented by four isolates, eight profiles represented by two isolates and 18 profiles represented by one isolate. These isolates were distributed in two distinct groups in the genetic similarity dendrogram obtained by the UPGMA clustering method and Jaccard coefficient from the BOX-PCR genetic profiles. RPB2 has shown that they are related to species of the *Spirale*, *Viride*, *Hypocreanum*, *Harzianum* and *Polysporum* clades and that some isolates are potentially new species.

Keyword: Biodiversity, Fungus, Restinga

### 3 INTRODUÇÃO

A restinga está presente em diferentes regiões da costa brasileiras e possui uma grande biodiversidade (ZICKEL et al., 2004). Porém, essa diversidade vem sendo ameaçada por ações antrópicas (ROCHA et al., 2009). A destruição das restingas devido à ação antropogênica é preocupante, uma vez que esse ecossistema possui diversas espécies endêmicas e relictuais originadas de ecossistemas adjacentes durante seu processo de formação e que não são mais encontradas em seus ecossistemas de origem (FREIRE, 1990). Esse infortúnio vem sendo observado na restinga de Guaibim, onde ocorre uma forte especulação imobiliária, seguida de uma massiva retirada ilegal de areia (ANDRADE et al., 2010; AYRES et al., 1994; ROCHA et al., 2009). Essa mineração ilegal dentro de uma área de preservação ambiental reflete quão equivocada é a aplicação das leis de proteção ambiental (SILVA & SARAIVA, 2018). Essa exploração antrópica que acontece na restinga acarreta na perda da biodiversidade dessa região o que justifica intensificar estudos sobre a diversidade biológica nesse ecossistema, em todos os níveis taxonômicos (FRAGA et al., 2010; DE SÁ et al., 2002; AMORIM et al., 2007).

Existe uma escassez de estudos sobre a diversidade e potencial biotecnológico da microbiota das restingas uma vez que a maioria dos estudos que envolve diversidade biológica das restingas estão relacionados com a sua flora e da fauna (MARTINS et al., 2008; ZICKEL et al., 2004; ROCHA et al., 2009; MARTINS, 2012). Todavia, fungos filamentosos como o gênero *Trichoderma* são responsáveis pela mineralização da matéria orgânica vegetal e biodisponibilização dos seus nutrientes para a comunidade microbiana do solo e para as plantas. Esse papel ecológico da comunidade de fungos filamentosos é particularmente importante nas restingas visto que o solo desses ecossistemas é pobre em nutrientes. Além disso, o gênero *Trichoderma* possui grande relevância biotecnológica, pois são produtores de enzimas e metabólitos secundários de importância uso industriais (FELSE & PANDA, 1999), além de várias espécies desse gênero serem usadas no biocontrole contra fitopatógenos (MOKHTARI et al., 2018; KONAPPA et al., 2018; HEO et al., 2018; ABBASI et al., 2016; RIBERA et al., 2017). Portanto este trabalho teve como objetivo estudar a diversidade genética de isolados do gênero *Trichoderma* oriundos da serapilheira da Mata periodicamente Inundada da restinga de Guaibim, Bahia.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Extração de DNA

Foram realizadas extração de DNA de 38 isolados do gênero *Trichoderma* da restinga da APA de Guaibim utilizando o protocolo de Doyle e Doyle (1990) modificado. Após o período de crescimento, o micélio foi macerado dentro de um almofariz com nitrogênio líquido. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL do tampão de extração (CTAB) aquecido em banho-maria a 60 °C onde foi macerado novamente até aparentar homogeneidade, em seguida o material foi transferido para um tubo do tipo eppendorf de 2,0 mL. Os tubos foram incubados em banho-maria a 65 °C por 30 minutos onde há cada 10 minutos foram agitados manualmente. Em seguida, acrescentados 650 uL de clorofórmio: álcool isoamílico (CIA-24:1) e misturados manualmente até formar emulsão. Após formação de emulsão os tubos foram centrifugados a 13.523 rcf por 5 minutos, esse processo foi realizado 3 vezes e em cada “lavagem” o sobrenadante era recuperado. Após a recuperação do sobrenadante um volume igual de isopropanol gelado foi adicionado e em seguida a amostra foi colocada por 10 min em um ultrafreezer (– 80 °C). Após esse período, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante descartado. O pellet formado foi lavado duas vezes com etanol 70 %, e levado para ser secado em temperatura ambiente em uma estufa previamente estéril e ligada, visando reduzir as chances de contaminação. Após a secagem o pellet foi ressuspenso em 49 µL de TE contendo 0,30 µg. mL<sup>-1</sup> de RNase em concentração final, a amostra foi incubada por 30 minutos em banho-maria a 37° C para a ressuspenso do DNA e ação enzimática da RNase.

### 4.2 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 MgCl<sub>2</sub> (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

Termo Ciclador 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. Posteriormente foi feita uma matriz de distância binária no programa Microsoft Office Excel 14.0 (Office 365), atribuindo 0 para a ausência de marca molecular e 1 para a presença. O programa P.A.S.T versão 3.20, foi utilizado para construção do dendrograma empregando o coeficiente de Jaccard e o método Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA). Após a construção do Dendrograma foram selecionados alguns isolados para a amplificação, purificação e sequenciamento do gene *teF1* e *RPB2*.

#### 4.3 - Amplificação e sequenciamento

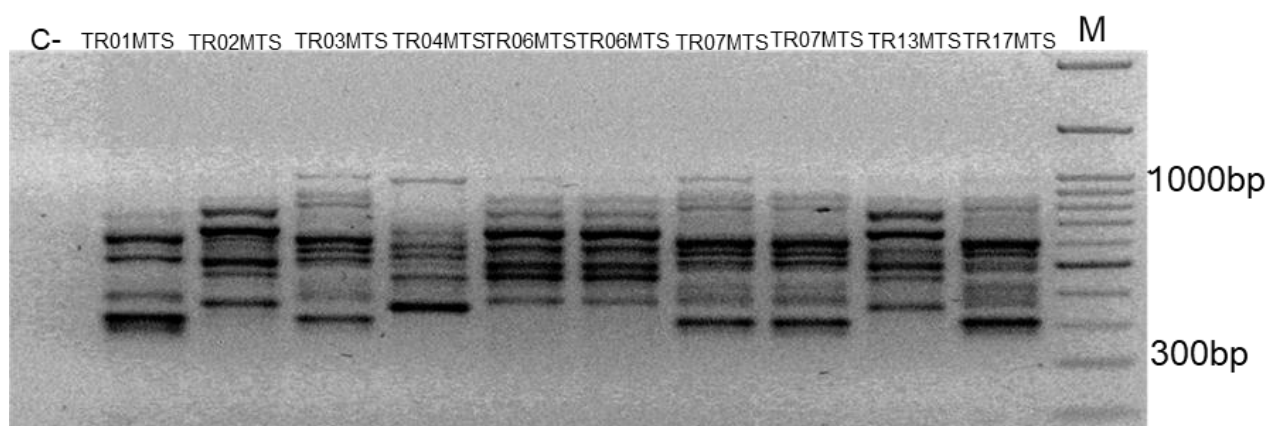
A amplificação e sequenciamento de regiões dos genes *RPB2* e *teF1* foram realizados utilizando os primers fRPB2-5F – 5' - (GAY GAY MGW GAT CAY TTY GG) - 3' e fRPB2\_7cR – 5' – (CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT) – 3' (LIU et al.1999; CHAVERRI & SAMUELS, 2003.), para amplificação do *RPB2*, os primers F-TEF1-728 F (5' CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG 3') e TEF1-LLErev (5' AAC TTG CAG GCA ATG TGG 3') para a amplificação do *teF1* (JAKLITSCH & VOGLMAYR, 2015; DRUZHININA et al., 2005). A reação final para a amplificação dessas regiões foi de 25 µL, contendo: água ultrapura altoclavada, 0,25 mM dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8 pmol dos iniciadores TEF1-728 forward e TEF1-LLErev reverse, 1U taq polimerase e 10 ng de DNA do fungo. A programação usada para a execução dessa reação foi feita no termo ciclador nas seguintes condições, para *RPB2*: desnaturação inicial de 95 °C (10min), 40 ciclo de 94 °C (30s), 50 °C (30s), 72 °C (1min), extensão final de 72 °C (10min) (CHAVERRI & SAMUELS, 2003). A programação para o *teF1*, iniciou com a desnaturação inicial com 94 °C (5min), com 40 ciclos de 94 °C (45s), 52 °C (30s), 72 °C (90s), com extensão final de 72 °C (6min). Os produtos da PCR foram purificados 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 foram enviados para serem sequenciados na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de

Biociencia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático AB 3500 *Genetic Analyzer* com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). As sequências foram editadas no programa Chromas 2.6.2 (Technelysium DNA Sequencing Software).

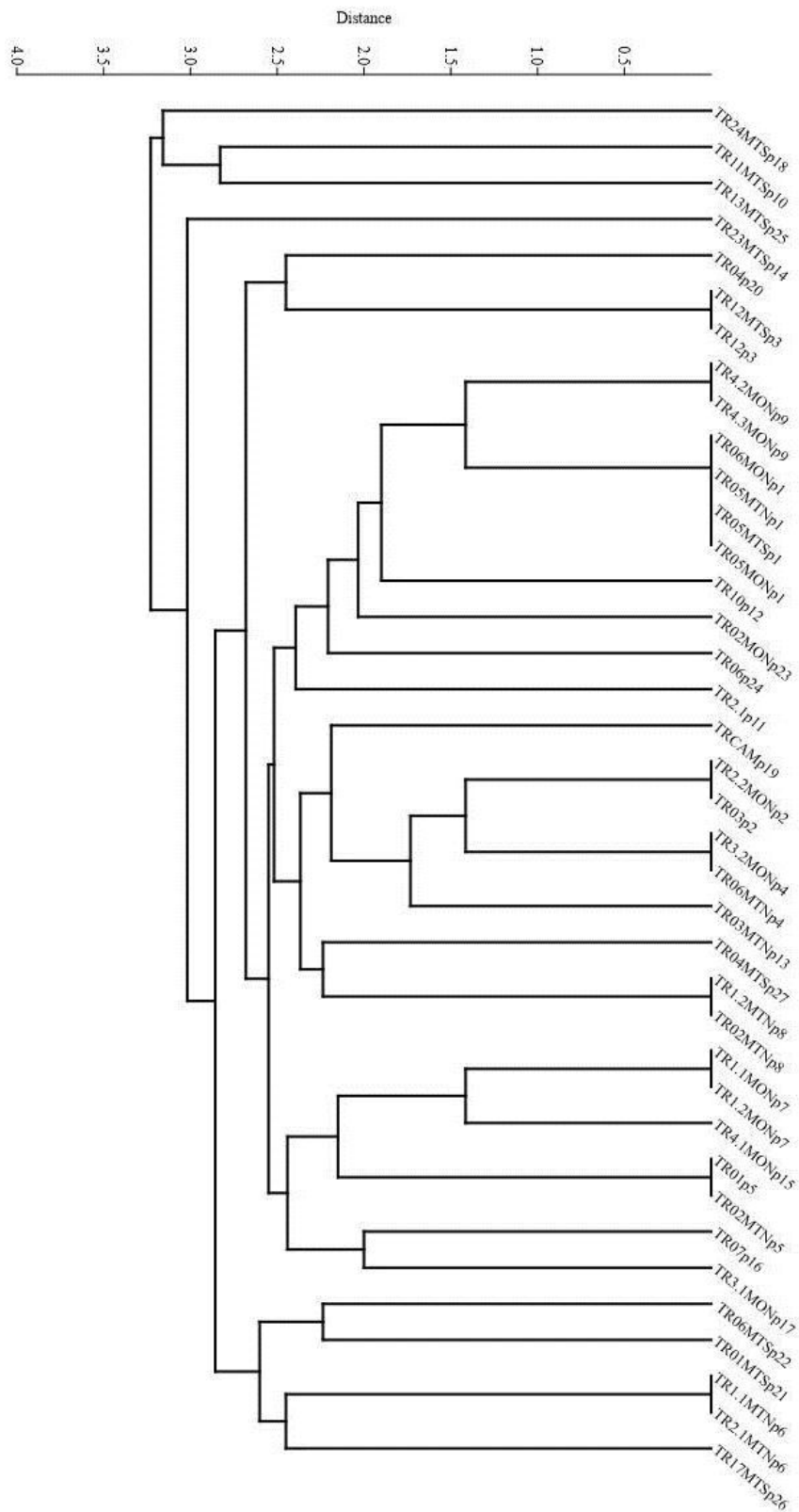
## 5 RESULTADOS

O BOX-PCR realizado com os isolados de *Trichoderma* apresentou polimorfismo e o tamanho dos fragmentos amplificados ficou entre 200-1000pb. O número de marcas moleculares produzidas variou entre 5 e 9 nos diferentes isolados de *Trichoderma*. Foram obtidas 30 marcas moleculares polimórficas (Figuras 1).

Foram obtidos 27 perfis genéticos distintos, sendo, 1 perfil representado por 4 isolados, 8 perfis diferentes com dois isolados cada e 16 perfis únicos representados por apenas um único isolado. Não foi observada uma relação entre a topologia do dendrograma e local onde os isolados foram obtidos (Figura 2).



**Figura 1:** Amplificação do elemento BOX dos isolados de *Trichoderma* da região de Mata Sul (MTS).



**Figura 2:** Dendrograma dos isolados do gênero *Trichoderma* gerado a partir do marcador molecular BOX com a identificação do perfil (p), demonstrando a formação de distintos grupos com similaridade abaixo de 30%.

Dezessete isolados com perfís genéticos distintos foram selecionados para identificação molecular via para a amplificação e sequenciamento de regiões dos gene *teF1* e RPB2, esse isolados foram: TR05MON<sup>p1</sup>, TR1.1MTNS<sup>p6</sup>, TR1.MTN<sup>p8</sup>, TR3.2MON<sup>p4</sup>, TR4.1MON<sup>p15</sup>, TR4.2MON<sup>p9</sup>, TRCAM<sup>p19</sup>, TR1.1MON<sup>p7</sup>, TR24MTS<sup>p18</sup>, TR3.1MON<sup>p17</sup>, TR04<sup>p20</sup>, TR17MTS<sup>p26</sup>, TR04MTS<sup>p27</sup>, TR06MTS<sup>p22</sup>, TR13MTS<sup>p25</sup>, TR01MTS<sup>p21</sup>, TR03<sup>p2</sup>. As sequências de nucleotídeos dos genes *teF1* e RPB2 dos isolados de *Trichoderma* foram comparadas com as sequências depositadas nas bases de dados do NCBI utilizando o programa BLASTN. Conforme os resultados dessa análise os isolados TR05MON<sup>p1</sup>, TR1.1MTNS<sup>p6</sup>, TR1.2MTN<sup>p8</sup>, TR3.2MON<sup>p4</sup>, TR4.2MON<sup>p9</sup>, TR06MTS<sup>p22</sup>, TR13MTS<sup>p25</sup>, TR01MTS<sup>p21</sup>, TR03<sup>p2</sup> são relacionados com *T. spirale*, os isolados TR17MTS<sup>p26</sup> e TR04MTS<sup>p24</sup> são relacionados com *T. sparsum*, os isolados , TR24MTS<sup>p18</sup>, TR3.1MON<sup>p17</sup> e TR04<sup>p20</sup> são relacionados com *T. breve* o isolado TR4.1MON<sup>p15</sup> é relacionado com *T. confluens* e o isolado o isolado TRCAM<sup>p19</sup> é relacionado com *T. paratroviride* o isolado TR1.1MON<sup>p7</sup> é isolado com *T. minutisporum*. Dessa forma, os isolados identificados estão distribuídos nos clados *Viride*, *Hypocreanum*, *Spirale*, *Harzianum*, *Polysporum*, do gênero *Trichoderma* (Tabela 1). Devido a presença de dois fragmentos do *teF1* na espécie tipo de *T. spirale* (DAOM:183974) foi necessário realizar dois blastn. O fragmento do gene de maior identidade (Max Ident.) e cobertura (Cobert.) corresponde a região éxon e a região com menor identidade e menor cobertura a região intron.

**Tabela 1** – Identificação molecular via BLASTn do isolados de *Trichoderma* utilizando *teF1* e RPB2, em comparação com as espécies tipo mais próximas registradas no NCBI.

Isolados	Genes	Fragmento (bp)	Cobert. (%)	Max Ident. (%)	Tipo	Identificação	Nº de Acesso GeneBank	Clado
TR05MON <sup>p1</sup>	<i>teF1</i>	1249	50	99.68	<i>Trichoderma spirale</i>	DAOM:183974	AF534626.1	<i>Spirale</i>
			38	96.91			EU280049.1	
TR1.1MTN <sup>p6</sup>	<i>teF1</i>	1255	50	99.68	<i>Trichoderma spirale</i>	DAOM:183974	AF534626.1	<i>Spirale</i>
			38	97.74			EU280049.1	
TR1.2MTN <sup>p8</sup>	<i>teF1</i>	1257	50	99.68	<i>Trichoderma spirale</i>	DAOM:183974	AF534626.1	<i>Spirale</i>
			38	96.93			EU280049.1	
TR3.2MON <sup>p4</sup>	<i>teF1</i>	1179	47	99.64	<i>Trichoderma</i>	DAOM:183974	AF534626.1	

			40	97.11	<i>spirale</i>		EU280049.1	<i>Spirale</i>
TR4.1MON <sup>15</sup>	<i>teF1</i>	1361	76	93.87	<i>Trichoderma confluens</i>	HMAS:244993	KT001959.1	<i>Hypocreanum</i>
TR4.2MON <sup>p9</sup>	<i>teF1</i>	1170	88	99.68	<i>Trichoderma spirale</i>	DAOM:183974	EU280049.1	<i>Spirale</i>
TRCAM <sup>p19</sup>	<i>teF1</i>	1272	98	96.20	<i>Trichoderma paratroviride</i>	CBS:136489	KJ665627.1	<i>Viride</i>
TR1.1MON <sup>p7</sup>	<i>teF1</i>	820	60	92.35	<i>Trichoderma minutisporum</i>	DAOM167069	KJ665612.1	<i>Polysporum</i>
TR24MTS <sup>p18</sup>	<i>teF1</i>	824	100	99.76	<i>Trichoderma breve</i>	HMAS:248844	KY688045.1	<i>Harzianum</i>
TR3.1MON <sup>p17</sup>	<i>teF1</i>	812	100	99.88	<i>Trichoderma breve</i>	HMAS:248844	KY688045.1	<i>Harzianum</i>
TR04 <sup>p20</sup>	<i>teF1</i>	787	100	99.87	<i>Trichoderma breve</i>	HMAS:248844	KY688045.1	<i>Harzianum</i>
TR17MTS <sup>p26</sup>	<i>teF1</i>	1303	99	96.33	<i>Trichoderma sparsum</i>	HMAS:273759	KU529136.1	<i>Viride</i>
TR04MTS <sup>p24</sup>	<i>teF1</i>	1303	100	98.25	<i>Trichoderma sparsum</i>	HMAS:273759	KU529136.1	<i>Viride</i>
TR06MTS <sup>p22</sup>	<i>teF1</i>	1249	50	99.68	<i>Trichoderma spirale</i>		AF534626.1	<i>Spirale</i>
			38	97.11	<i>Trichoderma spirale</i>		EU280049.1	<i>Spirale</i>
	<i>RPB2</i>	903	79	99.78	<i>Trichoderma spirale</i>	DAOM 183974	AF545553.1	<i>Spirale</i>
TR13MTS <sup>p25</sup>	<i>teF1</i>	901	50	99.68	<i>Trichoderma spirale</i>		AF534626.1	<i>Spirale</i>
			38	97.66	<i>Trichoderma spirale</i>	DAOM 183974	EU280049.1	<i>Spirale</i>
	<i>RPB2</i>	903	78	99.67	<i>Trichoderma spirale</i>		AF545553.1	<i>Spirale</i>
TR01MTS <sup>p21</sup>	<i>teF1</i>	1248	50	99.68	<i>Trichoderma spirale</i>	DAOM 183974	AF534626.1	<i>Spirale</i>
			38	96.89	<i>Trichoderma spirale</i>		EU280049.1	<i>Spirale</i>
TR03 <sup>p2</sup>	<i>teF1</i>	1257	50	99.68	<i>Trichoderma spirale</i>	DAOM 183974	AF534626.1	<i>Spirale</i>
			38	97.75	<i>Trichoderma spirale</i>		EU280049.1	<i>Spirale</i>

## 6 DISCUSSÃO

Os marcadores genéticos são usados para estudar diversidade genética de microrganismos desde os anos 1980. Stern et al. (1988), demonstraram a presença de DNA repetitivo em *Salmonella typhimurium* surgindo o primeiro *fingerprint* em nível molecular para microrganismos, o REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*). A técnica de RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) foi inicialmente desenvolvida por Williams et al. (1990) simultaneamente Welsh e McClelland (1990) Mais tarde Hulton, Higgins e Sharp (1991) descreveram a presença de um novo elemento repetitivo em *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *enterobacteria* (*Yersinia pseudotuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*) o ERIC (*Repetitive*

*Intergenic Consensus*) e em 1992 o marcador molecular BOX-PCR foi descrito para *Streptococcus pneumoniae* por Martin, et al. (1992).

Esses marcadores são utilizados na caracterização da diversidade genética de microrganismos sejam eles eucariotos ou procariotos, uma vez que são regiões que possuem uma alta taxa de conservação e estão distribuídas de maneira generalizada nos genomas desses organismos. Esses marcadores moleculares tem sido utilizados como *fingerprint* para distinguir espécies ou mesmo cepas de uma espécie, uma vez que as chances de microrganismos não relacionados filogeneticamente terem o mesmo perfil genético são mínimas (CLAVERYS et al., 1998; VERSALOVIC et al., 1993; MISHRA et al., 2013, 2015; BILUNG et al., 2018; CHEN et al., 2013; YOKE-KQUEEN et al., 2013; WEISING, 1994). Desse modo, esses marcadores genéticos são utilizados para a caracterização da diversidade genética de diversos microrganismos, visando tanto a diferenciação das espécies na genotipagem ou para triagem bacteriana ou fúngica (WONG & LIN, 2001; VAN BELKUM et al., 2001; ZHU et al., 2001). Nesse estudo os elementos BOX demonstraram serem capazes de distinguir geneticamente isolados de *Trichoderma* da restinga de Guaibim, BA. Esse resultado também foi observado por outros pesquisadores, o que corrobora eficácia que esses elementos possuem (MISHRA et al., 2015, REDONDO et al., 2009; ANDRADE et al., 2010; RAI et al., 2016; KASHYAP et al., 2015, 2016; ).

O gene inicialmente proposto para ser o *barcode* de *Trichoderma* foi o ITS1 e 2 por Druzhinina et al. (2005), porém, mais tarde esse marcador mostrou-se incapaz de elucidar as relações filogenéticas de espécies estreitamente relacionadas desse gênero. Jacklist et al. (2006<sup>a</sup>; 2006<sup>b</sup>; 2009, 2015) propôs que algumas regiões do gene *teF1* fossem utilizadas, uma vez que o mesmo possui regiões com variações que permitem tanto a diferenciação entre isolados, quanto para a utilização em análises filogenéticas. Devido a esse histórico, nesse estudo o *teF1* foi utilizado como DNA *barcode* para identificar os isolados do gênero *Trichoderma* a nível de espécie. (DRUZHININA et al., 2005;; QIN & ZHUANG, 2016; JANG et al., 2017; DU PLESSIS et al., 2018; ZHANG & ZHUANG, 2018; QIAO, 2018; LI et al., 2018; ZHU & ZHUANG, 2018). O gene RPB2, também é utilizado de forma na identificação molecular e filogenia de *Trichoderma*, mas seu poder discriminatório é inferior ao *teF1* (ZENG & ZHUANG, 2019; PARK et al., 2006).

Nesse estudo os isolados identificados molecularmente são relacionados com espécies dos Clados *Viride*, *Hypocreanum*, *Polysporum* e *Harzianum* e

predominantemente do clado *Spirale*. Na maioria dos estudos sobre diversidade de *Trichoderma* em amostras ambientais, espécies pertencentes ao clado *Viride* estão entre os isolados predominantes (JAKLITSCH & VOGLMAYR, 2015; HU et al., 2019; SUN et al., 2012; ZHANG et al., 2005; JIANG et al., 2016). O clado *Viride*, antes seção *Trichoderma*, é um dos maiores e mais diverso dentro de *Trichoderma*, levando o nome da espécie descrita por Persoon (1794). *T. viride*, passou por várias classificações e atualmente é reconhecido como um complexo de espécie que é subdividido em seis subclados (JAKLITSCH & VOGLMAYR, 2015). As espécies desse clado possuem uma distribuição cosmopolita e estão presente em diferentes habitats, elevando assim as chances de serem encontrados em diferentes estudos sobre biodiversidade fúngica. As espécies do clado *Hypocreanum* foram descritas por Bissett (1991) e revisadas por Overton et al. (2004, 2006), a maioria dessas espécies foram descritas inicialmente como telomorfos e inseridas no clado *Hypocreanum* e seus anamorfos no clado *Trichoderma*. As espécies do clado *Hypocreanum* possuem conídios de tamanhos e formas variáveis, com estromas pseudoparenquimatoso e conidióforos variando em acremonio, verticilium e trichoderma. Overton et al (2006) denominaram esse conidióforo como *Hypocreanum*. O clado *Hypocreanum* é intimamente relacionado com o clado *Trichoderma* e as relações taxonômicas das espécies desses clado ainda não está resolvida (Overton et al., 2004; Overton et al., 2006; Jaklitsch & Voglmayr, (2015).

O Clado *Spirale* inclui as espécies *T. longisporum*, *T. hunanense* e *T. spirale*. Tanto *T. longisporum* como *T. hunanense* foram isolados de solo e *T. spirale*, foi isolado de solo e é endofítica de *Theobroma cacao* (BISSETT, 1991; CHEN & ZHUANG, 2017). Os isolados identificados neste estudo são predominantemente relacionados com *T. spirale*. Estes isolados são provenientes da serapilheira da mata periodicamente inundada da Área de Proteção Ambiental de Guaibim, BA, logo, eles já poderiam estar presentes nos órgão vegetais senescentes como endofíticos das plantas ao invés de terem colonizado esses órgão após sua senescência. Dessa maneira a predominância de isolados relacionados com *T. spirale* neste estudo pode estar relacionada com a ecologia das espécies desse clado, demonstrando ser uma característica preservada dentro desse clado recém-descrito. Isolados relacionados com *T. spirale* também foram predominantes entre as espécies de *Trichoderma* associadas à raiz de pinheiro dentro de anéis de crescimento de *Tricholoma matsutake*, um fungo ectomicorrízico (OH et al., 2018). Estes resultados indicam que a diversificação dos substratos em que são feitos



estudos de diversidade fúngica pode contribuir para expandir o conhecimento sobre a diversidade de espécies do gênero *Trichoderma*.

## 7 CONCLUSÃO

O perfil genético obtido com o BOX-PCR dos isolados analisados indicam que eles representam 28 prováveis espécies diferentes do gênero *Trichoderma* e que 14 isolados representam espécies não descritas do clado *Spirale*, *Viride*, *Polysporum*, *Harzianum* e *Hypocreanum*, oriundo da restinga de Guaibim, BA.

## REFERENCIAIS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, Sakineh et al. Biocontrol activities of gamma induced mutants of *Trichoderma harzianum* against some soilborne fungal pathogens and their DNA fingerprinting. **Iranian journal of biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 260, 2016.

AMORIM, Raul Reis; DE OLIVEIRA, Regina Célia. Degradação ambiental e novas territorialidades no Extremo Sul da Bahia. **Caminhos de Geografia**, v. 8, n. 22, 2007.

ANDRADE, Jackeline Pereira. Comunidade de fungos filamentosos celulolíticos da restinga de Guaibim–Bahia e seu potencial biotecnológico. 2014.

AYRES, José Márcio et al. Os corredores ecológicos das florestas tropicais do Brasil. **Sociedade Civil Mamiarauá**, Belém, PA (Brasil), 2005.

BILUNG, Lesley Maurice et al. Evaluation of BOX-PCR and ERIC-PCR as Molecular Typing Tools for Pathogenic *Leptospira*. **Disease markers**, v. 2018, 2018.

BISSETT, John. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. **Canadian journal of botany**, v. 69, n. 11, p. 2373-2417, 1991.

CHAVERRI, Priscila et al. *Hypocrea/Trichoderma* (ascomycota, hypocreales, hypocreaceae): species with green ascospores. **Centraalbureau voor Schimmelcultures**, 2003.

CHEN, Kai; ZHUANG, Wen-Ying. Discovery from a large-scaled survey of *Trichoderma* in soil of China. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 9090, 2017.

CHEN, Qingsen et al. Establishment of ERIC-PCR DNA fingerprint on enterobacteriaceae in raw milk. **Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering**, v. 29, n. 11, p. 261-269, 2013.

CLAVERYS, Jean-Pierre; MABILAT, Claude. Genomic DNA fragment of *Streptococcus pneumoniae*, hybridization probe, amplification primer, reagent and method for the detection of *Streptococcus pneumoniae*. **U.S. Patent** n. 5,776,691, 7 jul. 1998.

DA SILVA, Ricardo Moreira; SARAIVA, Alan Gurgel. Análise de efetividade de gestão da floresta nacional da restinga de cabedelo. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 7, n. 2, p. 572-585, 2018.

DE SÁ, Cyl Farney Catarino. Regeneração de um trecho de floresta de restinga na Reserva Ecológica Estadual de Jacarepiá, Saquarema, Estado do Rio de Janeiro: II-Estrato arbustivo. **Rodriguésia**, v. 53, n. 82, p. 5-23, 2002.

DOYL, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

DRUZHININA, Irina 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.

DU PLESSIS, Ihan L. et al. The diversity of *Trichoderma* species from soil in South Africa, with five new additions. **Mycologia**, v. 110, n. 3, p. 559-583, 2018.

FELSE, P. Arthur; PANDA, T. Self-directing optimization of parameters for extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in batch mode. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 6-7, p. 563-566, 1999.

FRAGA, M. E. et al. Soil mycobiota in a dune area in the municipality of Restinga da Marambaia, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Floresta e Ambiente**, v. 17, n. 1, p. 30-36, 2010.

FREIRE, M.S.B. Levantamento florístico do Parque Estadual das Dunas do Natal. **Acta Botânica Brasileira**. v.4, n.2, p.41-59, 1990.

HEO, Young Mok et al. Investigation of Filamentous Fungi Producing Safe, Functional Water-Soluble Pigments. **Mycobiology**, v. 46, n. 3, p. 269-277, 2018.

HU, Jindong et al. Large - scale *Trichoderma* diversity was associated with ecosystem, climate and geographic location. **Environmental microbiology**, 2019.

HULTON, C. S. J.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other *enterobacteria*. **Molecular microbiology**, v. 5, n. 4, p. 825-834, 1991.

JAKLITSCH, W. M.; VOGLMAYR, H. Biodiversity of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) in Southern Europe and Macaronesia. **Studies in mycology**, v. 80, p. 1-87, 2015.

JAKLITSCH, Walter M. et al. *Hypocrea crystalligena* sp. nov., a common European species with a white-spored *Trichoderma* anamorph. **Mycologia**, v. 98, n. 3, p. 499-513, 2006.<sup>b</sup>

JAKLITSCH, Walter M. et al. *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.<sup>a</sup>

JAKLITSCH, Walter M. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. **Studies in mycology**, v. 63, p. 1-91, 2009.

JANG, Seokyeon et al. Five New Records of Soil-Derived *Trichoderma* in Korea: *T. albolutescens*, *T. asperelloides*, *T. orientale*, *T. spirale*, and *T. tomentosum*. **Mycobiology**, v. 45, n. 1, p. 1-8, 2017.

JIANG, Yuan et al. *Trichoderma* biodiversity of agricultural fields in east China reveals a gradient distribution of species. **PloS one**, v. 11, n. 8, p. e0160613, 2016.

KASHYAP, Prem Lal et al. Genetic diversity, mating types and phylogenetic analysis of Indian races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* from chickpea. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 49, n. 19-20, p. 533-553, 2016.

KASHYAP, Prem Lal et al. Mating type genes and genetic markers to decipher intraspecific variability among *Fusarium udum* isolates from pigeonpea. **Journal of basic microbiology**, v. 55, n. 7, p. 846-856, 2015.

KIM, W. K. et al. Isolation of high molecular weight DNA and double-stranded RNAs from fungi. **Canadian Journal of Botany**, v. 68, n. 9, p. 1898-1902, 1990.

KONAPPA, Narasimhamurthy et al. Evaluation of biological efficacy of *Trichoderma asperellum* against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, n. 1, p. 63, 2018.

LI, Jishun et al. *Trichoderma cyanodichotomus* sp. nov., a new soil-inhabiting species with a potential for biological control. **Canadian journal of microbiology**, v. 64, n. 12, p. 1020-1029, 2018.

LIU, Yajuan J.; WHELEN, Sally; HALL, Benjamin D. Phylogenetic relationships among *ascomycetes*: evidence from an RNA polymerase II subunit. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 12, p. 1799-1808, 1999.

MARTIN, Bernard et al. 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, Márcio Lacerda Lopes. 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, 2012.

MARTINS, Suzana Ehlin et al. Caracterização florística de comunidades vegetais de restinga em Bertiooga, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 1, p. 249-274, 2008.

MISHRA, Rupesh Kumar et al. BOX-PCR-and ERIC-PCR-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.

MISHRA, Rupesh Kumar et al. Genetic characterization of *Fusarium oxysporum* isolated from guava in northern India. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 33, p. 4228-4234, 2013.

MOKHTARI, Wafaa Mimoun et al. *Verticillium dahliae*-eggplant as the pathosystem model to reveal biocontrol potential of three *Trichoderma* spp in green house conditions. **Atlas Journal of Biology**, p. 417-421, 2018.

OH, Seung-Yoon et al. Diversity and effect of *Trichoderma* isolated from the roots of *Pinus densiflora* within the fairy ring of pine mushroom (*Tricholoma matsutake*). **PloS one**, v. 13, n. 11, p. e0205900, 2018.

OVERTON, Barrie E. **Systematics of *Hypocrea* with effused stromata and anamorphs in *Trichoderma* section *Hypocreanum***. 2004. Tese de Doutorado. The Pennsylvania State University.

OVERTON, Barrie E.; STEWART, Elwin L.; GEISER, David M. Taxonomy and phylogenetic relationships of nine species of *Hypocrea* with anamorphs assignable to *Trichoderma* section *Hypocreanum*. **Studies in Mycology**, v. 56, p. 39-65, 2006.

PARK, Myung Soo; BAE, Kyung Sook; YU, Seung Hun. Two new species of *Trichoderma* associated with green mold of oyster mushroom cultivation in Korea. **Mycobiology**, v. 34, n. 3, p. 111-113, 2006.

PEREIRA, Marcos Gervasio et al. Aporte e decomposição de serapilheira em floresta periodicamente inundável na restinga da Marambaia, RJ. **Ciência florestal**, v. 22, n. 1, p. 59-67, 2012.

PIRES, Luciana A. et al. Produção, acúmulo e decomposição da serapilheira em uma restinga da Ilha do Mel, Paranaguá, PR, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, p. 173-184, 2006.

QIAO, Min et al. Three new species of soil-inhabiting *Trichoderma* from southwest China. **MycoKeys**, n. 44, p. 63, 2018.

QIN, Wen-Tao; ZHUANG, Wen-Ying. Seven wood-inhabiting new species of the genus *Trichoderma* (*Fungi, Ascomycota*) in *Viride* clade. **Scientific reports**, v. 6, p. 27074, 2016.

RAI, Shalini et al. Identification, characterization and phylogenetic analysis of antifungal *Trichoderma* from tomato rhizosphere. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1939, 2016.

RIBERA, Javier et al. Integrated control of wood destroying *basidiomycetes* combining Cu-based wood preservatives and *Trichoderma* spp. **PloS one**, v. 12, n. 4, p. e0174335, 2017.

ROCHA, Carlos Frederico Duarte et al. Capítulo 13 répteis e sua conservação no estado do rio de janeiro. 2009.

STERN, M. J.; PROSSNITZ, E.; AMES, G. Ferro - Luzzi. 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.

SUN, Rui-yan et al. *Trichoderma* biodiversity in China. **Journal of applied genetics**, v. 53, n. 3, p. 343-354, 2012.

VAN BELKUM, Alex et al. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 3, p. 547-560, 2001.

VERSALOVIC, James et al. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains recovered in Houston: identification and molecular characterization of multiple clones. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, n. 4, p. 850-856, 1993.

WAGNER, Günter P. The power of negative [theoretical] results. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 49, p. 12851-12852, 2017.

WEISING, Kurt et al. DNA fingerprinting in plants and fungi. **CRC press**, 1994.

WONG, Hin-Chung; LIN, Chih-Hsueh. Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4233-4240, 2001.

YOKE-KQUEEN, C. et al. Molecular characterisation of *Vibrio parahaemolyticus* carrying tdh and trh genes using ERIC-, RAPD-and BOX-PCR on local Malaysia bloody clam and Lala. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 6, p. 3299, 2013.

ZENG, Zhao Qing; ZHUANG, Wen Ying. 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.

ZHANG, Chu-long et al. *Trichoderma* biodiversity in China: evidence for a North to South distribution of species in East Asia. **FEMS microbiology letters**, v. 251, n. 2, p. 251-257, 2005.

ZHANG, Yu-Bo; ZHUANG, Wen-Ying. New species of *Trichoderma* in the *Harzianum*, *Longibrachiatum* and *Viride* clades. **Phytotaxa**, v. 379, n. 2, p. 131-142, 2018.

ZHU, Peixuan et al. Fit genotypes and escape variants of subgroup III *Neisseria meningitidis* during three pandemics of epidemic meningitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 9, p. 5234-5239, 2001.

ZHU, Zhao-Xiang; ZHUANG, Wen-Ying; LI, Yu. A new species of the *Longibrachiatum* Clade of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) from Northeast China. **Nova Hedwigia**, v. 106, n. 3-4, p. 441-453, 2018.

ZICKEL, Carmem Silvia et al. Flora e vegetação das restingas no Nordeste Brasileiro. **Oceanografia: um cenário tropical. Recife, Bargaço**, p. 689-701, 2004.

Capítulo 2: Prospectando a diversidade escondida de espécies nas bases de dados do NCBI: Clado *Spirale* como estudo de caso.



**SALES, Lucas Souza, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia de 2019. Prospectando a diversidade escondida de espécies de *Trichoderma* nas bases de dados do NCBI: Clado *Spirale* como estudo de caso.** Orientador: Phellippe Arthur Santos Marbach. Co-Orientadora: Jackeline Pereira Andrade.

## RESUMO

*T. spirale* foi descrita por Bisset em 1991 e foi considerada uma espécie de linhagem solitária até 2017, quando as espécies relacionadas *T. hunanense* e *T. longisporum* foram descritas e criado o clado *Spirale*. No entanto, existem dezenas de sequências utilizadas na identificação molecular de *Trichoderma*, como RPB2 e *teF1*, depositadas no banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) identificado como pertencente ao *T. spirale*. Essas sequências foram obtidas a partir de isolados obtidos em 3 continentes diferentes, sugerindo que *T. spirale* tem uma distribuição mundial. Este estudo foi realizado para verificar se *T. spirale* tem uma grande diversidade ou se essas sequências de nucleotídeos representam novas espécies dentro do clado *Spirale*. Um alinhamento múltiplo foi feito com todas as sequências *teF1* de *Trichoderma* depositadas nas bases de dados NCBI mais o *teF1* das cepas *Trichoderma* TR01MTS<sup>p21</sup>, TR06MTS<sup>p22</sup> e TR13MTS<sup>p25</sup> isoladas da Restinga de Guaibim, BA, Brasil. Todas as linhagens identificadas como espécies do clado *Spirale* e as linhagens TR01MTS<sup>p21</sup>, TR06MTS<sup>p22</sup> e TR13MTS<sup>p25</sup> caíram em um clado na árvore Máxima Verossimilhança, obtida pelo alinhamento múltiplo de *teF1*. A identidade *teF1* das sessenta e três cepas identificadas como *T. spirale* variou de 93,63 a 100,00% quando comparada com o *teF1* do tipo de *T. spirale*. A identidade *teF1* das cepas TR01MTS<sup>p21</sup>, TR06MTS<sup>p22</sup> e TR13MTS<sup>p25</sup> com o *teF1* do tipo de *T. spirale*, 96.89, 97.11 e 97.66%, respectivamente, e eles são morfologicamente distintos de *T. spirale*, possuindo conidióforos do tipo verticillium e trichoderma com conídios ovoides, elipsoidais e as vezes apiculados, diferente de *T. spirale*, que possui conidióforo do tipo pachybasium e conídios elipsoidais, além das diferenças morfológicas os isolados descritos nesse estudo difere fisiologicamente de *T. spirale* em sua amplitude de crescimento e taxa de crescimento. Além disso, é descrito a presença de variações morfológicas intra-espécifica dentro dos isolados analisados. Dessa forma, análise da árvore filogenética de *teF1* usando esses valores de identidade indica que o *teF1* das sequências de *T. spirale* depositadas no banco de dados NCBI representam pelo menos nove novas espécies não descritas pertencentes ao clado *Spirale*.

Palavras – chave: *Trichoderma spirale*, filogenia, *tef1*

**SALES**, Lucas Souza, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia de 2019. **Prospecting hidden species diversity of *Trichoderma* in NCBI databases: Clado *Spirale* as a case study** Orientador: Phellippe Arthur Santos Marbach. Co-Orientadora: Jackeline Pereira Andrade.

#### ABSTRACT

The *T. spirale* type was described by Bisset in 1991 and was considered unique in its clade until 2017, when the related species *T. hunanense* and *T. longisporum* were described and created the *Spirale* clade was created. However, there are dozens of sequences used in molecular identification of *Trichoderma*, such as RPB2 and *teF1*, deposited in the database of the National Biotechnological Information Center (NCBI) identified as belonging to *T. spirale*. These sequences were obtained from isolates obtained in three different continents, suggesting that *T. spirale* has a worldwide distribution. This study was performed to verify if *T. spirale* is indeed diverse or if these nucleotide sequences represent new species within the *Spirale* clade. A multiple alignment was constructed with all *teF1* sequences of *Trichoderma* deposited in the NCBI databases plus the *teF1* of the *Trichoderma* strains TR01MTS<sup>p21</sup>, TR06MTS<sup>p22</sup> and TR13MTS<sup>p25</sup> isolated from litter of the Restinga of Guaibim, BA, Brazil. All strains identified as species from the Clade *Spirale* and the strains TR01MTS<sup>p21</sup>, TR06MTS<sup>p22</sup> and TR13MTS<sup>p25</sup> fell into a clade in the Maximum Likelihood tree obtained using the multiple alignment of *teF1*. The *teF1* identity of the sixty-three strains identified as *T. spirale* ranged from 93.63 to 100.00% when compared to *T. spirale* type *teF1*. The *teF1* identity of the TR01MTS<sup>p21</sup>, TR06MTS<sup>p22</sup> and TR13MTS<sup>p25</sup> strains with the *T. spirale* type *teF1* strains, 96.89, 97.11 and 97.66%, respectively, and they are morphologically distinct from *T. spirale*, having verticillium and trichoderma conidiophores with ellipsoid conídio, and sometimes apiculate, unlike *T. spirale*, which has pachybasium conidiophore and ellipsoidal conídio, besides the morphological differences the isolates described in this study differ physiologically from *T. spirale* in their amplitude of growth and growth rate. Furthermore, it is described the presence of intraspecific morphological variations within the isolates analyzed. Thus, analysis of the *teF1* phylogenetic tree using these identity values indicates that the *teF1* of *T. spirale* sequences deposited in the NCBI database represent at least nine new undescribed species of the *Spirale* clade.

Key words: *Trichoderma spirale*, phylogeny, *teF1*

## 1 INTRODUÇÃO

*Trichoderma spirale* foi descrito por Bissett em 1991 em uma revisão da seção *Pachybasium*. O tipo da espécie foi isolado do solo da Tailândia e a característica morfológica mais marcante dessa espécie é seu principal eixo de conidióforos em espiral com seu alongamento apical estéril sem ramos férteis perto do ápice. Devido a essa característica Bissett cunhou o epíteto dessa espécie de *spirale*. Mais tarde Chaverri et al. (2003) redescreveram essa espécie analisando além da sua morfologia, sua filogenética e fisiológica. Jang et al. (2017) faz o primeiro registro dessa espécie na Coreia do Sul.

Desde então, trabalhos sobre a taxonomia e filogenia desse gênero revelaram que *T. spirale* não possuía relação evolutiva próxima com nenhuma outra espécie de *Trichoderma* até recentemente, quando Chen & Zhuang, (2017) descreveram duas espécies, *T. hunanense* e *T. longisporum*, filogeneticamente relacionada com *T. spirale* e denominaram o grupo filogenético formado por elas de clado *Spirale*. As espécies desse clado foram isoladas do solo inclusive *T. spirale*, que mais tarde também foi encontrado como endofítico de *Theobroma cacao* (BAILEY et al., 2008). O clado *Spirale* não é filogeneticamente relacionado com outros clados na filogenia do gênero *Trichoderma*. Esse clado é basal na filogenia molecular combinada com RPB2 e *teF1* dos *Trichodermas* verdes indicando que esse táxon é uma linhagem primitiva dentro deste grupo de espécies de *Trichoderma* (CHEN & ZHUANG, 2017). As características compartilhadas pelas espécies desse clado e que as distinguem das demais espécies de *Trichoderma* verdes são a presença de pústulas com prolongações de hifas e conidióforos sinuosas estéreis, simples ou poucas vezes ramificadas, presença de conídios elipsoidais e produção de pigmento amarelo no meio de cultura (CHEN & ZHUANG, 2017).

Apesar do clado *Spirale* de ser um dos menores grupos taxonômicos do gênero *Trichoderma* existem centenas de sequências de nucleotídeos de RPB2 e *teF1* depositadas na base de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) de isolados identificados *T. spirale*. Estes isolados são oriundos de diferentes regiões da Europa, Ásia, América do Sul e Central e do Norte o que remete a duas hipóteses ou *T. spirale* possui uma distribuição mundial e grande diversidade genética ou estas sequências de nucleotídeos são oriundas de espécies erroneamente identificadas como *T.*

*spirale* e representam novas espécies dentro do clado *Spirale*. Dessa forma, este estudo teve como objetivo investigar as relações evolutivas de isolados identificados como *T. spirale* por meio de análises filogenéticas de seus genes depositados nas bases de dados do NCBI.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Recuperação de sequências de *T. spirale*

Todas as sequências de nucleotídeos do gene *teF1* depositadas e identificadas como *T. humanense*, *T. longisporum* e *T. spirale* foram recuperadas do NCBI. Em seguida foram recuperadas todas as sequências de nucleotídeos do *teF1* de todos os isolados do gênero *Trichoderma* para utilização em uma filogenia prévia. Posteriormente foram recuperadas todas as sequências remanescentes relacionadas ao clado *Spirale*. Por fim foram recuperadas as sequências do gene *RPB2* disponíveis dos isolados que possuíam *teF1* que são relacionados ao clado *Spirale*.

### 2.2 Análises filogenéticas

As sequências parciais de nucleotídeos dos genes *teF1* e *RPB2* foram alinhadas no MAFFT, incluindo as sequências do *teF1* de *Trichoderma* sp. TR6MTS<sup>p22</sup>, *Trichoderma* sp. TR13MTS<sup>p25</sup> e *Trichoderma* sp. TR01MTS<sup>p21</sup> isolados da serrapilheira da Restinga da Área de Proteção Ambiental de Guaibim, BA.

Os alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos dos genes *teF1* e *RPB2* recuperadas do NCBI, incluindo as obtidas neste trabalho, foram feitos no programa MAFFT (KATO et al., 2009) A edição dos alinhamentos múltiplos, e as análises filogenéticas foram realizadas no programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013) utilizando o método de Máxima Verossimilhança, com 1000 *bootstraps*.

### 2.3 Caracterização Morfológica

As análises morfológicas foram realizadas com três repetições no tempo e em duplicata para cada isolado, utilizando os meios Corn Meal Agar Destrose (CMD) e Sintético Nutriente-Ágar (SNA), à 20 °C por 14 dias, utilizando placa de plástico com 20 ml de meios de cultura. A inoculação foi realizada utilizando suspensão de esporo de

1 ml de ágar-água e utilizado 3 µl dessa suspensão para inoculação. Nesse período foi analisada, a cor da colônia, formação do micélio aéreo, tipo de crescimento, início da conidiação, início da produção de pústulas, exsudato e pigmentos solúveis. Assim como sua taxa de crescimento após 72 hs. As características microscópicas dos isolados fúngicos foram analisadas em microcultivos em placas de Petri, as lâminas foram preparadas entre 7 e 10 dias com ácido láctico e visualizadas utilizando o microscópio óptico. Foi medido o comprimento e largura do ponto mais largo das fiálides, largura da base da fialide, comprimento e largura da célula que origina as fiálides, comprimento e largura dos conídios, comprimento e largura do clamidósporo e comprimento e largura das pústulas. Foi observado a conformação do conidióforo. A foto documentação das estruturas microscópicas foram feitas com o microscópio Zeiss Imager. A2 AXIO e Leica. A foto documentação das colônias foi registrada com câmera Canon T6i.

#### 2.4 - Taxa de Crescimento

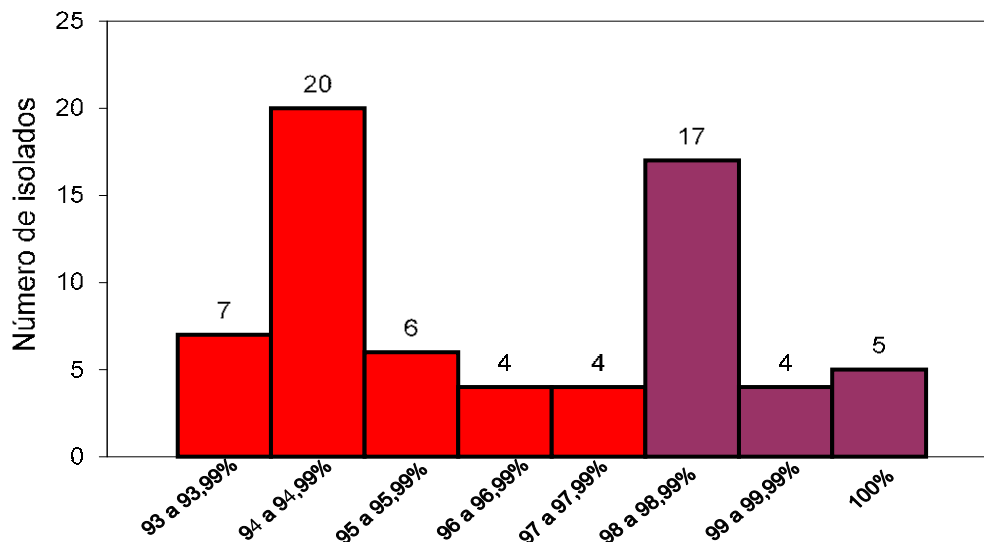
A taxa de crescimento e as temperaturas foram determinadas segundo Samuels et al., (2002) e Chaverri (2003). Os isolados de *Trichoderma* foram inoculados nos meios de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e SNA (NIRENBERG, 1976) e cultivados nas temperaturas 15, 20, 25, 30 e 35°C por 72hs com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Este experimento foi repetido duas vezes.

### 3- RESULTADOS

#### 3.1 Análises Filogenéticas

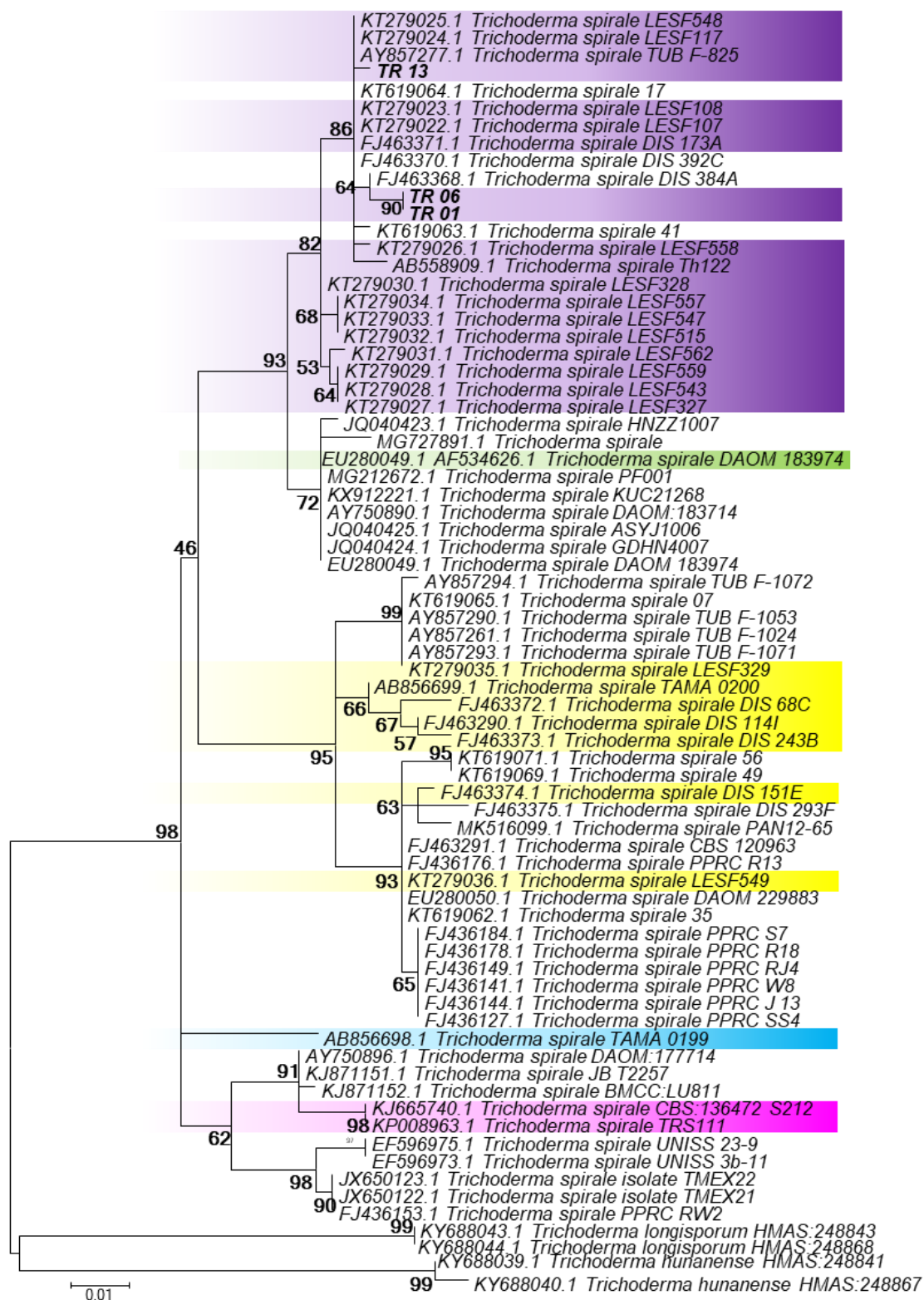
Foram recuperados 74 sequências de *teF1* de isolados relacionados com as espécies do clado *Spirale*, destes, 29 isolados também tinham disponíveis sequências de nucleotídeos do RPB2, que também foram recuperadas e usadas nas análises filogenéticas. A identidade dos *teF1* de *T. spirale* recuperadas do NCBI com o *teF1* do tipo de *T. spirale* variou de 93,51 a 99,41 %, (Figura 1) . Contudo, a maioria deles estão distribuídos em clados na árvore filogenética do *teF1* não relacionados com o clado que contém o *teF1* do tipo de *T. spirale* (DAOM:183974) e possuem valores de *bootstrap* acima de 90, o que indica um alto suporte estatístico (Figura 2). *Trichoderma* sp.

TR6MTS<sup>p21</sup> e *Trichoderma* sp. TR13MTS<sup>p25</sup> possuem, respectivamente, 97,49 e 97,95 % de identidade com o *teF1* do Tipo de *T. spirale* e estão em um clado distinto do clado que contém o tipo dessa espécie (Figura 2).

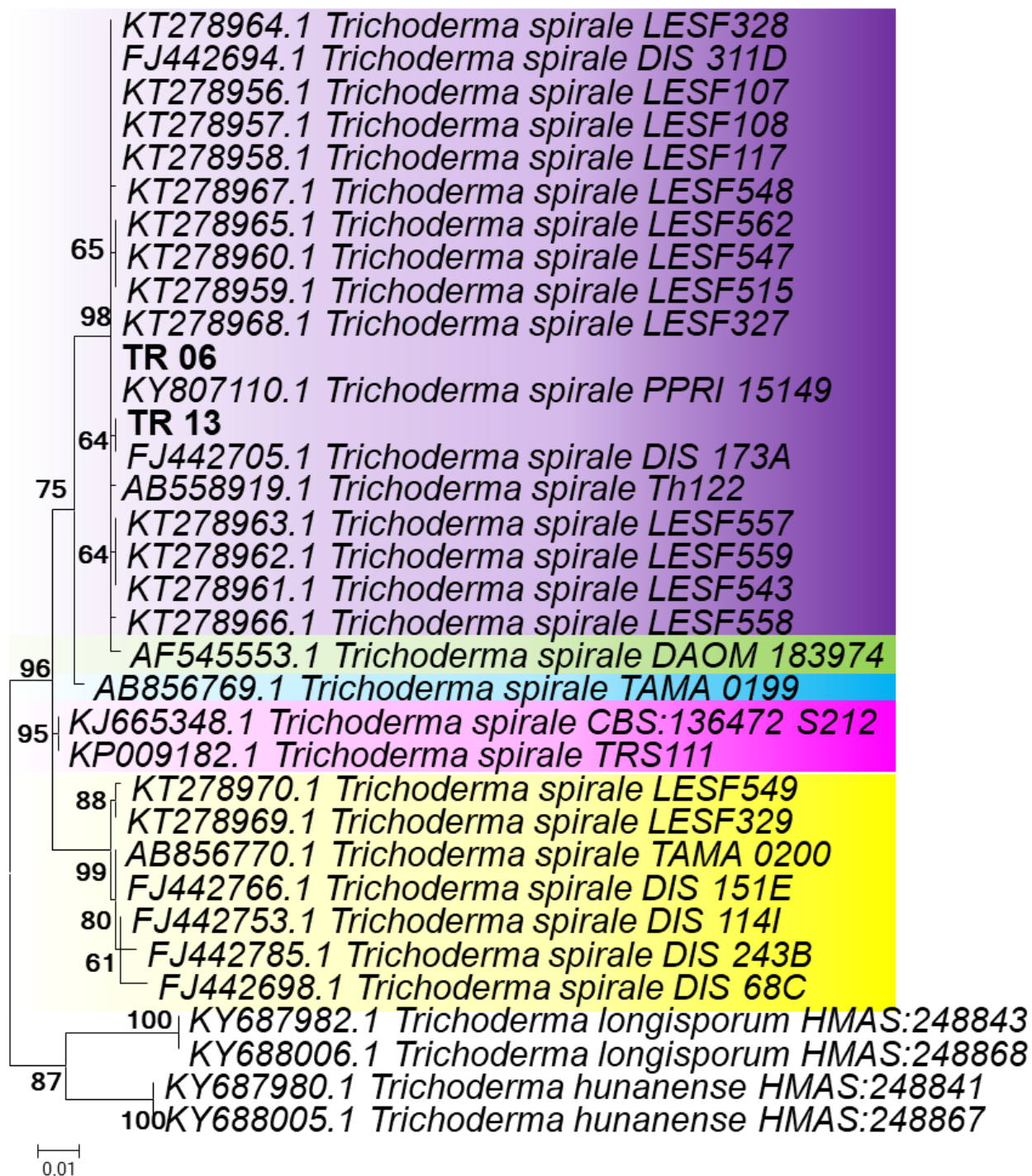


**Figura 1:** Mais de 50% das sequências *teF1* dos isolados identificados como *T. spirale* depositados no banco de dados NCBI possuem identidades inferiores a 97% (vermelho) quando comparadas com *teF1* do isolado tipo *T. spirale* indicando que esses isolados foram identificadas incorretamente.

A identidade dos RPB2 de *T. spirale* recuperadas do NCBI com o RPB2 do tipo de *T. spirale* variou de 96,99 a 99,78 % indicando que este gene é mais conservado do que *teF1*. A maioria dos clados presentes na árvore filogenética do *teF1* também estão presentes na árvore filogenética do RPB (Figura 3) bem como na árvore filogenética obtida com o alinhamento múltiplo concatenado do *teF1* e do RPB2 (Figura 4). O RPB2 de *Trichoderma* sp. TR6MTS<sup>p21</sup> e *Trichoderma* sp. TR13MTS<sup>p25</sup> possuem 99,78 a 99,66 % de identidade com o RPB2 do Tipo de *T. spirale* e estão no mesmo clado na árvore filogenética do RPB2 (Figura 3).

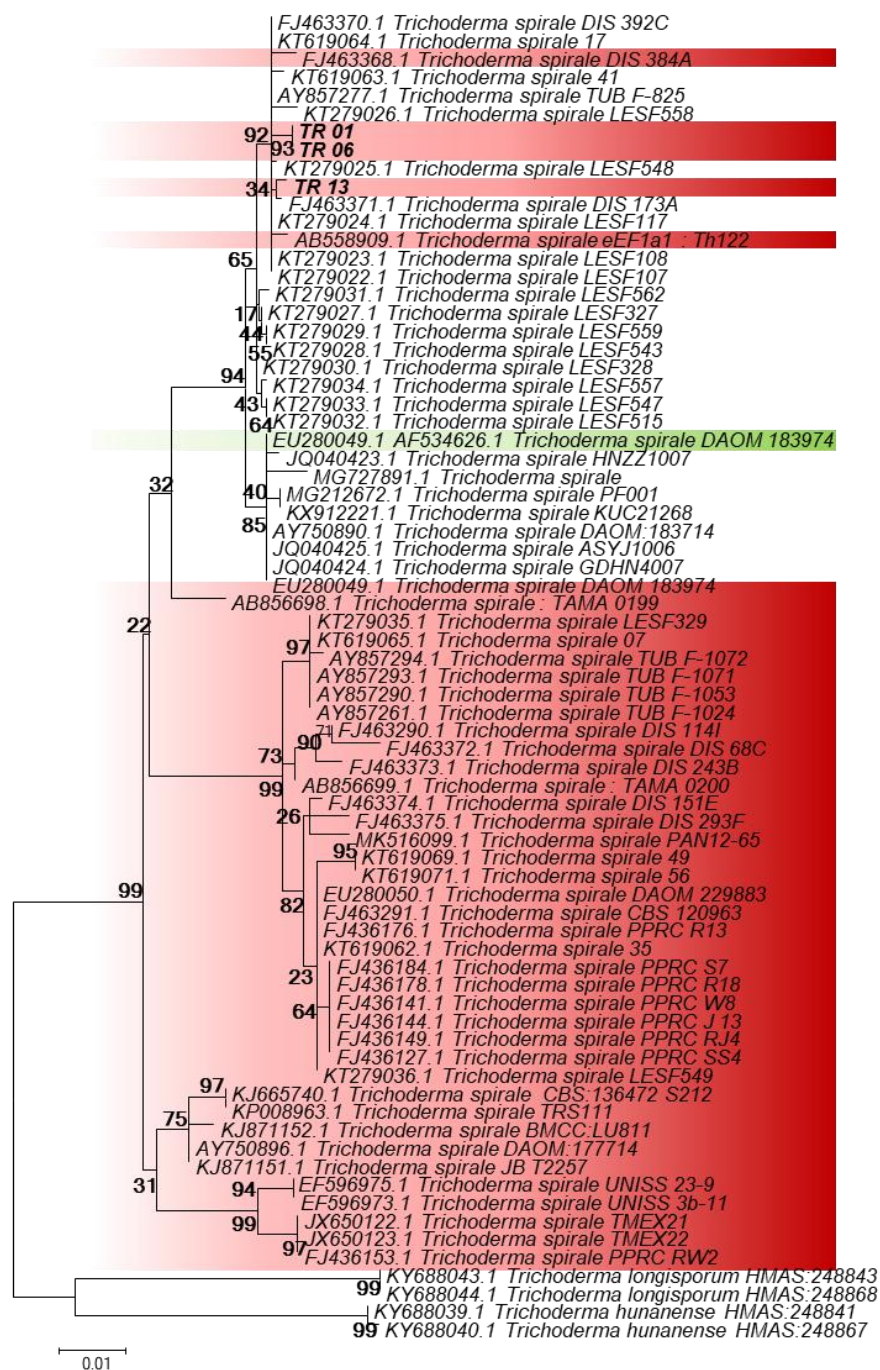


**Figura 2:** Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida do alinhamento das sequências dos genes *teF1*, demonstrando em vermelho e amarelo a mesma topologia apresentada na árvore do gene RPB2. Em verde o Tipo de *T. spirale*.

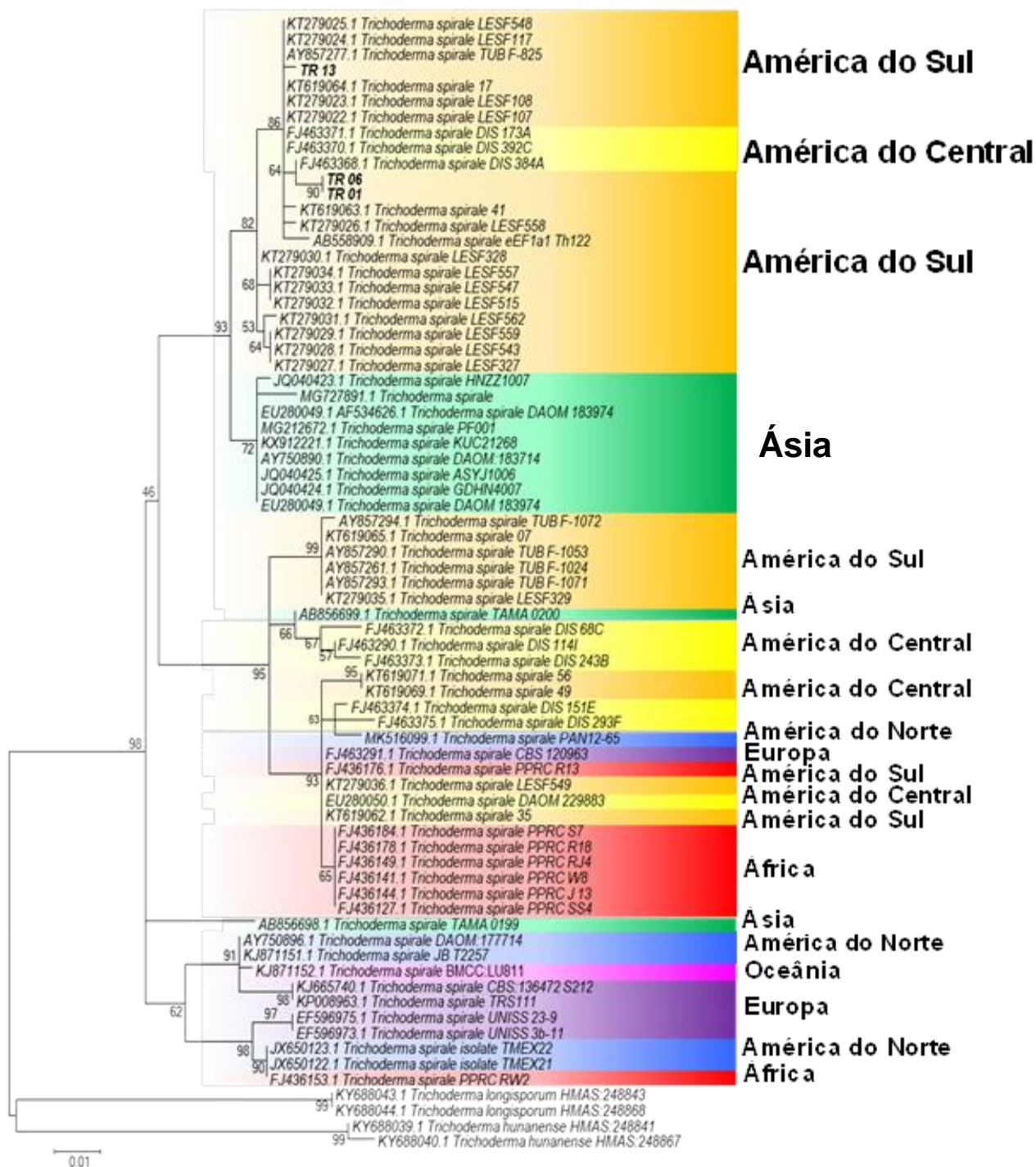


**Figura 3:** Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida do alinhamento das sequências dos genes RPB2 construída usando o programa MEGA 6. Os clados também encontrados na árvore obtida com *teF1* são destacados em rosa, azul, lilás e amarelo. O tipo de *Trichoderma spirale* está destacado em verde.





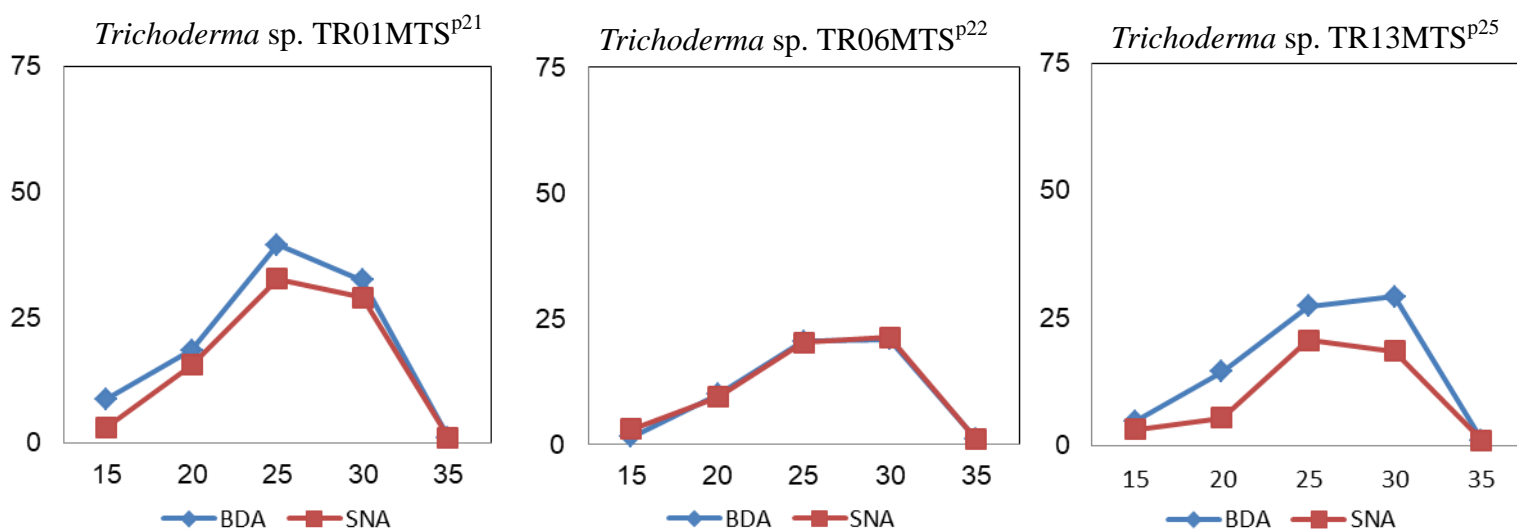
**Figura 4:** Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida do alinhamento das sequências dos genes *teF1* e *RPB2* construída no programa MEGA 6. Isolados com *teF1* possuindo identidades inferiores a 98% quando comparadas com *teF1* de *T. spirale*<sup>T</sup> são destacadas em vermelho. Esse ponto de corte é a identidade do *teF1* das cepas de *Trichoderma* TR6MTS<sup>p21</sup>, TR13MTS<sup>p25</sup> e TR01MTS<sup>p21</sup> com a *teF1* da cepa do tipo *T. spirale*<sup>T</sup>



**Figura 5:** Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida usando o alinhamento múltiplo do *teF1* de isolados de *Trichoderma* filogeneticamente relacionado com as espécies do Clado *Spirale*. A topologia da árvore é em grande parte congruente com a distribuição geográfica dos diferentes isolados.

### 3.2 Taxa de Crescimento

A temperatura na qual os isolados tiveram um maior crescimento foi 25–30 °C e o menor 15–35 °C. Os isolados *Trichoderma* sp. TR01MTS<sup>p21</sup> e *Trichoderma* sp. TR13MTS<sup>p25</sup> tiveram um crescimento maior em BDA do que em SNA, diferente do isolado *Trichoderma* sp. TR06MTS<sup>p22</sup> que o crescimento em ambos os meios não diferiu. O isolado *Trichoderma* sp. TR01MTS<sup>p21</sup> apresentou uma taxa de crescimento superior ao dos outros isolados e *Trichoderma* sp. TR06MTS<sup>p22</sup> a menor entre eles (Figura 6, Tabela 1).



**Figura 6:** Crescimento radial de *Trichoderma* sp. TR01MTS<sup>p21</sup>, TR06MTS<sup>p22</sup> e TR13MTS<sup>p25</sup> após 72 h (mm) em BDA e SNA.

**Tabela 1** – Amplitude radial do crescimento dos isolados *Trichoderma* sp. TR01MTS<sup>p21</sup>, TR06MTS<sup>p22</sup> e TR13MTS<sup>p25</sup> após 72 h (mm) em BDA e SNA.

Isolados	<i>Trichoderma</i> sp. TR01MTS <sup>p21</sup>		<i>Trichoderma</i> sp. TR06MTS <sup>p22</sup>		<i>Trichoderma</i> sp. TR13MTS <sup>p25</sup>		
	SNA	BDA	SNA	BDA	SNA	DBA	
Meios de Cultura	15 °C	3	6-11	1-4	0-3	2-5	3-7
	20 °C	12-20	14-23	9-10	8-12	4-7	9-20
	25 °C	26-39	39-40	20-21	18-22	15-26	21-34
	30 °C	19-39	27-38	22-20	21	13-25	25-33
	35 °C	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1

### 3.3 Descrições de novas Espécies

***Trichoderma* sp. nov. TR01MTS<sup>p21</sup>** SALES, L.S. ; SANTANA NETO, D.; ANDRADE, J. P.; SOUZA, J. T.; MARBACH, P. A. S.

*Tipificação:* Brasil, Bahia, Valença, Guaibim, serapilheira.

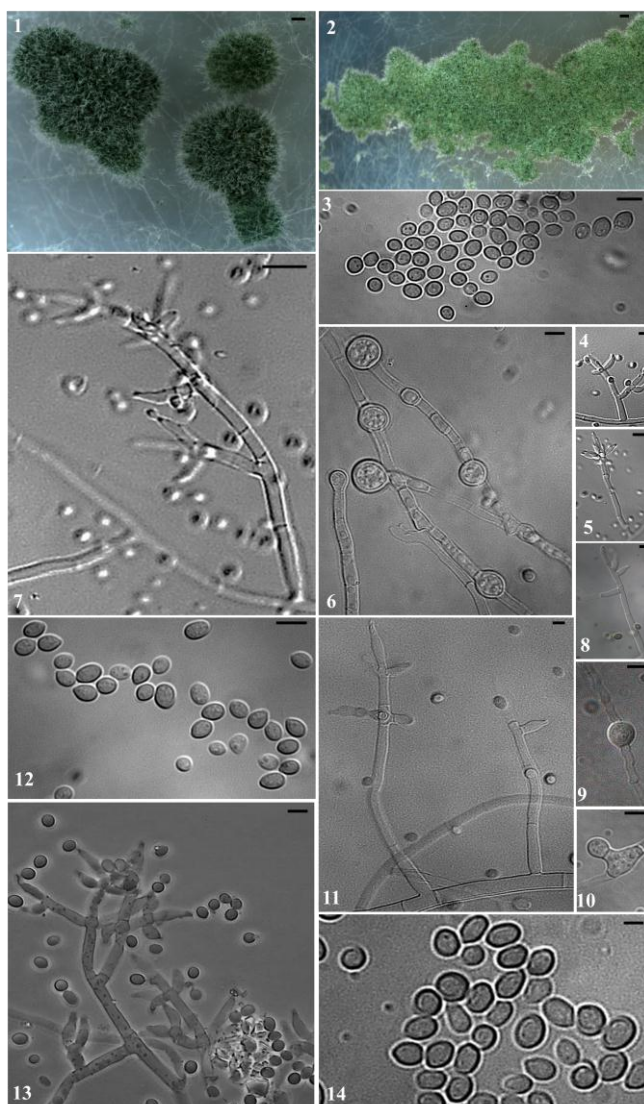
*Etimologia:* Em homenagem a Iemanjá, uma entidade religiosa oriunda do sincretismo religioso entre o catolicismo e religiões de matriz africana.

Em CMD depois de 72h, colônia com crescimento de 22—25 mm de diâmetro, micélio preenchendo a placa em 6 dias à 20 °C, colônia inicialmente hialina, se tornando branca após 6 dias e verde claro após 8 dias, crescimento radial formando anéis concêntricos discretos. Conidiação iniciada a partir de 7 dias nas hifas aéreas, formando pústulas pulvinatas, solitárias ou agregadas na parte superior e laterais da placa a partir de 6 dias, inicialmente brancas, se tornando verdes escuras após 10 dias, 0.3--1.3 x 0.3-1.3 mm (n=45), com projeções sinuosas longas e curtas em toda estrutura, raramente ramificadas. Pigmento amarelado ao redor do inóculo. Inodoro.

Conidióforo do tipo verticillium com ramificações primárias com 1-2 células, ramificações secundárias quando presente contendo 1–2 células. Conidióforo tipo trichoderma, ramificações primárias com 1–2 células, ramificações secundárias contendo 1 -2 células, conidióforo às vezes solitário curto ou comprido. Fiálides ampuliformes, langeniformes, solitárias ou emparelhadas, 4-13(-17) x 2-5 µm, 1.7-3.4(-3.7) C/L, largura da base da fiálide 1—3 µm (n=60). Conídios verdes, lisos, (sub)globosos, elipsoidais, ovoides e raramente apícolas 3-6 x 2-4 µm, 1.3-2.0 C/L (n=60). Clamídosporos abundantes, terminais e intercalares, raramente laterais, globosos a subglobosos 4-11(-13) x 5-12 µm, (0.8-)1-1.3 C/L (n=45).

Em SNA depois de 72h, colônia com crescimento 12 – 20 mm diâmetro, micélio cobrindo a placa em 7 dias à 20 °C, colônia inicialmente hialina e branca, se tornando esverdeada após 6 dias, crescimento radial formando anéis concêntricos. Conidiação iniciada após 6 dias, nas hifas aéreas, formado pústulas pulvinatas e globosas em 8 dias, (0.3-) 0.5 – 0.8 (-1.1) x (0.2-) 0.4 – 0.6 mm (n=45) em 10 dias, solitárias ou agregadas na parte superior e laterais da placa, inicialmente branca, se tornado verde escura em 12 dias, com projeções sinuosas longas e curtas em toda estrutura, raramente ramificado. Nenhum pigmento notado. Nenhum odor notado. Conidióforo do tipo verticillium contendo ramificações primárias com 1-3 células, curtos com raras ramificações

secundárias contendo 1-2 células. Conidióforo do tipo trichoderma contendo ramificações primária com 1-3 células, ramificações secundárias contendo 1-2 células. Presença de conidióforos solitários longos ou curtos. Fiálides ampuliformes, langeniformes, solitárias ou emparelhadas, (4-) 5 - 11 (-15) x 2 - 4  $\mu\text{m}$ , 2,0 - 3,3 (-3,8) C/L, largura da base da fiálide 1 - 3  $\mu\text{m}$  (n=60). Conídios verdes, lisos, (sub)globosos, elipsóides e ovóides 3 - 4 (-6) x 2 - 3  $\mu\text{m}$ , 1 - 2 C/L (n=60). Clamídosporo abundante, terminal e intercalar, raramente lateral, (sub)globoso 4-9 x 3 - 5(-9)  $\mu\text{m}$ , (0,9) 1,2 x 1,3 (1,7) C/L (n=45)

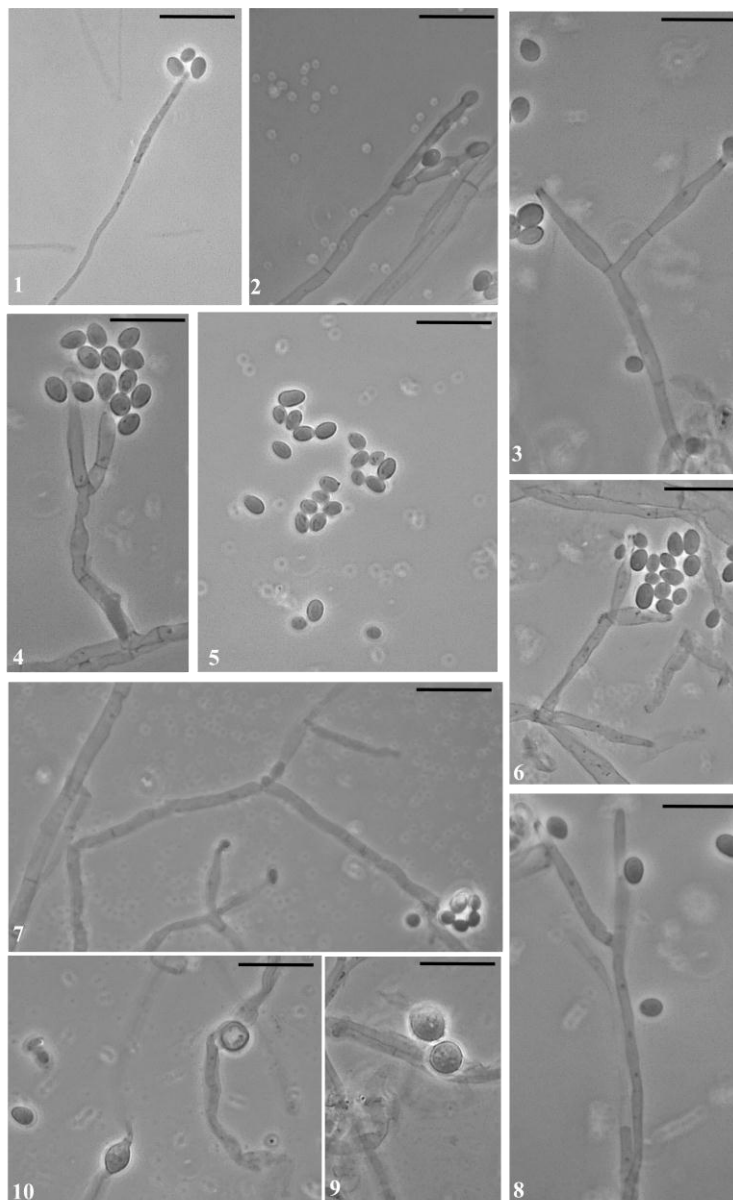


**Figura 7.** *Trichoderma* sp. nov. TR01MTS<sup>p21</sup> –(1, 3, 4, 5, 6, 7, 13, 14) em CMD 20 °C; (2, 8, 9, 11, 12) em SNA 20 °C. (1) Pústulas em CMD 14 d; (2) Pústulas em SNA 14 d; (3, 14) Conídios em CMD; (4, 5,) Conidióforo tipo verticilium e (7, 13) trichoderma, fiálides ampuliformes e langeniforme em CMD; (6) Clamídósporos em CMD; (8, 11)

Conidióforo tipo verticilium e fiálides ampuliformes e langeniformes em SNA; **(12)** Conídios em SNA; **(9, 10)** Clamidósporo em SNA.

O *teF1* e o RPB2 de *Trichoderma* sp. nov. TR01MTS<sup>p21</sup> e *Trichoderma* sp. TR06MTS<sup>p22</sup> são idênticos, contudo esses isolados possuem diferenças morfológicas marcantes. As características morfológicas de *Trichoderma* sp. TR06MTS<sup>p22</sup> serão apresentadas a seguir. Em SNA depois de 72h, colônia com crescimento de 9—10 mm, micélio não preenche a placa em 14 dias em 20 °C, colônia inicialmente branca e muito densa, com crescimento radial formando anéis concêntricos discretos. Conidiação iniciada a partir de 7 dias presente em hifas aéreas, sem formação de pústulas. Pigmento amarelado notado. Exsudato transparente notado ao redor do inóculo Nenhum odor notado. Conidióforo do tipo verticilium com poucas ramificações, quando presente contendo 2 células, raras ramificações secundárias, quando presente, contendo 1-2 células. Conidióforo do tipo trichoderma com ramificações primárias com 1-2 células, ramificações secundárias, contendo 1-2 células, muitos conidióforos solitários longos ou curtos. Fiálide ampuliforme, langeniforme, solitária ou emparelhada, (-5) 8 - 15 (-21) x 1 - 4 µm, 3,5 - 6 (-6,7) C/L, largura da base da fiálide 1 - 3 µm (n=60). Conídios verdes, lisos, (sub)globosos, elipsoides e ovoides 3-6 x 2-3 µm, 1--2 C/L (n=60). Clamidósporo abundante, terminal e intercalar, raramente lateral, (sub)globoso 4-7(-9) x 4-8 µm, 1 - 1,3 C/L (n=45).

Em CMD depois de 72h, colônias com crescimento de 12—13 mm, micélio preenchendo a placa em 8 dias em 20 °C, inicialmente hialina se tornando branca, micélio difuso com crescimento radial. Sem conidiação iniciada aparente, sem formação de pústulas. Pigmento amarelado notado. Nenhum odor notado.



**Figura 7.** *Trichoderma* sp. nov. TR06MTS<sup>p22</sup>. - (1-10) em SNA 20 °C. (5) Conídios; (2, 4, 6, 8) Conidióforo tipo verticilium; (7, 8) Conidióforo tipo trichoderma; (2, 3, 4) Fiálides langeniforme; (1) Fiálides solitárias; (9, 10) Clamidóspero. .

Nota: *Trichoderma* sp. nov, TR01MTS<sup>p21</sup> e TR06MTS<sup>p22</sup>, difere de *Trichoderma spirale* morfo/fisiologicamente. O tamanho da colônia de *T.spirale* é maior que de *Trichoderma* sp. nov, TR01MTS<sup>p21</sup> e TR06MTS<sup>p22</sup> em todas as temperaturas (Tabela 2). Os conidióforos de *T. spirale* são do tipo pachybasium enquanto *Trichoderma* sp. nov,

TR01MTS<sup>p21</sup> e TR06MTS<sup>p22</sup>. possui conidióforos do tipo verticillium e trichoderma e maior variação de conídios. *Trichoderma* TR06MTS<sup>p22</sup> não produziu pústulas em nenhum meio analisado e sua conidiação foi observada apenas em meio SNA onde ocorre a produção de exsudato transparente. Essas características são ausente no tipo de *T. spirale*. As fiálides do tipo de *T. spirale* (3.2-)4.5-6.5(-8.2) x (2.7-)3.0-3.7(-4.5)  $\mu\text{m}$  analisadas por Chaverri et al. (2003) e por Jang et al. (2017) (3.7-)4-6.4(-7.4) x 2.6-3.5(-4.3)  $\mu\text{m}$  são menores que de *Trichoderma* sp. nov, TR01MTS<sup>p21</sup> e TR06MTS<sup>p22</sup> 4-13(-17) x 2-5  $\mu\text{m}$ .

***Trichoderma* sp. nov. TR13MTS<sup>p25</sup>** SALES, L.S. ; SANTANA NETO, D.; ANDRADE, J. P.; SOUZA, J. T.; MARBACH, P. A. S.

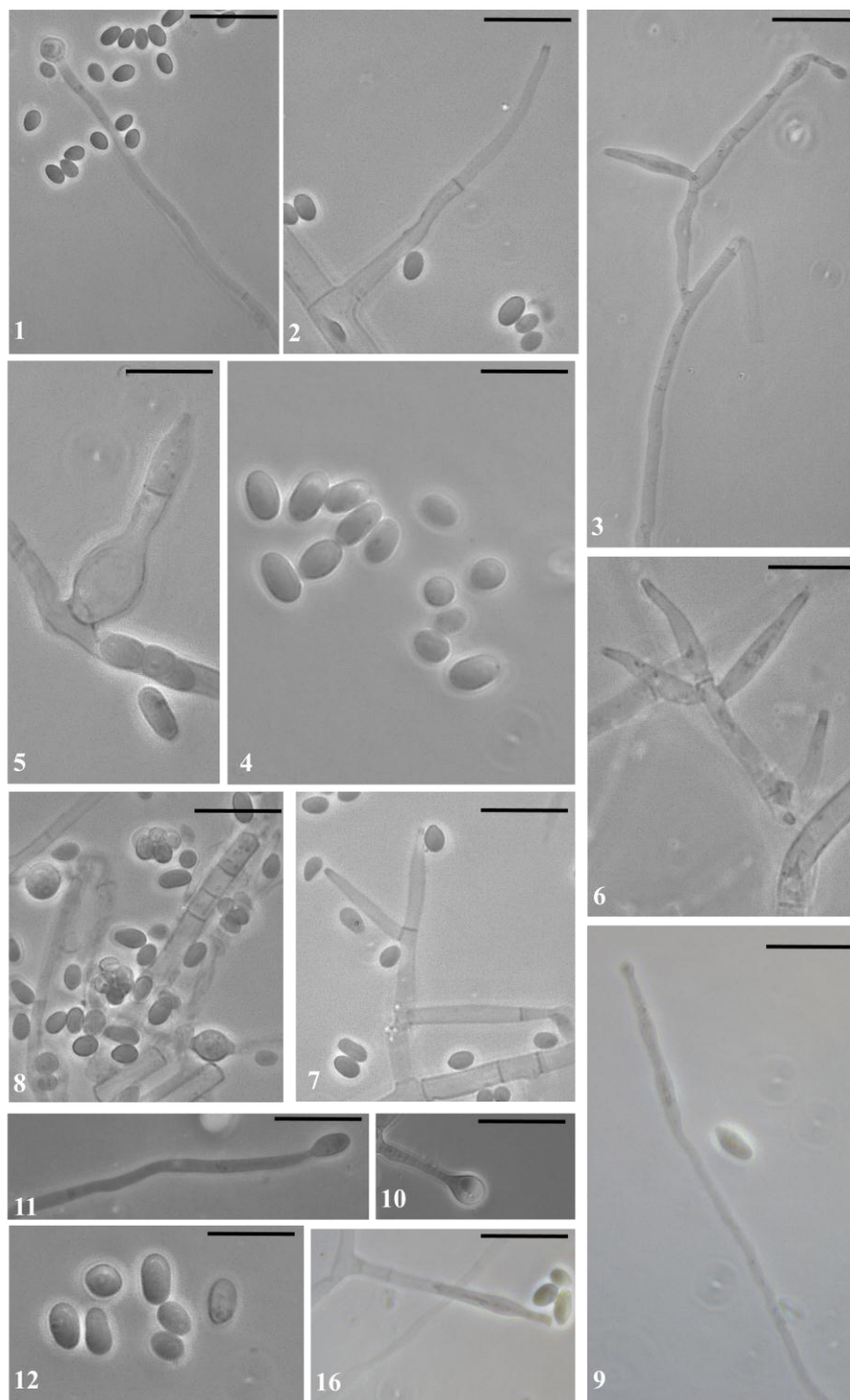
*Tipificação*: Brasil, Bahia, Valença, Guaibim, serapilheira.

*Etimologia*: O epíteto específico refere-se ao local de isolamento, serapilheira.

Em SNA depois de 72h, colônia com crescimento de 4—7 mm, micélio preenchendo a placa em 8 dias em 20 °C, colônia inicialmente hialina e submersa, se tornando difuso com micélio aéreo com crescimento radial. Conidiação iniciada a partir de 7 dias presente em hifas aéreas, sem formação de pústulas. Pigmento amarelado notado. Exsudato transparente notado próximo ao inóculo. Inodoro. Conidióforo verticillium com poucas ramificações primárias com 1-2 células, sem ramificações secundárias. Conidióforo tipo trichoderma com poucas ramificações, ramificações primárias com 1-2 células, ramificações secundárias quando presentes contendo 1-2 células, muitos conidióforos solitários longos ou curtos. Fiálides, ampuliformes, langeniforme, solitárias ou emparelhadas, (-3) 6 - 16 (-22) x 1 - 5  $\mu\text{m}$ , 3 - 6 C/L, largura da base da fiálide 1 - 3  $\mu\text{m}$  (n=60). Conídios verdes, lisos, (sub)globosos, elipsoides e ovoides 3 - 5 x 2 - 4  $\mu\text{m}$ , 1,3 - 2 C/L (n=60). Clamidósporo abundante, terminal e intercalar, raramente lateral, (sub)globoso 4 - 10 x 3 - 6 (-8)  $\mu\text{m}$ , 1.2 - 1.7 C/L (n=45).

Em CMD depois de 72h, colônia com crescimento de 20—23 mm, micélio preenchendo a placa em 8 dias em 20 °C, colônia inicialmente hialina, micélio aderido à superfície do meio de cultura com crescimento radial. Sem conidiação iniciada aparente, sem formação de pústulas. Pigmento amarelado notado. Inodoro.

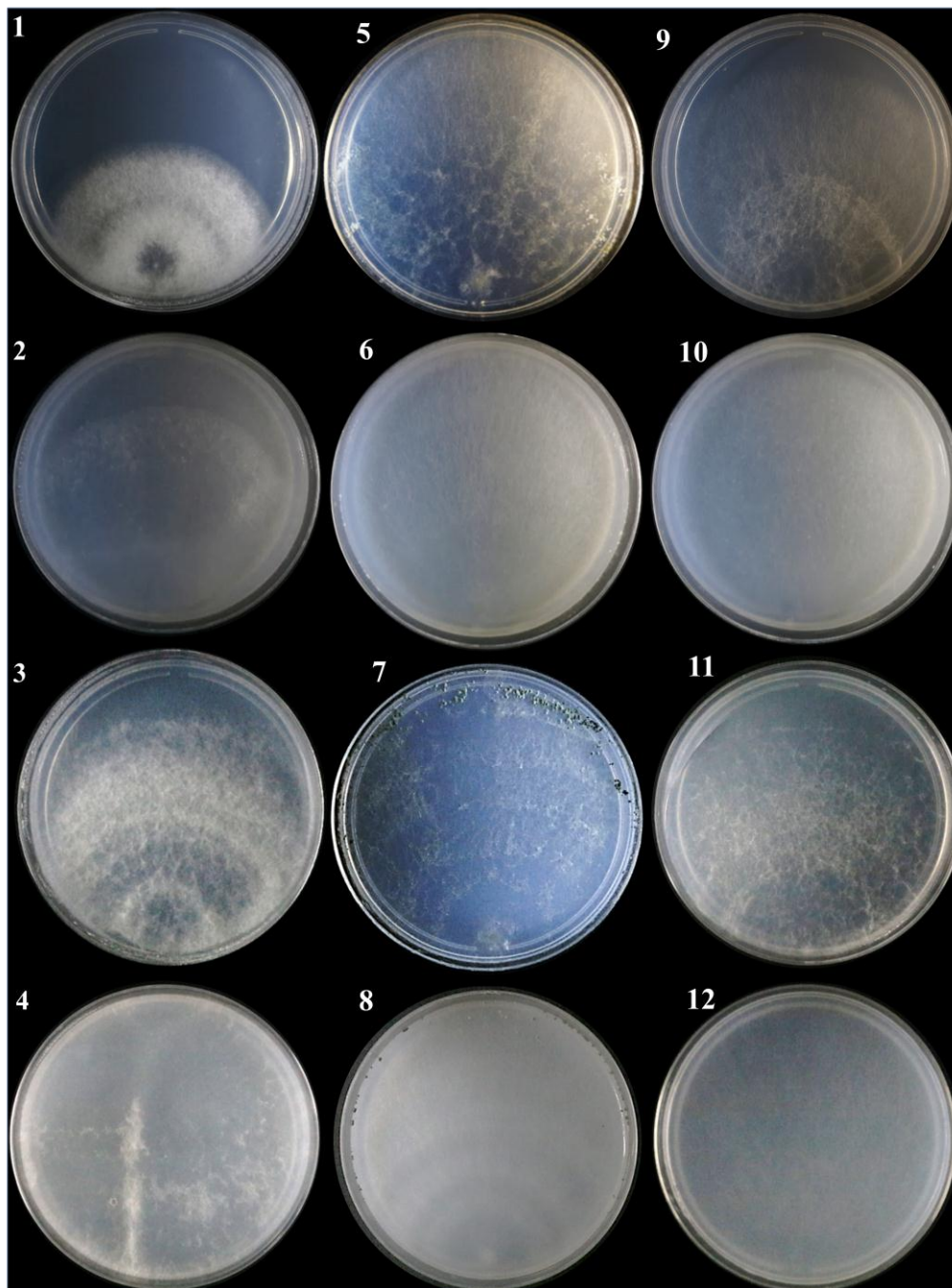




**Figura 7.** *Trichoderma* sp. nov. TR13MTS<sup>p25</sup>– (1 - 13 ) em SNA 20 °C. (4, 12) Conídios; (6, 7,) Conidióforo tipo verticillium; (3) Conidióforo tipo trichoderma; (3, 6, 7, 16) fiálides langeniforme; (1, 8, 10, 11) Clamidósforo; (1, 2, 9, 11,16) Fiálides solitárias; (5) Fiálide em formação de conídios.

Nota: *Trichoderma* sp. nov. TR13MTS<sup>p25</sup> possui um crescimento radial menor que *T. spirale* em todas temperaturas testadas (Tabela 2). Além disso *Trichoderma* sp. nov.

TR13MTS<sup>p25</sup> não esporulou em meio CMD e BDA, e apresentou micélio aderido à superfície do meio ou difuso. *T. spirale* foi descrito em ambos os meios com micélio aéreo denso e com conidiação presente. Os conidióforos de *T. spirale* são do tipo pachybasium com ramificações primárias e secundárias enquanto os conidióforos de *Trichoderma* sp. nov. TR13MTS<sup>p25</sup> são solitários e do tipo verticillium e trichoderma, com poucas ramificações primárias e raras ramificações secundárias. *T. spirale* possui um padrão de conídios oblongo (elipsoidal), enquanto os conídios de *Trichoderma* sp. nov. TR13MTS<sup>p25</sup> possui uma maior variação, como ovoides, (sub)globoso. O tamanho das fiáides de *Trichoderma* sp. nov. TR13MTS<sup>p25</sup> (-5) 8 - 15 (-21) x 1-4 são maiores que *T. spirale* (3.7-4-6.4(-7.4) x 2.6-3.5(-4.3) descrito por Jang et al. (2007). Além disso, *Trichoderma* sp. nov. TR13MTS<sup>p25</sup> não produz pústulas em nenhum meio descrito (Tabela 3).



**Figura 8:** Caracterização da colônia das espécies (1-4) *Trichoderma* sp. nov. TR06MTS<sup>p22</sup>; e (5-8) TR01MTS<sup>p21</sup> (9-12) *Trichoderma* sp. nov. TR13MTS<sup>p25</sup>; (1, 5, 9) SNA em 7d; (2, 6, 10) CMD em 7d; (3, 7, 11) SNA em 14d; (4, 8, 12) CMD em 14d.

## 4 DISCUSSÃO

O fator de alongamento 1- $\alpha$  (*teF1*) é utilizado como DNA *barcode* para distinguir isolados do gênero *Trichoderma* em nível de espécie, o RPB2 é utilizado como marcador molecular secundário (QIAO et al., 2018; JIANG et al., 2016). Desde que *T. spirale* foi descrito dezenas de sequências de nucleotídeos de *teF1* e RPB2 de isolados oriundos de vários continentes e identificados como *T. spirale* foram depositadas nos bancos de dados públicos (BELAYNEH MULAW et al., 2010; MONTOYA et al., 2016; JANG et al., 2017; HOYOS-CARVAJAL et al., 2009; MIGHELI et al., 2009; SMITH et al., 2013; JAKLITSCH & VOGLMAYR, 2015; SKONECZNY et al., 2015; CHEN & ZHUANG, 2017 ). Estas sequências foram obtidas de isolados de *Trichoderma* oriundos de pelos menos 3 países/continentes diferentes sugerindo que *T. spirale* possui uma distribuição mundial e grande diversidade genética ou que estas sequências de nucleotídeos representam novas espécies dentro do clado *Spirale*. A maioria dessas sequências estão distribuídas em clados que não estão relacionados com o clado que contém o *teF1* do tipo de *T. spirale*. Alguns destes clados também estão presentes na árvore filogenética do RPB2 e, além disso, a topologia da árvore filogenética combinada do *teF1* e RPB2 é em grande parte congruente com a distribuição geográfica dos isolados, o que indica que os isolados que compõem esses clados representam linhagens com histórias evolutivas distintas.

A filogenia molecular combinada de *teF1* e RPB2 mostrou que os isolados e *Trichoderma* sp.nov. TR01MTS<sup>p21</sup>, *Trichoderma* sp. nov. TR06MTS<sup>p22</sup> e *Trichoderma* sp. nov. TR13MTS<sup>p25</sup> ficam em um clado distinto do clado que contém o tipo de *T. spirale*. Além disso, esses isolados possuem diferenças morfológicas macroscópicas e microscópicas e foram isolados em locais geograficamente distintos. A análise conjunta desses resultados indica que *Trichoderma* sp.nov. TR01MTS<sup>p21</sup>, *Trichoderma* sp. nov. TR06MTS<sup>p22</sup> e *Trichoderma* sp. nov. TR13MTS<sup>p25</sup> representam novas espécies dentro do Clado *Spirale*.

O *teF1* de *Trichoderma* sp. nov. TR01MTS<sup>p21</sup>, TR06MTS<sup>p22</sup> e *Trichoderma* sp. nov. TR13MTS<sup>p25</sup> possuem, respectivamente, 96.89, 97.11 e 97,66 % de identidade com o *teF1* do tipo de *T. spirale*. Se esse valor de identidade for usado como ponto de



**Tabela 3** – Comparação das características morfológicas da colônia das espécies *Trichoderma* sp.nov. TR01MTS<sup>p21</sup>, TR06MTS<sup>p22</sup> e *Trichoderma* sp.nov. TR13MTS<sup>p25</sup> com o tipo de *T. spirale* e seu registro de ocorrência.

Espécies	<i>Trichoderma</i> TR01MTS <sup>p21</sup>		<i>Trichoderma</i> TR06MTS <sup>p22</sup>		<i>Trichoderma</i> TR13MTS <sup>p25</sup>		<i>Trichoderma spirale</i> Chaverri (2003)	<i>Trichoderma spirale</i> Jang (2017)	
	SNA	CMD	SNA	CMD	SNA	CMD	CMD	SNA	
Características das colônias	<b>Formação de Pústulas</b>	Pulvinata/globosas e agregadas	Pulvinata/globosas e agregadas	Não produz	Não produz	Não produz	Não produz	Pulvinata/subglobosa ou compacta	Presente, mas não descrito
	<b>Formação de Micélio</b>	Aéreo	Aéreo e Aderido	Aéreo denso	Aéreo difuso	Aéreo difuso	Aderido	Aéreo denso	Aéreo
	<b>Formação de Exsudato</b>	Não produz	Não produz	Produz	Produz	Produz	Não produz	Não produz	Não produz
	<b>Pigmento solúvel</b>	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente

**Tabela 4** – Comparação microscópica das espécies *Trichoderma* sp. nov. TR01MTS<sup>p21</sup>, TR06MTS<sup>p22</sup> e *Trichoderma* sp.nov. TR13MTS<sup>p25</sup> com o tipo de *T. spirale* e seu registro de ocorrência.

Espécies	<i>Trichoderma</i> TR01MTS <sup>p21</sup>		<i>Trichoderma</i> TR06MTS <sup>p22</sup>	<i>Trichoderma</i> TR13MTS <sup>p25</sup>	<i>Trichoderma spirale</i> Chaverri (2003)	<i>Trichoderma spirale</i> Jang (2017)	
	SNA	CMD	SNA	SNA	CMD	SNA	
Características Microscópicas (µm)	<b>C x L do conídio</b>	3-6 x 2-4	3-4 (-6) x 2-3	3-6 x 2-3	3-5 x 2-4	3.5–4.5 x (2.0–)2.5–3.0(-3.7)	4.1–5.1 x 2.5–2.8(-3)
	<b>C/L conídio</b>	1.3-2.0	1-2	1-2	1,3-2	(1.1–)1.4–1.5(-1.8)	N/A
	<b>C x L da célula que</b>	(5-)7-22 (-24) x 2-4	5 - 18 (-21) x 2-4	(2-) 5 - 18 (-25) x 1-4	3-15 (-17) x 1 - 5	(2.7–)3.0-4.5(-6.0)	N/A

surgem fiálides						
<b>L da base do fiálide</b>	1-3	1-3	1-3	1-3	(1.5-)2.0- 3.0(-4.2)	1.9-2.8(-3.2)
<b>C x L fiálide</b>	4-13(-17) x 2-5	(4-) 5 - 11 (-15) x 2 - 4	(-5) 8 - 15 (-21) x 1-4	(-3) 6 - 16 (-22) x 1 - 5	(3.2-)4.5-6.5(-8.2) x (2.7-)3.0-3.7(-4.5)	(3.7-)4-6.4(-7.4) x 2.6-3.5(-4.3)
<b>C/L da fiálide</b>	1.7-3.4(-3.7)	2,0 - 3,3 (-3,8)	3,5-6 (-6,7)	3-6	(1.0-)1.3-2.0(-2.7)	N/A
<b>C x L do Clamidósporo</b>	4-11(-13) x 5-12	4-9 x 3-5(-9)	4-7(-9) x 4-8	4-10 x 3 - 6 (-8)	(4.5-)7.0-15.0(-22.0)	N/A
<b>C/L do Clamidósporo</b>	(0.8-)1-1.3	(0,9) 1,2 x1,3 (1,7)	1-1,3	1,2-1,7	N/A	N/A

Os autores são responsáveis pelas informações relativas às sequências de nucleotídeos e de proteínas depositadas em bases de dados públicas como o NCBI. Logo, erros na identificação em nível de espécie dos isolados do qual a sequência foi obtida acontecem por vários motivos. Primeiro, os autores podem não ter feito uma descrição morfológica detalhada do isolado seguida de uma identificação taxonômica e identificam o isolado em nível de espécie apenas via BLAST. Inicialmente eles verificam via BLAST qual sequência das bases de dados, cujo isolado de origem está identificado em nível de espécie é mais similar à sequência deles e em seguida transferem essa anotação para a sequência deles. Essa prática contribui para a propagação de erros de anotação na identificação da espécie que a sequência de nucleotídeos e de proteínas representa.

A existência de espécies crípticas é um fenômeno comum no Reino *Fungi* (CHAVERRI et al., 2015; DRUZHININA et al., 2010; RIFAI, 1969.), estas espécies são indistinguíveis do ponto de vista morfológico, mas são distintas do ponto de vista evolutivo. Esse problema é agravado pela falta de critérios menos arbitrários para a definição dos limites de diversidade genética e morfológica de uma espécie de fungo. Portanto, dependendo do grupo taxonômico que um determinado fungo pertence a designação correta da espécie a qual ele pertence pode ser um problema, principalmente se essa linhagem é representada por uma ou poucas sequências nas bases de dados.

As questões relativas à anotação das sequências de nucleotídeos e de proteínas apresentadas acima não diminuem ou põem em xeque a importância das bases de dados públicas, contudo mostra que as informações depositadas nelas devem ser usadas com parcimônia e interpretadas caso a caso com conhecimento de causa para minimizar o risco de propagação de erros de anotação (PERTSEMLIDIS & FONDON, 2002). Dessa forma, a pouca diversidade encontrada na literatura pode não ser a real amostragem desse clado, mostrado que a diversidade abrigada por ele é maior do que se pensa atualmente e que algumas espécies estudadas nesse trabalho já estão evoluindo de forma independente ao longo do tempo.

## 5 CONCLUSÃO

A maioria das sequências de *teF1* depositadas nas bases de dados do NCBI de isolados identificados como *T. spirale* representam espécies não descritas do clado *Spirale* e os isolados *Trichoderma* sp.nov. TR01MTS<sup>p21</sup>, TR06MTS<sup>p22</sup> e *Trichoderma* sp. nov. TR13MTS<sup>p25</sup> oriundo da restinga de Guaibim, BA, representam novas espécies pertencentes a este clado.

## REFERÊNCIAS

BAILEY, B. A. et al. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. **Biological control**, v. 46, n. 1, p. 24-35, 2008.

BELAYNEH MULAW, Temesgen; KUBICEK, Christian; DRUZHININA, Irina. The rhizosphere of *Coffea arabica* in its native highland forests of Ethiopia provides a niche for a distinguished diversity of *Trichoderma*. **Diversity**, v. 2, n. 4, p. 527-549, 2010.

BISSETT, John. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. **Canadian journal of botany**, v. 62, n. 5, p. 924-931, 1984.

BISSETT, John. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. **Canadian journal of botany**, v. 69, n. 11, p. 2373-2417, 1991.



CHAVERRI, Priscila et al. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 27, n. 2, p. 302-313, 2003.

CHAVERRI, Priscila et al. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 27, n. 2, p. 302-313, 2003.<sup>a</sup>

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, Kai; ZHUANG, Wen-Ying. Discovery from a large-scaled survey of *Trichoderma* in soil of China. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 9090, 2017.

DRUZHININA, Irina 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, Irina S. et al. The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, p. 94, 2010.

GAMS, W.; MEYER, W. What exactly is *Trichoderma harzianum*?. **Mycologia**, v. 90, n. 5, p. 904-915, 1998.

HOYOS-CARVAJAL, Lilliana; ORDUZ, Sergio; BISSETT, John. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 9, p. 615-631, 2009.

JAKLITSCH, W. M.; VOGLMAYR, H. Biodiversity of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) in Southern Europe and Macaronesia. **Studies in mycology**, v. 80, p. 1-87, 2015.

JANG, Seokyeon et al. Five New Records of Soil-Derived *Trichoderma* in Korea: *T. albolutescens*, *T. asperelloides*, *T. orientale*, *T. spirale*, and *T. tomentosum*. **Mycobiology**, v. 45, n. 1, p. 1-8, 2017.

JIANG, Yuan et al. *Trichoderma* biodiversity of agricultural fields in east China reveals a gradient distribution of species. **PLoS one**, v. 11, n. 8, p. e0160613, 2016.

KATOH, Kazutaka; ASIMENOS, George; TOH, Hiroyuki. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. In: **Bioinformatics for DNA sequence analysis**. Humana Press, 2009. p. 39-64.

MIGHELI, Quirico et al. Soils of a Mediterranean hot spot of biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan - European, invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. **Environmental microbiology**, v. 11, n. 1, p. 35-46, 2009.

MONTOYA, Quimi Vidaurre et al. Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 109, n. 5, p. 633-651, 2016.

PERTSEMLIDIS, Alexander; FONDON, John W. Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLASTphemy). **Genome biology**, v. 2, n. 10, p. reviews2002. 1, 2001.

QIAO, Min et al. Three new species of soil-inhabiting *Trichoderma* from southwest China. **MycoKeys**, n. 44, p. 63, 2018.

RIFAI, M. A. A revision of the genus *Trichoclerma*. **Mycol. Pap.** 116: 1-56. 1969.

ROBBERTSE, Barbara et al. Improving taxonomic accuracy for fungi in public sequence databases: applying 'one name one species' in well-defined genera with *Trichoderma/Hypocrea* as a test case. **Database**, v. 2017, 2017.

SAMUELS, Gary J. et al. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. **Mycologia**, v. 102, n. 4, p. 944-966, 2010.

SAMUELS, Gary J. et al. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, v. 94, n. 1, p. 146-170, 2002.

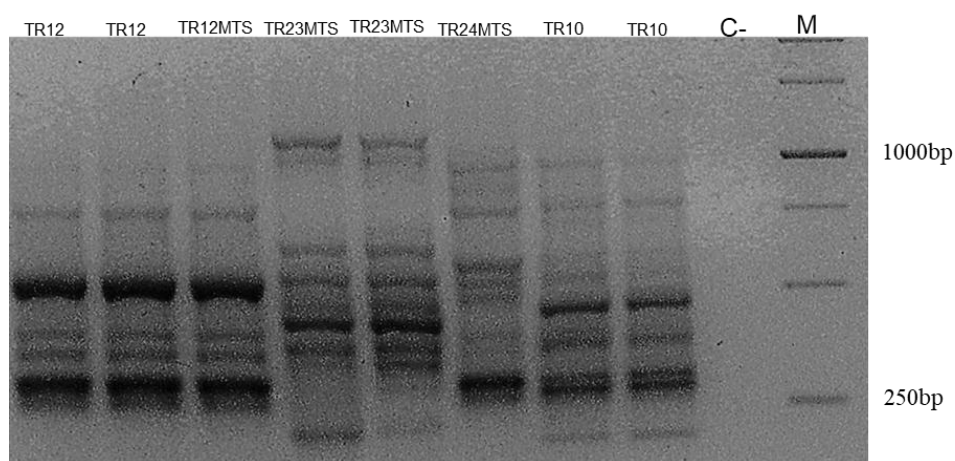
SHARMA, Kamal; MISHRA, Ajay Kumar; MISRA, Raj Shekhar. Morphological, biochemical and molecular characterization of *Trichoderma harzianum* isolates for their efficacy as biocontrol agents. **Journal of Phytopathology**, v. 157, n. 1, p. 51-56, 2009.

SKONECZNY, Dominik et al. Genetic diversity of *Trichoderma atroviride* strains collected in Poland and identification of loci useful in detection of within-species diversity. **Folia microbiologica**, v. 60, n. 4, p. 297-307, 2015.

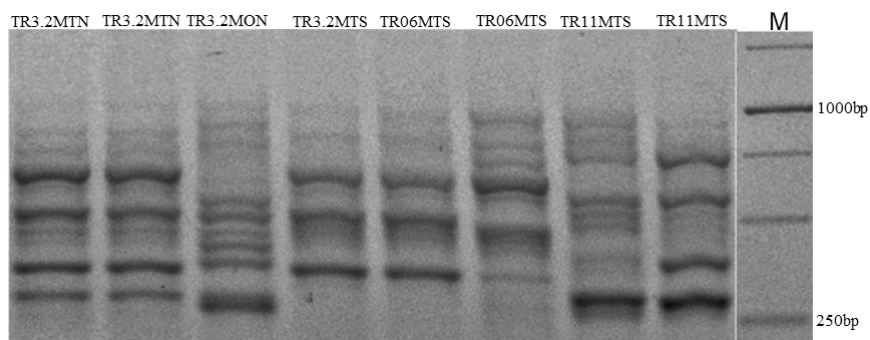
SMITH, Alexander et al. Diversity of soil-dwelling *Trichoderma* in Colombia and their potential as biocontrol agents against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Journal of general plant pathology**, v. 79, n. 1, p. 74-85, 2013.

TAMURA, Koichiro et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

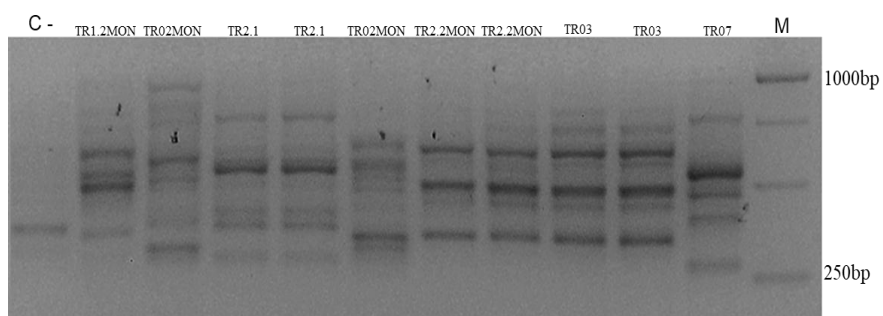
**ANEXOS:** Produto da amplificação do Rep-PCR dos Elementos BOX.



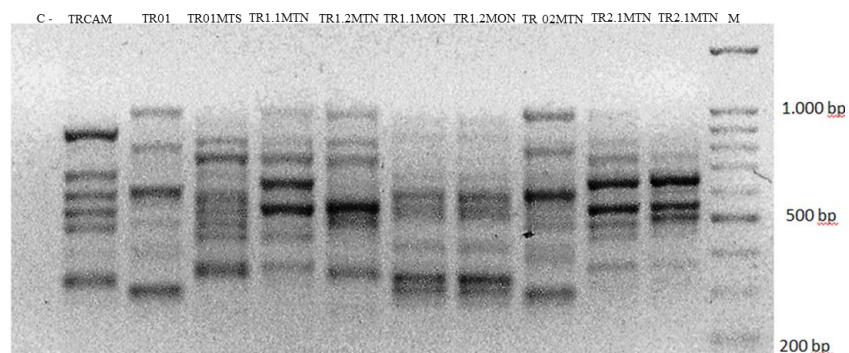
**Figura 9:** Amplificação do elemento BOX dos isolados de *Trichoderma* da região de Mata Sul (MTS), Mata Norte (MTN) e Moita Noirte (MON).



**Figura 10:** Amplificação do elemento BOX dos isolados de *Trichoderma* da região de Mata Sul (MTS) e isolados sem local definido.



**Figura 11:** Amplificação do elemento BOX dos isolados de *Trichoderma* da região de Mata Sul (MTS), Mata Norte (MTN) e Moita Norte (MON).



**Figura 12:** Amplificação do elemento BOX dos isolados de *Trichoderma* da região de Moita Norte (MON) e isolados sem local definido.

**Tabela 5** – Perfis genéticos dos 38 isolados distribuídos em 27 perfis distintos com seus respectivos representantes.

<b>Perfil genético</b>	<b>Isolados do gênero <i>Trichoderma</i></b>
Perfil genético 1	TR05MON , TR05MTS , TR05MTN e TR06MON.
Perfil genético 2	TR03, TR2.2MON
Perfil genético 3	TR12MTS, TR12
Perfil genético 4	TR3.2MON, TR06MTN
Perfil genético 5	TR01, TR02MTN
Perfil genético 6	TR1.1MTN, TR2.1MTN
Perfil genético 7	TR1.1MON e TR1.2MON.
Perfil genético 8	TR1.2MTN e TR02MTN
Perfil genético 9	TR4.2MON e TR4.3MON.
Perfil genético 10	TR2.1
Perfil genético 11	TR11MTS
Perfil genético 12	TR10
Perfil genético 13	TR03MTN
Perfil genético 14	TR23MTS
Perfil genético 15	TR4.1MON
Perfil genético 16	TR07
Perfil genético 17	TR3.1MON
Perfil genético 18	TR24MTS
Perfil genético 19	TRCAM
Perfil genético 20	TR04
Perfil genético 21	TR01MTS
Perfil genético 22	, TR06MTS
Perfil genético 23	TR02MON
Perfil genético 24	TR06
Perfil genético 25	TR13MTS
Perfil genético 26	TR17MTS
Perfil genético 27	TR04MTS