

VANESSA NASCIMENTO BRITO

***Trichoderma* spp. ENDOFÍTICOS DE SERINGUEIRAS NATIVAS DA
FLORESTA AMAZÔNICA: IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
NOVAS ESPÉCIES E POTENCIAL PARA O CONTROLE DE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

T

B862t
2017

Brito, Vanessa Nascimento, 1986-

Trichoderma spp. endofíticos de seringueiras nativas da floresta amazônica : identificação e caracterização de novas espécies e potencial para o controle de fungos fitopatogênicos / Vanessa Nascimento Brito. – Viçosa, MG, 2017.

xiii, 84f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Marisa Vieira de Queiroz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Filogenia. 2. Fingerprinting. 3. Atividade antimicrobiana. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Doutorado em Microbiologia Agrícola. II. Título.

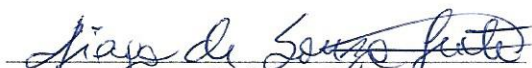
CDD 22 ed. 632.4

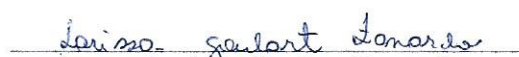
VANESSA NASCIMENTO BRITO

***Trichoderma* spp. ENDOFÍTICOS DE SERINGUEIRAS NATIVAS DA
FLORESTA AMAZÔNICA: IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
NOVAS ESPÉCIES E POTENCIAL PARA O CONTROLE DE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de
Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.

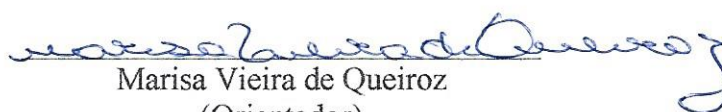
APROVADA: 23 de agosto de 2017.


Tiago de Souza Leite


Larissa Goulart Zanardo


Mateus Ferreira Santana


Olinto Liparini Pereira
(Coorientador)


Marisa Vieira de Queiroz
(Orientador)

DEDICO

A Deus.

À minha mãe Maria Olení Luiza do Nascimento (*in memoriam*).

AGRADECIMENTO

Aos meus pais Paulo Rocha Brito e Maria Olení Luiza do Nascimento (*in memoriam*) e meu irmão Saulo Nascimento Brito.

Em especial, agradeço ao meu esposo Sérgio Felipe, pelo companheirismo, cumplicidade, amor, paciência, dedicação e conselho.

Às minhas amigas da graduação Áurea Izabel, Aurilena Aviz, Jackeline Siqueira e Nayara Oliveira.

Aos meus professores da Graduação Heráclito Eugênio Oliveira da Conceição, Candido de Oliveira Neto e Ítalo Albério.

À professora Marisa Vieira de Queiroz, pela orientação concedida, pelos ensinamentos, sugestões e apoio em todas as etapas da construção desta tese.

Aos meus co-orientadores Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Olinto Liparini Pereira.

Aos professores Tiago de Souza Leite e Lucas Magalhães de Abreu, pelos ensinamentos.

À Ana Tibucia e Renato Villaschi pela ajuda durante a coleta no estado do Amazonas.

Ao Fábio Rodrigues, Nívea Vieira, Janaína Teixeira e Aline Duarte pela ajuda concedida durante a realização desse trabalho.

Aos amigos que a UFV me proporcionou: Flávia Oliveira, Valquíria Júnia, Fernanda Pereira, Laiane Maciel, Lina Cortez, Jonathan Manhães, Thyara Silva, Rita Melo, Josi Crispim, Paulo Prates, Tomás Veloso, Alan Cerqueira, Anali Abe, Newton Sanches, Ana Carolina, Mísia Souza, Dâmaris Gomes, Lucas Correia, Casley Queiroz, Hanna Lorena...enfim, a todos que fizeram parte desta conquista direta ou indiretamente em especial a minha amiga Kaliane Sório pelo convívio fora e dentro do laboratório.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de participar do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo cedida durante o curso. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à

Pesquisa do estado de Minas Gerais (Fapemig) pelo apoio financeiro. Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) da Universidade Federal de Viçosa, à Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) e ao Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias (SisNANO)/Ministério da Ciência, Tecnologia e Informação (MCTI), pelo apoio.

BIOGRAFIA

Nascida em 10 de agosto de 1986, em Capitão Poço (PA), filha de Paulo Rocha Brito e Maria Olení Luiza do Nascimento, Vanessa Nascimento Brito ingressou na vida acadêmica no ano de 2007, no curso de Agronomia pela Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA (PA), graduando-se em julho de 2011.

Em agosto de 2011, ingressou no mestrado em Produção Vegetal, pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darci Ribeiro – UENF (RJ), tornando-se mestre em Produção Vegetal em julho de 2013.

Em agosto de 2013, ingressou no doutorado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa – UFV (MG), defendendo sua tese em agosto de 2017.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPITULO I.....	3
RESUMO....	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. MATERIAL E MÉTODOS	8
2.1 Origem dos isolados endofíticos do gênero <i>Trichoderma</i>	8
2.2 Marcadores IRAP e REMAP utilizados na triagem dos isolados	8
2.3 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento	9
2.4 Análise filogenética.....	12
2.5 Caracterização morfológica das quatro espécies propostas como novas	17
3. RESULTADOS	18
3.1 Uso dos marcadores IRAP e REMAP para análise da variabilidade genética e triagem dos isolados do gênero <i>Trichoderma</i>	18
3.2 Análise Filogenética	21
3.3 Taxonomia.....	25
4. DISCUSSÃO	34
4.1 Uso dos marcadores IRAP e REMAP para a análise da variabilidade genética e a triagem dos isolados do gênero <i>Trichoderma</i>	34
4.2 Identificação molecular das espécies do gênero <i>Trichoderma</i>	35
4.3 Análise filogenética	37
4.4 Quatro novas espécies de <i>Trichoderma</i> propostas como novas	37
5. REFERÊNCIAS	40
CAPITULO II.....	49
RESUMO	50
1. INTRODUÇÃO	51
2. MATERIAL E MÉTODOS	54
2.1 Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. endofíticos e fungos fitopatogênicos	54

2.2 Ensaio de cultura dupla	55
2.3 Atividade antagônica a partir do meio de cultura liofilizado	55
2.4 Inibição da germinação dos conídios e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) a partir do extrato bruto	56
2.5 Obtenção do perfil dos metabólitos secundários de <i>Trichoderma</i> spp. utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)	57
2.6 Atividade enzimática de β -1,3-glucanase e quitinase	58
2.7 Análises estatísticas	59
3. RESULTADOS	60
3.1 Ensaio de cultura dupla	60
3.2 Atividade antagônica a partir do filtrado liofilizado	63
3.3 Inibição da germinação dos conídios e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) a partir do extrato bruto	66
3.4 Perfil dos metabólitos secundários bioativos	67
3.5 Atividade enzimática relacionada ao micoparasitismo	69
4. DISCUSSÃO	72
5. REFERÊNCIAS	76
CONCLUSÕES GERAIS	84

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Perfil de bandas de produtos de PCR gerados a partir da técnica de IRAP de trinta e oito isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	18
Figura 2. Perfil de bandas de produtos de PCR gerados a partir da técnica de REMAP de trinta e oito isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	19
Figura 3. Dendograma de distância genética de trinta e oito isolados do gênero <i>Trichoderma</i>	20
Figura 4. Árvore filogenética obtida pela Inferência Bayesiana	22
Figura 5. <i>Trichoderma</i> sp. VIC 44362.	26
Figura 6. <i>Trichoderma</i> sp. VIC 44361.	28
Figura 7. <i>Trichoderma</i> sp. VIC 44363.	30
Figura 8. <i>Trichoderma</i> sp. VIC 44364.	32

CAPÍTULO II

Figura 1. Cultura dupla dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. versus fungos fitopatogênicos	62
Figura 2. Efeito antagonista do liofilizado das culturas de <i>Trichoderma</i> versus fungos fitopatogênicos.	65
Figura 3. Comparação dos cromatogramas totais da corrente de íons totais - Total ion current chromatograms (TIC).	68
Figura 4. Atividade da β -1,3-glucanase de quatro isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	70
Figura 5. Atividade da quitinase de quatro isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	71

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR para as análises de IRAP e REMAP de isolados endofíticos do gênero <i>Trichoderma</i>	8
Tabela 2. Genes/locus utilizados na análise filogenética do gênero <i>Trichoderma</i> com os respectivos oligonucleotídeos iniciadores e as condições de amplificação da PCR	11
Tabela 3. Fungos do gênero <i>Trichoderma</i> que foram utilizados neste trabalho	13
Tabela 4. Comparação das espécies baseado nas variações das características morfológicas.	33

CAPÍTULO II

Tabela 1. Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. endofíticos da seringueira (<i>Hevea</i> spp.) utilizados neste estudo.	54
Tabela 2. Valores médios de crescimento e porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>F. verticillioides</i> , <i>C. karstii</i> , <i>C. laticiphilum</i> e <i>C.lindemuthianum</i> obtidos por meio do ensaio de cultura dupla das com os isolados de <i>Trichoderma</i> spp	61
Tabela 3. Valores médios de crescimento e porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>F. verticillioides</i> , <i>C. karstii</i> , <i>C. laticiphilum</i> e <i>C.lindemuthianum</i> obtidos pelo método de difusão em ágar utilizando o liofilizado de culturas com os isolados de <i>Trichoderma</i> spp. obtidos por fermentação... ..	64
Tabela 4. Efeito dos extratos brutos <i>Trichoderma</i> spp. na inibição da germinação dos conídios dos fungos fitopatogênicos.	66

RESUMO

BRITO, Vanessa Nascimento, D.Sc, Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2017. ***Trichoderma* spp. endofíticos de seringueiras nativas da floresta amazônica: identificação e caracterização de novas espécies e potencial para o controle de fungos fitopatogênicos.** Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Coorientadores: Olinto Liparini Pereira e Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

Espécies do gênero *Trichoderma* estão entre os fungos mais estudados e comercializados como agentes de controle biológico na agricultura. Contudo, estudos envolvendo a análise de *Trichoderma* spp. endofíticos em plantas nativas da Amazônia brasileira são incipientes. Os fungos endofíticos são definidos como aqueles que vivem no interior de tecidos vegetais, convivendo com seus hospedeiros de maneira simbiótica e apresentam elevada diversidade em florestas tropicais. Os objetivos do presente estudo foram utilizar os marcadores moleculares IRAP (*Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism*) e REMAP (*Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*) para a triagem dos isolados de *Trichoderma* spp., identificar esses isolados endofíticos de plantas de *Hevea* spp. nativas da floresta amazônica brasileira ao nível de espécie e caracterizar os isolados com potencial para utilização no controle biológico de fungos fitopatogênicos. Trinta e oito isolados de *Trichoderma* spp. foram analisados empregando os marcadores moleculares IRAP e REMAP. Os perfis de bandas produzidos demonstraram a redundância de alguns isolados obtidos do mesmo tecido e na mesma planta. Essa triagem permitiu a seleção de 30 isolados para a análise filogenética e a identificação. Para identificação ao nível de espécie foram utilizados os oligonucleotídeos específicos para amplificar o espaçador interno transcrito (ITS do rDNA), e dos genes do fator de elongação da tradução 1-alfa (TEF1- α), da subunidade alfa da actina (ACT) e da subunidade maior da RNA polimerase II (RPB2). A maioria dos isolados foram classificados em 11 espécies distintas, sendo quatro novas espécies propostas: *Trichoderma* sp. VIC 44362, *Trichoderma* sp. VIC 44361, *Trichoderma* sp. VIC 44364 e *Trichoderma* sp. VIC 44363. Estas novas espécies foram sustentadas filogeneticamente com valores de probabilidade *a posteriori* altamente suportados. A seleção dos isolados de *Trichoderma* spp. quanto ao seu potencial para o controle biológico de fitopatógenos (*Colletotrichum karstii*, *C. laticiphilum*, *C. lindemuthianum* e *Fusarium verticillioides*) foi realizada a partir de ensaios de cultura dupla, atividade antifúngica do filtrado liofilizado e do extrato

bruto e atividade enzimática. Na análise de cultura dupla, os isolados 432F8C-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44361), 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362), 764F2C-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362), 762F17F-AC (*Trichoderma* sp. VIC 44362) e 26F9R-AC (*T. ovalisporum*) apresentaram os maiores potenciais de inibição dos quatro fungos fitopatogênicos. Para a análise do filtrado liofilizado, os isolados 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363), 24F6C-AM (*T. koningiopsis*), 245F13C-AC (*T. koningiopsis*) e 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362) destacaram-se na inibição dos quatro fitopatógenos, bem como, foram capazes de produzir quitinase e β -1,3-glucanase. O isolado 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363) apresentou os melhores resultados em relação à inibição do crescimento micelial e a inibição da germinação dos conídios de todos os fitopatógenos testados, com concentrações mínimas inibitórias relativamente baixas em relação aos demais isolados testados. Os resultados demonstram que os marcadores moleculares IRAP e REMAP são eficientes para serem utilizados durante o processo de triagem para a seleção de isolados de *Trichoderma* spp. Além disso, a formação do dendograma mostrou uma relação com os resultados da análise filogenética, onde a maior parte dos grupos formados no dendograma representa espécies filogeneticamente próximas. O isolado 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363) tem elevado potencial para ser utilizado no controle biológico dos fitopatógenos. Ressalta-se assim, que o isolamento e identificação de espécies endofíticas do gênero *Trichoderma* em plantas tropicais nativas podem revelar agentes novos e eficientes para controle de fitopatógenos, além de possibilitar a descoberta de novas espécies.

ABSTRACT

BRITO, Vanessa Nascimento, D.Sc, Universidade Federal de Viçosa, August, 2017. **Endophytic *Trichoderma* spp. of native rubber trees of the amazon forest: identification and characterization of new species and potential for the control of phytopathogenic fungi.** Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Co-advisers: Olinto Liparini Pereira and Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

Species of the genus *Trichoderma* are among the most studied fungi and marketed as agents of biological control agents in agriculture. However, studies involving the analysis of endophytic *Trichoderma* spp. in native plants of the Brazilian Amazon are incipient. Endophytic fungi are defined as those which live inside plant tissues in symbioses, and present high diversity in tropical forests. The objectives of the present study were first to use the molecular markers IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) and REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism) to select isolates of *Trichoderma* spp., for the phylogenetic analysis, second, to identify these isolates of endophytic plants of *Hevea* spp. native species of the Brazilian Amazon forest, and finally, to characterize the isolates with potential for use in the biological control of phytopathogenic fungi. Thirty-eight isolates of *Trichoderma* spp. were analyzed using the molecular markers IRAP and REMAP. The bands profiles produced also demonstrated the redundancy of some isolates obtained from the same tissue and in plant. This screening allowed the selection of 30 isolates for phylogenetic analysis and identification. For identification at the species level, specific oligonucleotides were used to amplify the transcript internal spacer (rDNA ITS), translation elongation factor 1 alpha (TEF1- α), actin alpha subunit (ACT) and largest subunit of the RNA polymerase II (RPB2) sequences. Most of the isolates were classified in 11 distinct species and four new species proposed: *Trichoderma* sp. VIC 44362, *Trichoderma* sp. VIC 44361, *Trichoderma* sp. VIC 44364 and *Trichoderma* sp. VIC 44363. These new species were phylogenetically determined by highly supported posteriori probability values. The selection of *Trichoderma* spp. isolates with potential for the biological control of phytopathogens (*Colletotrichum karstii*, *C. laticiphilum*, *C. lindemuthianum* and *Fusarium verticillioides*) was selected based on the double culture tests, antifungal activity of lyophilized filtrate and crude extract and enzymatic activity. In the double-culture analysis the isolates 432F8C-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44361), 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362), 764F2C-AM (*Trichoderma* sp. VIC

44362), 762F17F-AC (*Trichoderma* sp. VIC 44362) and 26F9R-AC (*T. ovalisporum*) have the highest potentials of inhibition to the four phytopathogenic fungi. For the analysis of the lyophilized filtrate the isolates 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363), 24F6C-AM (*T. koningiopsis*), 245F13C-AC (*T. koningiopsis*) and 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362) stood out in the inhibition of four phytopathogenic fungi, as well as, capable of producing chitinase and β -1,3-glucanase. Interestingly, the 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363) isolate showed the best results regarding inhibition of mycelial growth and inhibition of conidial germination of all phytopathogens tested, with relatively low inhibitory concentrations in relation to the other isolates tested. The results demonstrate that the molecular markers IRAP and REMAP are efficient to be used during the screening process for the selection of *Trichoderma* spp. In addition, the formation of the dendrogram showed a relationship with the results of phylogenetic analysis, where most of the groups formed in the dendrogram represent phylogenetically close species. The 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363) isolate has a high potential to be used in the biological control of phytopathogens. Highlighting, the isolation and identification of endophytic species of the genus *Trichoderma* in native tropical plants may reveal new and efficient agents for the control of phytopathogens, as well as the discovery of new species.

INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos, os micro-organismos endofíticos vêm sendo bastante estudados por apresentarem inúmeros benefícios para o homem, bem como para o meio ambiente. Segundo Orlando Petrini (1991), os micro-organismos endofíticos são aqueles que colonizam as plantas durante parte ou por todo seu ciclo de vida de forma assintomática. Essa interação planta-microrganismo pode conferir melhor adaptação às plantas no meio ambiente tornando-as mais tolerante a estresses bióticos e abióticos. Além disso, estes micro-organismos mostram-se com uma fonte promissora de metabólitos secundários de interesse agroindustrial e farmacológico.

O gênero *Trichoderma* apresenta inúmeras características intrínsecas que lhes conferem a capacidade de atuar no controle biológico de fungos fitopatogênicos. São capazes de micoparasitar outros fungos por meio de seu arsenal enzimático e de metabólitos secundários. Por apresentam crescimento rápido e elevada esporulação se tornam de fácil manipulação, características essenciais para um agente de biocontrole. No entanto, são poucos os trabalhos em relação à utilização de espécies endofíticas para fins de controle biológico, pois a maioria das espécies que são utilizadas em programas de controle biológico é oriunda de solos.

Estudar espécies endofíticas desse gênero pode revelar novos isolados com a capacidade de atuar no controle de fungos fitopatogênicos e com isso, subsidiar programas de controle biológico. Os objetivos do presente estudo foram identificar ao nível de espécie os isolados de *Trichoderma* spp. e selecionar isolados promissores *in vitro* para o controle de fungos fitopatogênicos.

No capítulo I, “*Trichoderma* spp. endofíticos de seringueiras nativas da floresta amazônica: morfologia, caracterização molecular e identificação de novas espécies”, quatro espécies do gênero *Trichoderma* são propostas como novas baseadas na análise filogenética e características morfológicas, além disso, os marcadores moleculares IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) e REMAP (*Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*) são utilizados de maneira eficiente na triagem de isolados deste gênero para auxiliar na identificação e seleção.

No capítulo II, “Isolados endofíticos do gênero *Trichoderma* promissores para o controle de fungos fitopatogênicos”, as espécies identificadas no capítulo I são

avaliadas quanto à capacidade de atuarem como agentes de biocontrole *in vitro* frente aos quatros fungos fitopatogênicos de interesse econômico *Fusarium verticillioides*, *Colletrotrichum karstii*, *Colletrotrichum laticiphilum* e *Colletotrichum lindemuthianum*. O isolado 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363) que é uma nova espécie proposta no capítulo I mostrou os melhores resultados na inibição dos quatro fitopatógenos analisados.

CAPÍTULO I

***Trichoderma* spp. ENDOFÍTICOS DE SERINGUEIRAS NATIVAS DA FLORESTA AMAZÔNICA: MORFOLOGIA, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES**

Resumo

Fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* são controladores eficientes de fungos fitopatogênicos, sendo que a maioria das espécies desse gênero é oriunda de solos. No entanto, com o aumento do isolamento e identificação de fungos endofíticos, isolados de *Trichoderma* spp. têm sido encontrados vivendo como endofíticos. Com o objetivo de selecionar e caracterizar as linhagens de *Trichoderma* spp. endofíticas de *Hevea* spp. nativas da floresta amazônica brasileira, foram realizadas a triagem dos isolados e análise da variabilidade genética utilizando os marcadores moleculares IRAP (*Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism*) e REMAP (*Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*), a caracterização morfológica e a identificação molecular por meio da análise de sequências específicas. Um total de 38 isolados foi submetido à análise utilizando os marcadores IRAP e REMAP e a partir dessa triagem, trinta isolados foram submetidos à identificação ao nível de espécie. Esses isolados mostraram alta variabilidade genética. Devido à associação dos resultados da análise filogenética concatenada/multilocus das regiões gênicas com valores altos de probabilidade à posteriori com os resultados da análise da morfologia foi possível propor quatro novas espécies do gênero *Trichoderma*. As quatro novas espécies *Trichoderma* sp. VIC 44361, *Trichoderma* sp. VIC 44362, *Trichoderma* sp. VIC 44363 e *Trichoderma* sp. VIC 44364, propostas neste estudo, são realacionadas as espécies *Trichoderma atroviride*, *T. brevicompactum* e *T. rogersonii*. Nossos resultados demonstraram que os marcadores IRAP e o REMAP foram eficientes para acessar a variabilidade genética das espécies endofíticas do gênero *Trichoderma* e com isso possibilitaram a triagem de isolados, facilitando a identificação de novas espécies.

Palavras chaves: filogenia; IRAP; REMAP; fingerprinting

1. Introdução

O bioma Amazônia é mundialmente reconhecido por apresentar elevada biodiversidade de flora e fauna. Assim, a intensificação no desenvolvimento de pesquisas que contribuam para a caracterização da biodiversidade microbiana presente neste bioma, pode subsidiar informações a serem utilizadas em diferentes estratégias biotecnológicas como, por exemplo, na produção de enzimas (Pereira et al., 2015), de antibióticos (Pidot et al., 2015) e de antifúngicos (Lipińska et al., 2016).

Dentre as espécies de plantas que são nativas da Amazônia, destacam-se a *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg. e *Hevea guianensis* Aubl., conhecidas popularmente como seringueira, sendo *H. brasiliensis* a principal fonte de matéria-prima para a produção de borracha natural no mundo (Tang et al., 2010; Furlani Junior & Gonçalves, 2012; Zhu et al., 2015). No entanto, fungos fitopatogênicos como *Pseudocercospora ulei* (anteriormente conhecido como *Microcyclus ulei*) (Hora Júnior et al. 2014) e espécies do gênero *Colletotrichum* causam enormes prejuízos em plantações comerciais de *Hevea* spp. (Furtado & Trindade, 2005).

O gênero *Trichoderma* (Classificação: Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Hypocreales, Hypocreaceae) é cosmopolita, ubíquo, de vida livre ou saprófita, comumente encontrado na microflora de solos naturais e agrícolas, mas também pode colonizar os tecidos das plantas e crescer entre as suas células, sendo assim caracterizado como endofítico. Algumas espécies têm sido isoladas como endofíticas em diferentes plantas lenhosas, como *Herrania* sp. (Crozier et al., 2006), *Aegle marmelo* (Gond et al., 2007), *Theobroma* spp. (Bae et al., 2009) e *Hevea* spp. (Gazis & Chaverri, 2010; Chaverri et al., 2011). *Trichoderma koningiopsis*, *T. endophyticum* e *T. lentiforme* destacam-se como as espécies do gênero com o maior número de relatos (Chaverri et al., 2015).

Adicionalmente, o gênero *Trichoderma* também apresenta elevado potencial para: (i) produção de enzimas com interesse industrial (Bischof et al., 2016); (ii) produção de diferentes metabólitos secundários (Saravanakumar et al., 2016a); (iii) indução de resistência sistêmica em plantas (Vitti et al., 2016; Saravanakumar et al., 2016b) e (iv) atuação na promoção do crescimento vegetal (Kuswinanti et al., 2015).

Além disso, espécies desse gênero são amplamente reconhecidas como parasitas de outros fungos (Harman et al., 2004; Vinale et al., 2008; Mukherjee et al., 2013).

Na identificação de espécies do gênero *Trichoderma* é comum a combinação de análise morfológica com a análise molecular. No entanto, tem sido observado que isolados de *Trichoderma* spp. podem apresentar homoplasia conidial e isto pode dificultar a sua caracterização morfológica, ao nível de espécie (Samuels, 2006). Além disso, muitas espécies de *Trichoderma* foram identificadas com base em características morfológicas e a utilização apenas da região do espaçador interno transcrito (ITS do rDNA) (Kuhls et al., 1999), contribuindo desta maneira, para uma baixa resolução na separação e correta identificação de espécies deste gênero (Chaverri et al., 2015).

Outras regiões gênicas têm sido usadas para a separação em nível de espécie para o gênero *Trichoderma*, como sequências da região gênica que codifica para o fator de alongação 1- alfa da tradução (TEF1- α) e a região que codifica para a subunidade maior da RNA polimerase II (RPB2), sendo estas as mais utilizadas para este gênero, isoladamente ou concatenadas (Lu et al., 2004; Chaverri & Samuels, 2004; Overton et al., 2006; Chaverri et al., 2015). Sendo assim, o uso da filogenia molecular tem permitindo a distinção rápida e correta das espécies do gênero *Trichoderma* (Jaklitsch & Voglmayr, 2015), e, atualmente, algumas espécies isoladas como endofíticas pertencentes ao gênero *Trichoderma* têm sido classificadas como novas espécies (Druzhinina et al., 2011; Chaverri et al., 2011).

Outro aspecto sobre os representantes do gênero *Trichoderma* é que o conhecimento de sua variabilidade genética pode auxiliar na identificação, monitoramento e seleção de isolados a serem utilizados no controle biológico e/ou na produção de compostos de interesse industrial (Consolo et al., 2012). Dentre os marcadores moleculares conhecidos e capazes de revelar polimorfismo entre indivíduos geneticamente relacionados, têm-se o IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) e o REMAP (*Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*) (Kalendar et al., 1999), que são baseados em retrotransposons. Esses marcadores têm sido utilizados para se avaliar a variabilidade genética intraespecífica e interespecíes de fungos (Santana et al., 2012; Santana et al., 2013; Queiroz et al., 2014; Santos et al., 2016, Goldfarb et al., 2016). No entanto, marcadores IRAP e REMAP ainda não foram relatados em literatura para a seleção

de isolados estreitamente relacionados, a fim de facilitar no monitoramento e seleção de isolados para posterior identificação de espécies.

Assim, considerando que: (i) a seringueira é a principal fonte de borracha natural (Zhu et al., 2015), (ii) os métodos de controle de doenças da seringueira são em sua maioria químicos e de elevado custo (Le Guen et al., 2008), (iii) *Trichoderma* spp. endofíticos podem apresentar potencial para o biocontrole de fitopatógenos (Gazis & Chaverri, 2010; Chaverri et al., 2011) e (iv) há poucos estudos de prospecção de fungos endofíticos na seringueira, a identificação dos isolados de *Trichoderma* spp. endofíticos podem revelar novas informações sobre a biodiversidade, além de identificar espécies novas deste gênero.

2. Material e Métodos

2.1 Origem dos isolados endofíticos do gênero *Trichoderma*

Amostras de tecidos de *Hevea* spp. foram coletadas em duas Bacias hidrográficas da floresta amazônica brasileira, localizadas no estado do Acre e no Amazonas e o isolados foram obtidos de folhas, caules e raízes de plantas de *Hevea* spp. (Araújo et al., dados não publicados). Estes isolados fazem parte da Micoteca do Laboratório de Genética Molecular de Fungos - BIOAGRO - Campus UFV - Viçosa/MG (Brasil).

2.2 Marcadores IRAP e REMAP utilizados na triagem dos isolados

Um total de 38 isolados de *Trichoderma* spp. foram submetidos a triagem utilizando os marcadores moleculares IRAP e REMAP (Tabela 1).

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR para as análises de IRAP e REMAP de isolados endofíticos do gênero *Trichoderma*.

Técnica	Oligonucleotídeo iniciador	Sequência (5' → 3')	Referência
IRAP	CLIRAP2	AATAACGTCTCGGCCTTC AG	Santana <i>et al.</i> , 2013
	CLIRAP4	CTTTTGACGAGGCCATGC	Santos <i>et al.</i> , 2012
REMAP	CLIRAP4	CTTTTGACGAGGCCATGC	Santos <i>et al.</i> , 2012
	MS1	GGCGGCGGCGGCGGCGGC GGCT	Santana <i>et al.</i> , 2012

Os isolados fúngicos foram crescidos em meio BDA, por cinco dias, e o DNA foi extraído usando o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison USA) de acordo com as especificações do fabricante. A reação para a PCR (reação em cadeia da polimerase) foi realizada para um volume final de 25 µL, contendo 5 µL do tampão Colorless Go Taq® Flexi Buffer [5x] (Promega, Madison USA); 2,5 µL de MgCl₂ [25 mM] (Promega, Madison USA); 1,0 µL de dNTPs [2,5 mM cada dNTP]; 1,0 µL do oligonucleotídeo senso [5 µM]; 1,0 µL do oligonucleotídeo reverso [5 µM]; 0,20 µL de Go Taq® DNA Polymerase [1U/µL] (Promega, Madison

USA); 5 µL de DNA genômico (9 ng/µL) e 9,30 µL de água ultrapura. A amplificação foi realizada usando o termociclador PTC-100 MJ Research, com desnaturação inicial de 6 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C e 2 min a 72 °C, sendo que após os 6 ciclos iniciais foram adicionados mais 24 ciclos e a cada 6 ciclos eram somados 30 s ao tempo de extensão, com extensão final de 10 min a 72 °C (Santana et al., 2013).

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5 % (m/v) contendo brometo de etídeo (0,2 µg/mL) em tampão TBE 1X. As bandas amplificadas referentes a cada combinação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram classificadas com número um (presença) ou zero (ausência). A reprodutibilidade dos perfis de bandas foi testada duas vezes com o DNA de todos os isolados utilizados para confirmação das mesmas. Somente bandas reprodutíveis foram utilizadas nas análises. O número de *locus* amplificados e o percentual de polimorfismo foram calculados. Um dedrograma (com bootstrap de 1000 replicatas) foi construído pelo método de agrupamento não ponderado (UPGMA) usando o *pvclust* contido no pacote R versão 3.3.2 (R development Core Team, 2013).

2.3 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

O material fúngico para extração de DNA foi obtido a partir de culturas cultivadas em meio BDA nas condições descritas anteriormente, após cinco dias de crescimento. O DNA foi extraído usando o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison USA).

Para a identificação molecular dos isolados foram amplificadas a região gênica do espaçador interno transcrito (ITS do rDNA); a região gênica que codifica o fator de elongação 1-alfa da tradução (TEF1- α); a região parcial do gene da subunidade alfa da *actina* (ACT); e a região que codifica para a subunidade maior da RNA polimerase II (RPB2). Para as amplificações destas regiões foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 (White et al., 1990); TEF1-728F e TEF1LLE rev (Carbone & Kohn, 1999; Jaklitsch et al., 2005); Triact1 e Triact2 (Samuels et al., 2006); e fRPB2-5f1 e fRPB2-7cR (Liu et al., 1999), listados na Tabela 2. A PCR foi realizada com de acordo com as condições descritas na Tabela 2. A reação de amplificação foi realizada em volume final de 25 µL contendo 5 µL do tampão Colorless Go Taq® Flexi Buffer [5x] (Promega, Madison USA); 2,5 µL de

MgCl₂ [25 mM] (Promega, Madison USA); 1,0 µL de dNTPs [2,5 mM cada dNTP]; 1,0 µL do oligonucleotídeo senso [5 µM]; 1,0 µL do oligonucleotídeo reverso [5 µM]; 0,25 µL de Go Taq® DNA Polymerase [5 U/µL] (Promega, Madison USA), 5 µL de DNA genômico [15 ng/µL] e 9,25 µL de água ultrapura, com algumas alterações para cada oligonucleotídeo. Após a amplificação, os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2 %, corados com brometo de etídeo e analisados.

Os produtos da PCR foram purificados e sequenciados na empresa Macrogen, localizada na Coreia do Sul (<http://dna.macrogen.com>). As sequências obtidas foram editadas, alinhadas e corrigidas manualmente, utilizando o software DNA Base Sequence Assembler v3.x 2012 (Heracle BioSoft SRL Romania, <http://www.DnaBaser.com>). As sequências consenso foram comparadas com o banco de dados GenBank usando o algoritmo para o alinhamento local de sequências nucleotídicas (Blastn) (Altschul et al., 1990) e *TrichoBLAST* (Kopchinskiy et al., 2005).

Tabela 2. Genes/locus utilizados na análise filogenética de fungos do gênero *Trichoderma* com os respectivos oligonucleotídeos iniciadores e as condições de amplificação da PCR.

Gene/locus	Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência (5' → 3')	Condições de amplificação	Referências dos oligonucleotídeos
ITS	ITS1 ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	95 °C: 3 min; (95 °C 1 min, 51 °C, 1 min, 72 °C, 1 min) x 36 ciclos; 72 °C, 7 min, mantido no final a 4 °C	White <i>et al.</i> , 1990 White <i>et al.</i> , 1990
TEF1- α	TEF1-728F TEF1LLE rev	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG AACTTGCAGGCAATGTGG	95 °C: 3 min; (95 °C 1 min, 61 °C, 1 min, 72 °C, 1 min) x 36 ciclos; 72 °C, 7 min, mantido no final a 4 °C	Carbone and Kohn, 1999 Jaklitsch <i>et al.</i> , 2005
ACT	Triact1 Triact2	TGGCACCACACCTTCTACAATGA TCTCCTTCTGCATACGGTCGGA	95 °C: 3 min; (95 °C 1 min, 54 °C, 1 min, 72 °C, 1 min) x 36 ciclos; 72 °C, 7 min, mantido no final a 4 °C	Samuels <i>et al.</i> , 2006 Samuels <i>et al.</i> , 2006
RPB2	fRPB2-5F fRPB2-7cR	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT	95 °C: 2 min; (95 °C 1 min, 52 °C, 1 min, com aumento de 0,2 °C por segundo para 72 °C, 72 °C, 1 min) x 36 ciclos; 72 °C, 7 min, mantido no final a 4 °C	Liu <i>et al.</i> , 1999 Liu <i>et al.</i> , 1999

2.4 Análise filogenética

As sequências obtidas pelo sequenciamento foram alinhadas no software MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 (Tamura et al., 2013). O arquivo NEXUS foi intercalado usando o software Paup 4b10 (Swofford et al., 2001) para avaliar a possibilidade de concatenar o conjunto dos dados obtidos a partir das sequências de ITS, TEF1- α , ACT e RPB2. A análise filogenética individual da região ITS do rDNA e a análise concatenada/multilocus das sequências de ITS, TEF1- α , ACT e RPB2 foram realizadas por meio da Inferência Bayesiana utilizando o programa MrBayes 3.2.1 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), sendo que previamente o melhor modelo evolutivo foi escolhido para cada partição (gene ou locus) usando o programa MrModeltest v2.3 (Nylander, 2004). O modelo evolutivo escolhido para a região ITS e ACT foi o GTR+I+G e a proporção de sítios invariáveis foi 48,44% para ITS e 60,93 para a região parcial do gene da actina. Por outro lado, o modelo evolutivo escolhido para a região gênica que codifica o fator de alongação 1-alfa da tradução (TEF1- α) foi o HKY+I+G e a proporção de sítios invariáveis foi 0,3691. O modelo evolutivo para a sequência do gene da subunidade maior da RNA polimerase II (RPB2) foi o SYM+G, mas sem a presença de sítios invariáveis. O número de caracteres utilizados na análise filogenética concatenada foi de 2427, sendo os valores referentes a cada partição (gene ou locus) indicados: ITS=535; TEF1- α = 433; ACT=673 e RPB2=786. Duas corridas independentes com quatro cadeias Markovianas Monte Carlo (MCMC) foram rodadas por 10.000.000 de gerações e as árvores foram amostradas e retidas a cada 1000^a geração. As primeiras amostras (1.000.000) de árvores foram descartadas na fase de *burnin* e as árvores permanentes sumarizadas para gerar uma árvore consenso da maioria. Os isolados obtidos neste estudo e suas respectivas sequências serão depositadas no GenBank estão representados na Tabela 3.

Os ramos das árvores cujos valores de probabilidade à *posteriori* estavam abaixo de 95 % foram omitidos. O motivo para tal é que valores abaixo de 95 % de probabilidade indicam uma baixa confiabilidade dos dados com pouco suporte estatístico (Harada et al., 1995; Rannala & Yang, 1996).

O alinhamento de sequências concatenadas da região ITS, TEF1- α , ACT e RPB2 foram manualmente ajustados na realização da Inferência Bayesiana e continha 83 sequências de espécies do gênero *Trichoderma*, sendo 30 sequências dos isolados deste estudo e 53 sequências de isolados obtidos do GenBank (Tabela 3).

Tabela 3. Fungos do gênero *Trichoderma* que foram utilizados neste trabalho.

Espécie	Código do isolado	Hospedeiro	País de origem	Código de acesso no GenBank			
				ITS	ACT	TEF	RPB2
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	3F13C-AC	<i>H. guianensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma ovalisporum</i>	4F9R-AC	<i>H. guianensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.VIC 44363	14F5R-AM	<i>H.brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.VIC 44363	15F5R-AM	<i>H.brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.VIC 44363	17F5R-AM	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma erinaceum</i>	20F5C-AM	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	21F13C-AC	<i>H.brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.VIC 44364	22F20C-AC	<i>H.brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i>	23F18C-AC	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	24F6C-AM	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	25F1C-AM	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma ovalisporum</i>	26F9R-AC	<i>H.guianensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.VIC 44363	57F5R-AM	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	58F6C-AM	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma virens</i>	84F15C-AM	<i>H.brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	245F13C-AC	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i>	247F12R-AC	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	265F6C-AM	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.VIC 44361	432F8C-AM	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma ovalisporum</i>	508F9R-AC	<i>H. guianensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i>	518F1C-AM	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-

Siglas referentes aos códigos dos isolados: CBS = Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; C.P.K. = Collection of C.P. Kubicek, Technische Universität, Abteilung für Mikrobielle Biochemie, Vienna; DAOM = Canadian Collection of Fungal Cultures, Ottawa, Canada; G.J.S., TR = Culture collection of the United States Department of Agriculture, Systematic Botany and Mycology Lab, Beltsville, MD U.S.A. (BPI); DIS refers to CABI-Bioscience, Ascot, cultures held by G.J.S. Código * F-AC (Folha/Acre), C-AC (Caule/Acre), R-AC (Caule/Acre); F-AM (Folha/Amazonas), C-AM (Folha/Amazonas), R-AM (Folha/Amazonas).

Tabela 3. Continuação

<i>Trichoderma harzianum</i>	549F18C-AC	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma spirale</i>	597F2C-AC	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma erinaceum</i>	610F5C-AM	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	619F6C-AM	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44362	762F17F-AC	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44362	763F25F-AM	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44362	764F2C-AM	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i>	765F5C-AM	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	815F11R-AM	<i>H. brasiliensis</i>	Brasil	-	-	-	-
<i>Trichoderma ovalisporum</i>	DIS 172i	-	Brasil	DQ323438.1	DQ328611.1	DQ288999.1	FJ442701.1
<i>Trichoderma asperellum</i>	GJS 09-981	-	Peru	-	GU198249.1	GU198233.1	GU198264.1
<i>Trichoderma brevicompactum</i>	CBS 112443	-	Papua New Guinea	EU330943.1	-	EU338281.1	EU338319.1
<i>Trichoderma brevicompactum</i>	CBS 112447	-	-	EU330942.1	-	EU338300.1	EU338318.1
<i>Trichoderma rogersonii</i>	CBS 119503	-	Viena Austria	FJ860826.1	-	FJ860690.1	FJ860583.1
<i>Trichoderma valdunense</i>	CBS 120923	-	Viena Austri	FJ860863.1	-	FJ860717.1	FJ860605.1
<i>Trichoderma atroviride</i>	CBS 142.95	-	Slovenia	AY380906.1	-	AY376051.1	EU341801.1
<i>Trichoderma harzianum</i>	CBS 226.95	-	-	AY605713.1	FJ442567.1	AY605833.1	AF545549.1
<i>Trichoderma turrialbense</i>	CBS 112445	-	Costa Rica	NR138448.1	JN133613.1	EU338284.1	EU338321.1
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	DAOM222105	-	-	AY380901.1	DQ379012.1	AY376042.1	EU341810.1
<i>Trichoderma atroviride</i>	DAOM222144	-	-	AF456916.1	-	AF456889.1	FJ442754.1
<i>Trichoderma erinaceum</i>	DAOM230019	-	Thailand	DQ083009.1	DQ111969.1	AY750880.1	KJ842151.1

Siglas referentes aos códigos dos isolados: CBS = Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; C.P.K. = Collection of C.P. Kubicek, Technische Universitat, Abteilung für Mikrobielle Biochemie, Vienna; DAOM = Canadian Collection of Fungal Cultures, Ottawa, Canada; G.J.S., TR = Culture collection of the United States Department of Agriculture, Systematic Botany and Mycology Lab, Beltsville, MD U.S.A. (BPI); DIS refers to CABI-Bioscience, Ascot, cultures held by G.J.S. Código * F-AC (Folha/Acre), C-AC (Caule/Acre), R-AC (Caule/Acre); F-AM (Folha/Amazonas), C-AM (Folha/Amazonas), R-AM (Folha/Amazonas).

Tabela 3. Continuação

<i>Trichoderma koningiopsis</i>	DAOM230813	-	-	FJ442666.1	FJ442595.1	FJ463278.1	FJ442780.1
<i>Trichoderma spirale</i>	DIS 114I	-	Beltisville USA	-	FJ442811.1	FJ463290.1	FJ442753.1
<i>Trichoderma spirale</i>	DIS 151E	-	Beltisville USA	FJ442230.1	FJ442819.1	FJ463374.1	FJ442766.1
<i>Trichoderma virens</i>	DIS 162	-	Beltisville USA	FJ442669.1	FJ442588.1	FJ463367.1	FJ442696.1
<i>Trichoderma lentiforme</i>	DIS 167c	-	-	FJ442269.1	FJ442564.1	FJ463309.1	FJ442689.1
<i>Trichoderma lentiforme</i>	DIS 169c	-	Beltisville USA	FJ442616.1	FJ442442.1	-	FJ442707.1
<i>Trichoderma ovalisporum</i>	DIS 172H	-	Beltisville USA	AY380896.1	AY376670.1	AY387660.1	FJ442741.1
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	DIS 205f	-	-	DQ323419.1	DQ328609.1	DQ288993.1	FJ442747.1
<i>Trichoderma lentiforme</i>	DIS 218E	-	Beltisville USA	FJ442220.1	FJ442449.1	FJ463310.1	FJ442793.1
<i>Trichoderma endophyticum</i>	DIS 218F	-	-	FJ442246.1	FJ442450.1	FJ463326.1	FJ442722.1
<i>Trichoderma harzianum</i>	DIS 219F	-	-	FJ442247.1	FJ442452.1	FJ463325.1	FJ442797.1
<i>Trichoderma endophyticum</i>	DIS 220J	-	Beltisville USA	FJ442254.1	FJ442453.1	FJ463330.1	FJ442690.1
<i>Trichoderma endophyticum</i>	DIS 221d	-	Beltisville USA	FJ442248.1	FJ442455.1	FJ463389.1	FJ442794.1
<i>Trichoderma virens</i>	DIS 328A	-	Beltisville USA	FJ442670.1	FJ442590.1	FJ463363.1	FJ442738.1
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	DIS 339c	-	Beltisville USA	DQ313142.1	DQ323447.1	DQ284968.1	FJ442784.1
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	DIS 374A	-	Beltisville USA	FJ442213.1	FJ442597.1	FJ463288.1	FJ442730.1
<i>Trichoderma harzianum</i>	DIS 55J	-	Beltisville USA	FJ442610.1	FJ442479.1	FJ463294.1	-
<i>Trichoderma erinaceum</i>	DIS 7	-	Peru	DQ109534.1	DQ111968.1	DQ109547	-
<i>Trichoderma ovalisporum</i>	DIS 70A	-	Beltisville USA	AY380897.1	AY376671.1	AY376037.1	FJ442742.1
<i>Trichoderma lentiforme</i>	DIS 94D	-	Beltisville USA	FJ442615.1	FJ442483.1	FJ463379.1	FJ442749.1
<i>Trichoderma ovalisporum</i>	DIS 203c	-	Brasil	DQ315458.1	DQ328608.1	DQ307540.1	FJ442796.1

Siglas referentes aos códigos dos isolados: CBS = Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; C.P.K. = Collection of C.P. Kubicek, Technische Universität, Abteilung für Mikrobielle Biochemie, Vienna; DAOM = Canadian Collection of Fungal Cultures, Ottawa, Canada; G.J.S., TR = Culture collection of the United States Department of Agriculture, Systematic Botany and Mycology Lab, Beltisville, MD U.S.A. (BPI); DIS refers to CABI-Bioscience, Ascot, cultures held by G.J.S. Código * F-AC (Folha/Acre), C-AC (Caule/Acre), R-AC (Caule/Acre); F-AM (Folha/Amazonas), C-AM (Folha/Amazonas), R-AM (Folha/Amazonas).

Tabela 3. Continuação

<i>Trichoderma koningiopsis</i>	GJS 01-204	-	-	FJ442648.1	FJ442545.1	FJ463267.1	GU198259.1
<i>Trichoderma asperellum</i>	GJS 01-292	-	Saudi Arabia	-	GU198244.1	GU198229.1	-
<i>Trichoderma erinaceum</i>	GJS 02-103	-	Ottawa Canada	KR873100.1	KR873095.1	KR873097.1	KR873099.1
<i>Trichoderma asperellum</i>	GJS 02-63	-	Cameroon	-	GU198245.1	GU198230.1	GU198260.1
<i>Trichoderma ovalisporum</i>	GJS 04-113	-	-	FJ442614.1	FJ442808.1	FJ463281.1	FJ442781.1
<i>Trichoderma rogersonii</i>	GJS 04-157	-	Beltisville USA	DQ323415.1	DQ333565.1	DQ307558.1	JN133566.1
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	GJS 04-199	-	-	FJ442654.1	FJ442546.1	FJ463268.1	FJ442789.1
<i>Trichoderma arundinaceum</i>	GJS 05-182	-	Iran	EU330929.1	-	EU338304.1	EU338276.1
<i>Trichoderma harzianum</i>	GJS 06-94	-	-	FJ442277.1	FJ442517.1	FJ463318.1	FJ442800.1
<i>Trichoderma asperellum</i>	GJS 09-981	-	Peru	-	GU198249.1	GU198233.1	GU198264.1
<i>Trichoderma asperellum</i>	GJS 06-294	-	Nigeria	GU198307.1	GU198251.1	GU198235.1	GU198266.1
<i>Trichoderma atroviride</i>	TRS12	-	Poland	KJ786737.1	-	KJ786818.1	KP009029.1
<i>Trichoderma arundinaceum</i>	GJS 90-2	-	Beltisville USA	EU330931.1	-	EU338278.1	EU338306.1
<i>Trichoderma protudens</i>	DIS 119F	-	India	EU330946.1	-	EU338289.1	EU338322.1
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	LESF 212	-	Brasil	HQ608031.2	-	KT278985.1	KT278914.1
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	LESF360	-	Brasil	KT278884.1	-	KT278986.1	KT278916.1
<i>Trichoderma inhamatum</i>	CBS 273.78	-	Colombia	NR134378.1	FJ442561.1	AF348099.1	FJ442725.1
<i>Trichoderma harzianum</i>	LESF555	-	Brasil	KT278904.1	-	KT279018.1	KT278950.1
<i>Trichoderma spirale</i>	LESF329	-	Brasil	KT278877.1	-	KT279035.1	KT278969.1
<i>Trichoderma virens</i>	LESF004	-	Brasil	KT278851.1	-	KT278996.1	KT278928.1

Siglas referentes aos códigos dos isolados: CBS = Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; C.P.K. = Collection of C.P. Kubicek, Technische Universität, Abteilung für Mikrobielle Biochemie, Vienna; DAOM = Canadian Collection of Fungal Cultures, Ottawa, Canada; G.J.S., TR = Culture collection of the United States Department of Agriculture, Systematic Botany and Mycology Lab, Beltisville, MD U.S.A. (BPI); DIS refers to CABI-Bioscience, Ascot, cultures held by G.J.S. Código * F-AC (Folha/Acre), C-AC (Caule/Acre), R-AC (Caule/Acre); F-AM (Folha/Amazonas), C-AM (Folha/Amazonas), R-AM (Folha/Amazonas).

2.5 Caracterização morfológica das quatro espécies propostas como novas

A caracterização morfológica foi realizada por meio das observações a partir do método de microcultivo. As imagens das estruturas reprodutivas dos isolados foram obtidas em Microscópio de Luz/Fluorescência Olympus (Modelo BX50 e BX53). Estas mesmas estruturas reprodutivas foram mensuradas fazendo uso do software ImageJ (Abramoff & Magalhaes, 2004). As características culturais foram baseadas nas observações do crescimento fúngico em placas contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA, infusão de batata, 200 g; glicose, 20 g; ágar, 17 g; água destilada até o volume de 1 L), meio Milho-Dextrose-Ágar (MDA, Sigma) e o meio Ágar Nutriente Sintético (ANS) (Nirenburg, 1976) incubadas por uma semana à $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em fotoperíodo de 12 horas de luz branca e 12 horas no escuro, em triplicata.

Para o ensaio da taxa de crescimento fúngico foi realizada a inoculação de discos fúngicos de 5 mm, em placas de Petri de 90 mm, contendo 20 mL de meio BDA, MDA ou ANS. As placas de Petri foram incubadas por 7 dias e o crescimento foi avaliado todos os dias. Foram realizadas triplicatas para cada meio de cultivo.

Um exemplar representativo de cada espécie proposta como nova foi depositado no Herbário da Universidade Federal de Viçosa (Herbarium VIC) e os isolados foram depositados na coleção de culturas da Universidade Federal de Viçosa, Coleção Octávio Almeida Drummond (COAD).

3. Resultados

3.1 Uso dos marcadores IRAP e REMAP para análise da variabilidade genética e triagem dos isolados do gênero *Trichoderma*

A análise envolveu o uso de duas diferentes técnicas de *fingerprinting* (IRAP e REMAP) baseadas em elementos transponíveis, a fim de se avaliar a variabilidade genética intraespecífica e interespecífica utilizando 38 isolados de *Trichoderma* spp. e fazer uma triagem dos isolados repetidos. Baseado na análise dos perfis eletroforéticos foram gerados 28 e 25 loci para IRAP e REMAP, respectivamente (Figura 1 e 2). Um total de 53 locos/par de oligonucleotídeos foi utilizado para a elaboração da matriz de dados utilizando a combinação das duas técnicas IRAP e REMAP, onde foram observados 100% de polimorfismo.

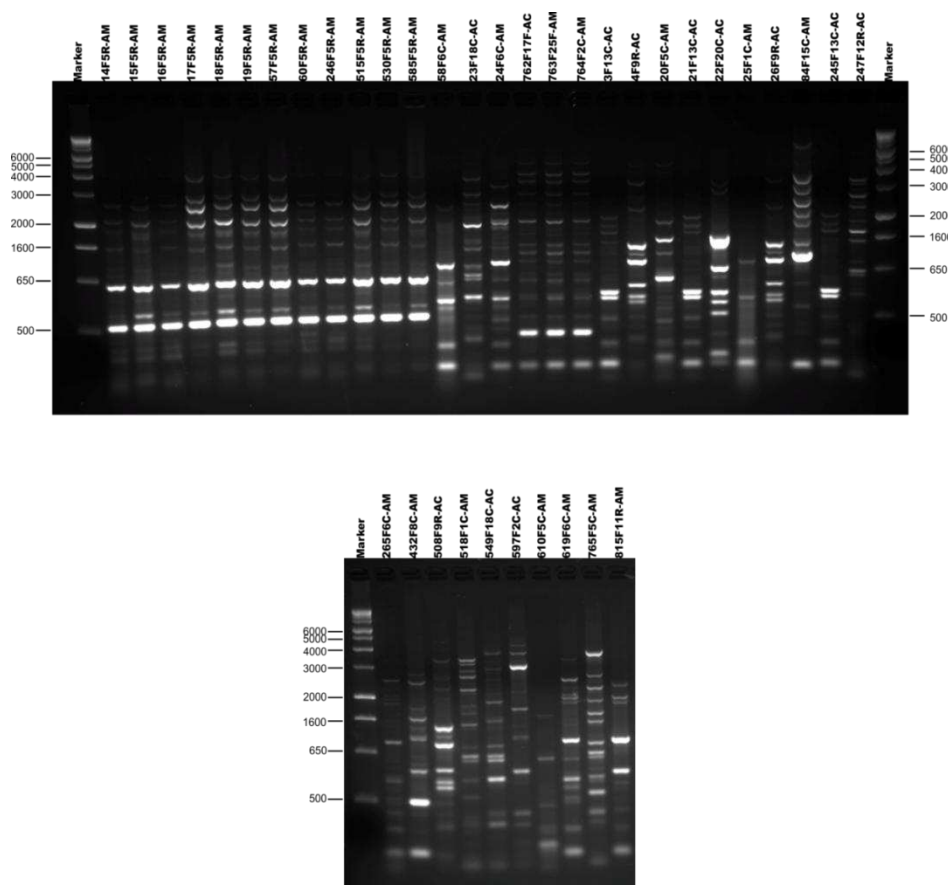


Figura 1. Perfil de bandas de produtos de PCR gerados a partir da técnica de IRAP de trinta e oito isolados de *Trichoderma* spp. O marcador de massa molecular utilizado foi o 1 Kb DNA Ladder (Promega, Madison USA).

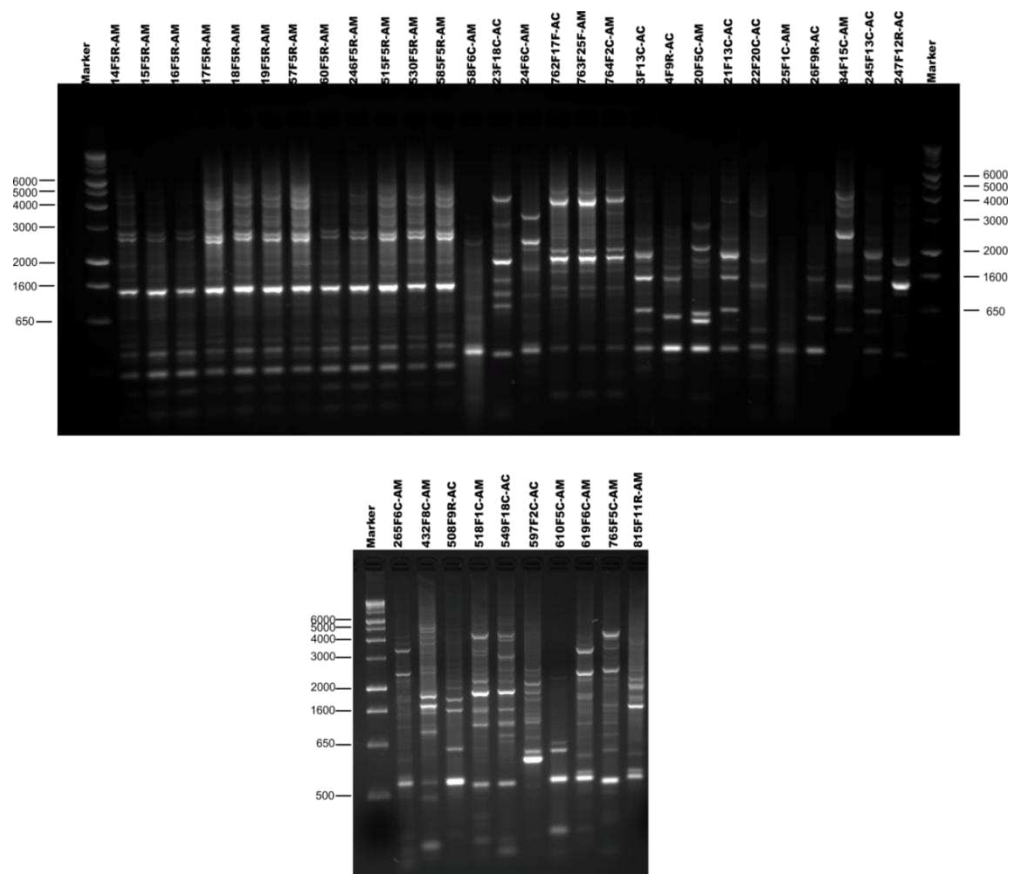


Figura 2. Perfil de bandas de produtos de PCR gerados a partir da técnica de REMAP de trinta e oito isolados de *Trichoderma* spp. O marcador de massa molecular utilizado foi o 1 Kb DNA Ladder (Promega, Madison USA).

Os agrupamentos observados no dendograma foram bem suportados com valores de bootstrap de 79 e 84 na formação de dois grupos principais grupo1 e grupo 2, respectivamente (Figura 3).

Os resultados das análises dos perfis de bandas, juntamente com as informações dos tecidos e locais de isolamento permitiram a eliminação de isolados que estavam repetidos. Foram considerados iguais os isolados que haviam sido retirados do mesmo tecido e apresentavam os perfis de bandas idênticos para os dois marcadores.

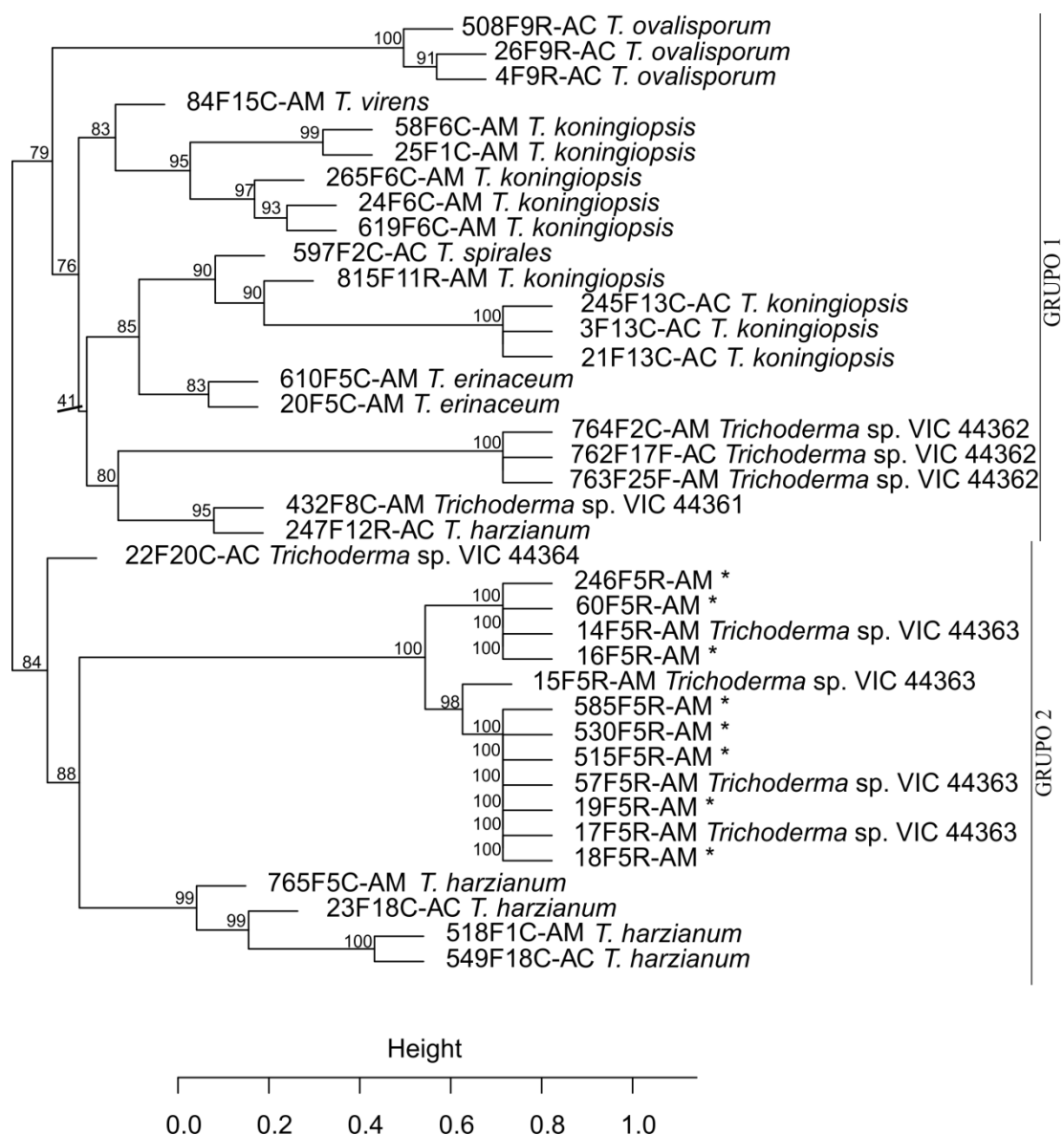


Figura 3. Dendograma de distância genética de trinta e oito isolados do gênero *Trichoderma*. A distância genética foi baseada nos *loci* obtidos por meio de IRAP e REMAP. Os valores de bootstrap foram obtidos com 1000 replicatas. O dendograma foi construído pelo método UPGMA. Os grupos estão representados como Grupo 1 e Grupo 2. * não estão na árvore filogenética.

O primeiro grupo observado no dendograma inclui 21 isolados provenientes tanto do estado do Acre como do Amazonas, oriundas de folhas, caules e raízes de seringueira (764F2C-AM, 762F17F-AC, 763F25F-AM, 247F12R-AC, 4F9R-AC, 508F9R-AC, 26F9F-AC 245F13C-AC, 3F13C-AC, 21F13C-AC, 20F5C-AM, 815F11R-AM, 432F8C-AM, 597F2C-AC, 619F6C-AM, 265F6C-AM, 24F6C-AM, 58F6C-AM, 25F1C-AM, 84F15C-AM e 610F5C-AM), sendo representados pelas espécies *T. koningiopsis*, *T. erinaceum*, *Trichoderma* sp. VIC 44361, *Trichoderma* sp. VIC 44362 e *T. ovalisporum*. Por outro lado, no segundo grupo foram agrupados 17 isolados oriundas de caules e raízes de seringueira (585F5R-AM, 530F5R-AM, 515F5R-AM, 246F5R-AM, 60F5R-AM, 57F5R-AM, 19F5R-AM, 18F5R-AM, 17F5R-AM, 16F5R-AM, 14F5R-AM, 15F5R-AM, 22F20C-AC, 518F1C-AM, 549F18C-AC, 765F5C-AM e 23F18C-AC), provenientes tanto do estado do Acre quanto do Amazonas, representados pelas espécies *Trichoderma* sp. VIC 44363, *Trichoderma* sp. VIC 44364, *T. harzianum*.

3.2 Análise Filogenética

A identificação molecular utilizando a análise concatenada neste estudo revelou dez diferentes espécies de *Trichoderma* representadas pelas espécies *T. erinaceum* (2 isolados); *T. koningiopsis* (9 isolados); *T. ovalisporum* (3 isolados); *T. harzianum* (5 isolados); *T. spirales* (1 isolado); *T. virens* (1 isolado); e quatro espécies novas propostas neste estudo. A identificação, origem e número de acesso no Genbank NCBI são mostrados na Tabela 3.

Neste estudo, as quatro novas espécies propostas são: *Trichoderma* sp. VIC 44361 e *Trichoderma* sp. VIC 44362, ambas relacionadas à *T. atroviride*; *Trichoderma* sp. VIC 44363, relacionada à *T. brevicompactum*; e *Trichoderma* sp. VIC 44364, relacionada a *T. rogersonii*. Todas as novas espécies apresentaram diferenças filogenéticas em relação às espécies já descritas (Figura 4).

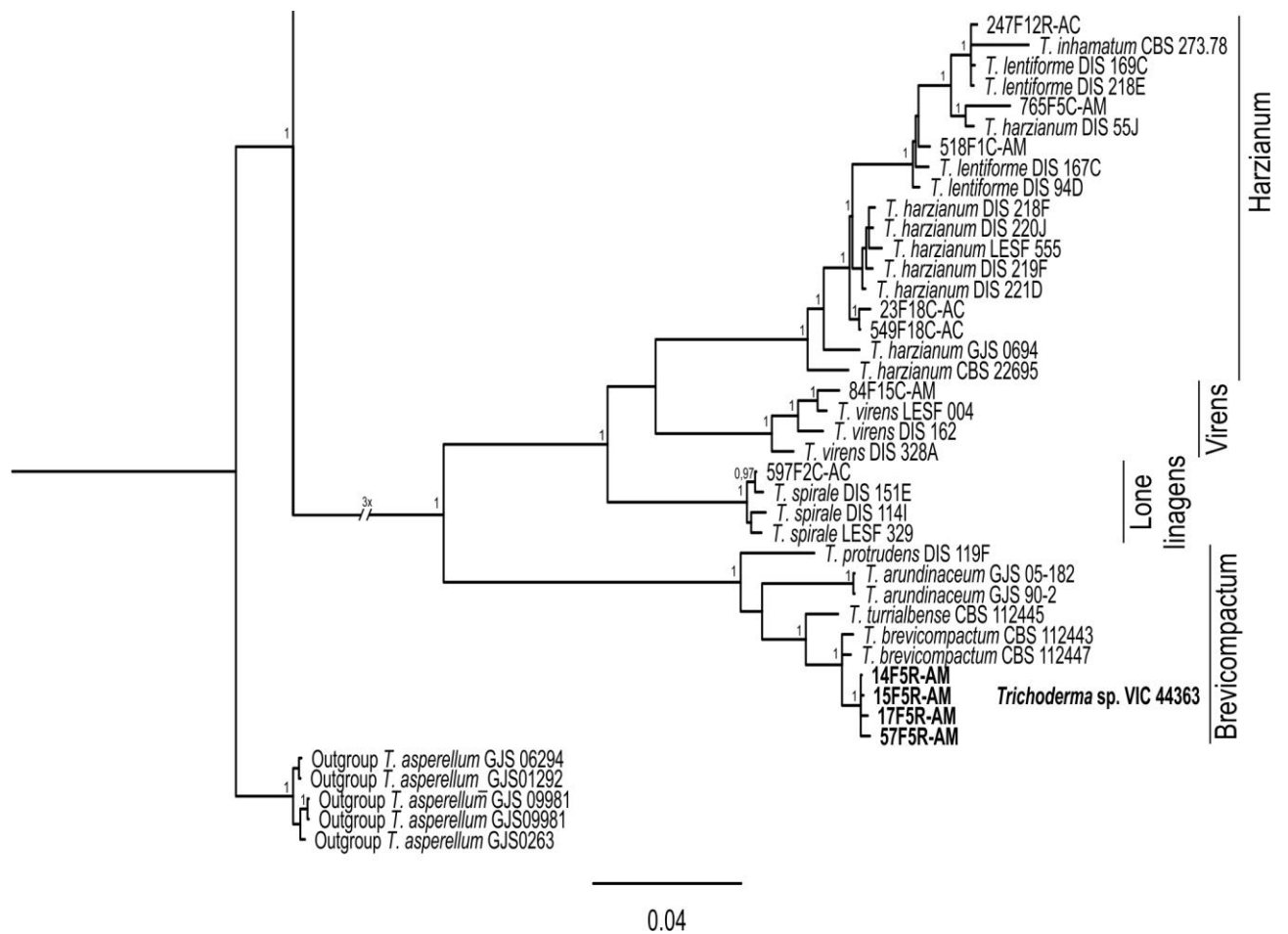


Figura 4. Continuação

A árvore filogenética obtida foi baseada na análise concatenada de sequências dos 30 isolados selecionados neste estudo e de 53 isolados do banco de dados. As espécies foram agrupadas em cinco clados: (i) clado Viride; (ii) clado Harzianum; (iii) clado *Lone lineages*; (iv) clado Virens; e (v) clado Brevicompectum. A maior parte dos clados foram altamente suportados com valores de probabilidade *à posteriori* próximo ou igual a 1,00 (Figura 4). O clado com o maior número e porcentagem de isolados foi o Viride com 19 isolados, representando 63,3%. O clado Harzianum com cinco isolados, representando 16,7%, e o clado Brevicompectum com quatro isolados representando 13,3%. Os clado *Lone lineages* e clado Virens apresentando um isolado cada, contribuíram com 3,3% no total.

Seis grupos de espécies foram distinguidos no clado Viride, com altos valores de probabilidade *à posteriori*. Um grupo com valores de probabilidade *à posteriori* igual à 1,00, contendo dois isolados de *T. erinaceum*. O segundo grupo, representado por isolados de *T. koningiopsis*, no entanto, apresentaram valores de probabilidade *à posteriori* inferiores a 0,95. O terceiro grupo com valores de probabilidade *à posteriori* igual à 1,00, contendo três isolados representados pela espécie *T. ovalisporum*. O quarto grupo representado pela nova espécie *Trichoderma* sp. VIC 44361, relacionada à espécie *T. atroviride*, com valores de probabilidade *à posteriori* igual à 1,00. O quinto grupo representado por três isolados descritos aqui como a nova espécie *Trichoderma* sp. VIC 44362, relacionada também à *T. atroviride*, com valores de probabilidade *à posteriori* igual à 1,00. Além destes cinco grupos, há também, outro grupo, dentro do clado Viride, que contém apenas um isolado que foi agrupado com a espécie de *T. rogersonii*, com valor de probabilidade *à posteriori* igual à 1,00, representando a nova espécie *Trichoderma* sp. VIC 44364.

Cinco isolados (23F18C-AC, 549F18C, 247F12R-AC, 765F5C-AM e 518F1C-AM) foram posicionados no clado Harzianum. No entanto, esse clado é representado por ‘espécie complexo’ (Chaverri et al., 2003; Druzhinina et al., 2010), necessitando assim de uma abordagem mais detalhada para a correta identificação destes isolados ao nível de espécie. Por outro lado, quatro isolados fazem parte do clado Brevicompectum e pertence à única espécie proposta como nova neste estudo. Os clados Viride e Brevicompectum, que contêm espécies novas foram bem suportados (probabilidade *à posteriori*, em geral, igual a 1,00). Os clados *Lone lineages* e clado Virens, também foram bem suportados com probabilidade *à posteriori* igual a 1,00, compostos por um único isolado cada.

3.3 Taxonomia

***Trichoderma* sp. VIC 44362**

Características da cultura: crescimento ótimo em todos os meios analisados a 25°C e crescimento limitado a 35°C. Em meio MDA o crescimento foi de 77,5 mm a 25°C, 70,5 - 72,5 mm a 30°C e 11,5-12,5 mm a 35°C, após 72 h (Tabela 4). Colônia hialina, delgada, floculosa, verde para verde amarelado (Figura 5). Nenhum pigmento notado em meio de cultura, aroma característico de coco. Clamidósporos numerosos, globosos, intercalares e terminais (Figura 5). Formação dos conídios notada após dois dias, verde escuros, com pústulas soltas, contorno irregular ou circular, arranjados separadamente, com formação de zonas concêntricas. Conidióforos formados nos eixos principais, longos e espessos com fiálides solitárias e emparelhadas, conidióforos curtos também presentes, com ramificações laterais com duas a três fiálides ou única célula em ângulos retos, ligeiramente inclinados ou curvados. Fiálides com tamanhos entre (- 4,0)8,0 - 8,0(- 12,0) x (2,0 -)3,0 - 3,0(- 4,0) µm, (n=30) (Tabela 4), ampuliformes, retas ou levemente curvadas para cima, com a parte mediana mais ampla. Conídio verde, liso, subgloboso ou oval, conídios variando de (2,0 -)3,0 - 3,0(4,0) x (2,0 -)3,0 - 3,0(4,0) µm, (n=30) (Tabela 4). Com crescimento atingindo 77,5 mm a 25 °C, 72,5 - 74,5 mm a 30°C e 11,5 - 12,5 mm a 35°C, após 72 h em meio BDA. A colônia ocupou a placa toda após 3 dias a 25°C, apresentando micélio denso e cotonoso. Em ANS, apresentou crescimento de 37,5 - 41,5 mm a 25°C, 46,5 - 48,5 mm a 30°C e 14,5 - 15,5 mm a 35°C, após 72 h (Tabela 4). A colônia ocupou a placa toda após 5 dias a 25°C. Colônia hialina e delgada. Não foi observado pigmento difuso no meio e nenhum odor notado. Clamidósporos notado após 2 dias. Formação de conídios observado após 2 dias, dispostos em várias zonas concêntricas espalhando-se do centro para as extremidades, tornando-se verde escuros e abundantes (Figura 5).

Habitat: Endofítico presentes em folhas e caules de árvores de *Hevea brasiliensis*.

Distribuição: Bacia amazônica, Brasil.

A ser proposto como holótipo: 763F25F-AM

Nota. *Trichoderma* sp. VIC 44362 é uma espécie tropical, endofítica, presentes em folhas e caules de *Hevea brasiliensis*. Pertencente ao clado Viride (Figura 5). *Trichoderma* sp. VIC 44362 apresenta numerosos clamidósporos, rápido crescimento, nenhum pigmento notado, produz odor parecido com cheiro de coco. Conídios subglobosos ou ovais, verdes, com tamanhos variando de (2,0 - 4,0) x (2,0 -

4,0). Comparado com *T. atroviride*, *Trichoderma* sp. VIC 44362 apresentou rápido crescimento em meio de cultura (MDA 77,5 mm, BDA 77,5 mm, ANS 37,5 - 41,5 mm).

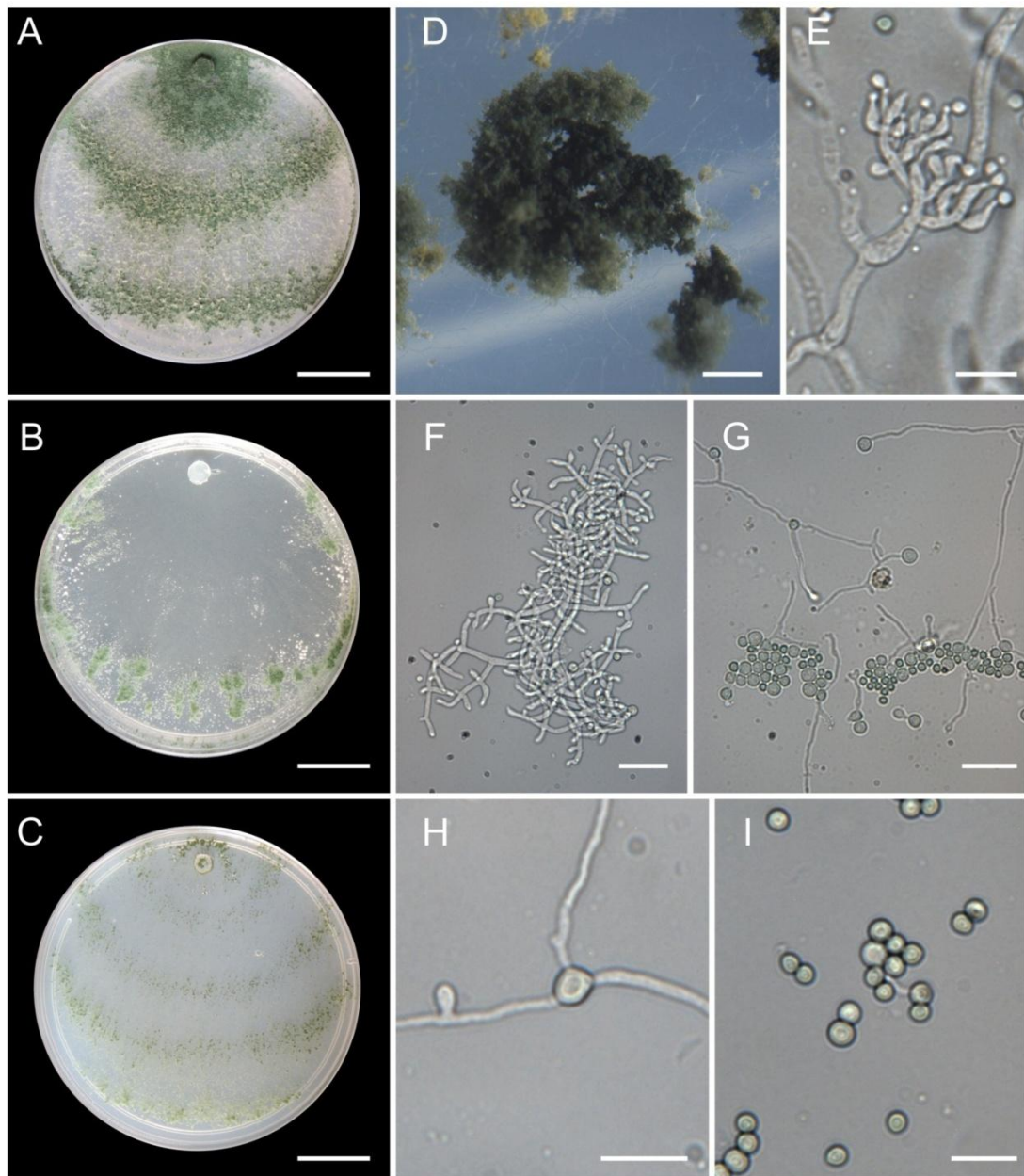


Figura 5. *Trichoderma* sp. VIC 44362 (A-I). Aparência da colônia (meios BDA, MDA e ANS, 7d, 25 °C) (A, B e C); Aparência de pústulas de conidiação em ANS (D); Conidióforos e fíalides (ANS) (E, F); Clamidósporos (G, H); Conídios (I). Barras de escala: A, B, C, = 20 mm, D = 0,5 mm, F, G = 20 µm, E, H, I = 10 µm.

***Trichoderma* sp. VIC 44361**

Características da cultura: crescimento ótimo a 25°C em meio MDA e BDA, crescimento limitado a 25°C em ANS. Em MDA o crescimento foi de 77,5 mm a 25°C, 60,5 - 62,5 mm a 30°C e 6,5 - 11,5 mm a 35°C, após 72 h (Tabela 4). Colônia hialina, delgada. Nenhum pigmento notado produz aroma parecido com coco. Clamidósporos abundantes. Produção de conídios notado após 2 dias, verde escuro, com pústulas soltas, contorno irregular ou circular, arranjos separadamente, com formação de zonas concêntricas (Figura 6). Conidióforos formados nos eixos principais, longos e espessos com fiálides solitárias e emparelhadas, conidióforos curtos também estão presentes, com ramificações laterais com 2 a 3 fiálides ou única célula em ângulos reto, ligeiramente inclinados ou curvados (Figura 6). Fiálides com tamanhos entre (3,0 -) 6,0 - 6,0 (- 13,0) x (2,0 -) 3,0 - 3,0(- 4,0) μ m, (n=30) (Tabela 4), ampuliformes, retas ou levemente curvadas para cima, com a parte mediana mais ampla. Conídio verde, liso, subgloboso ou oval, variando de (2,0 -) 3,0 - 3,0(4,0) x (3,0-) 3,0 - 3,0 (4,0) μ m, (n=30) (Tabela 4). Com 77,5 mm a 25°C, 60,5 - 67,5 mm a 30°C e 6,5 - 11,5 mm a 35°C após 72 h em BDA (Tabela 4). O micélio preencheu a placa toda após 3 dias a 25°C, micélio denso e cotonoso. Em ANS, o crescimento observado foi de 3,5 - 7,5 mm a 25°C, 19,5 - 22,5 mm a 30°C e 0,5 - 1,5 mm a 35°C após 72 h. A colônia ocupou a placa toda após 7 dias a 25°C. Colônia hialina e delgada. Formação de conídios notada após 2 dias, dispostos em várias zonas concêntricas espalhando-se do centro para fora, tornando-se verde escuros.

Habitat: Endofítico presente em caules de *Hevea brasiliensis*.

Distribution: Bacia amazônica, Brasil.

A ser proposto como holótipo: 432F8C-AM

Nota. *Trichoderma* sp. VIC 44361 é uma espécie tropical, endofítica, presente em caules de *H. brasiliensis*, pertencente ao clado Viride (Figura 6). *Trichoderma* sp. VIC 44361 apresenta numerosos clamidósporos, rápido crescimento, nenhum pigmento notado, produz aroma característico com odor de coco. Conídios subgloboso ou oval, conídio verde (2,0 - 4,0 x 3,0 - 4,0). Comparado com *T. atroviride*, *Trichoderma* sp. VIC 44361 mostrou rápido crescimento em meio de cultura (MDA 77,5 mm, BDA 77,5 mm) e baixo crescimento em meio ANS (3,5 - 7,5 mm).

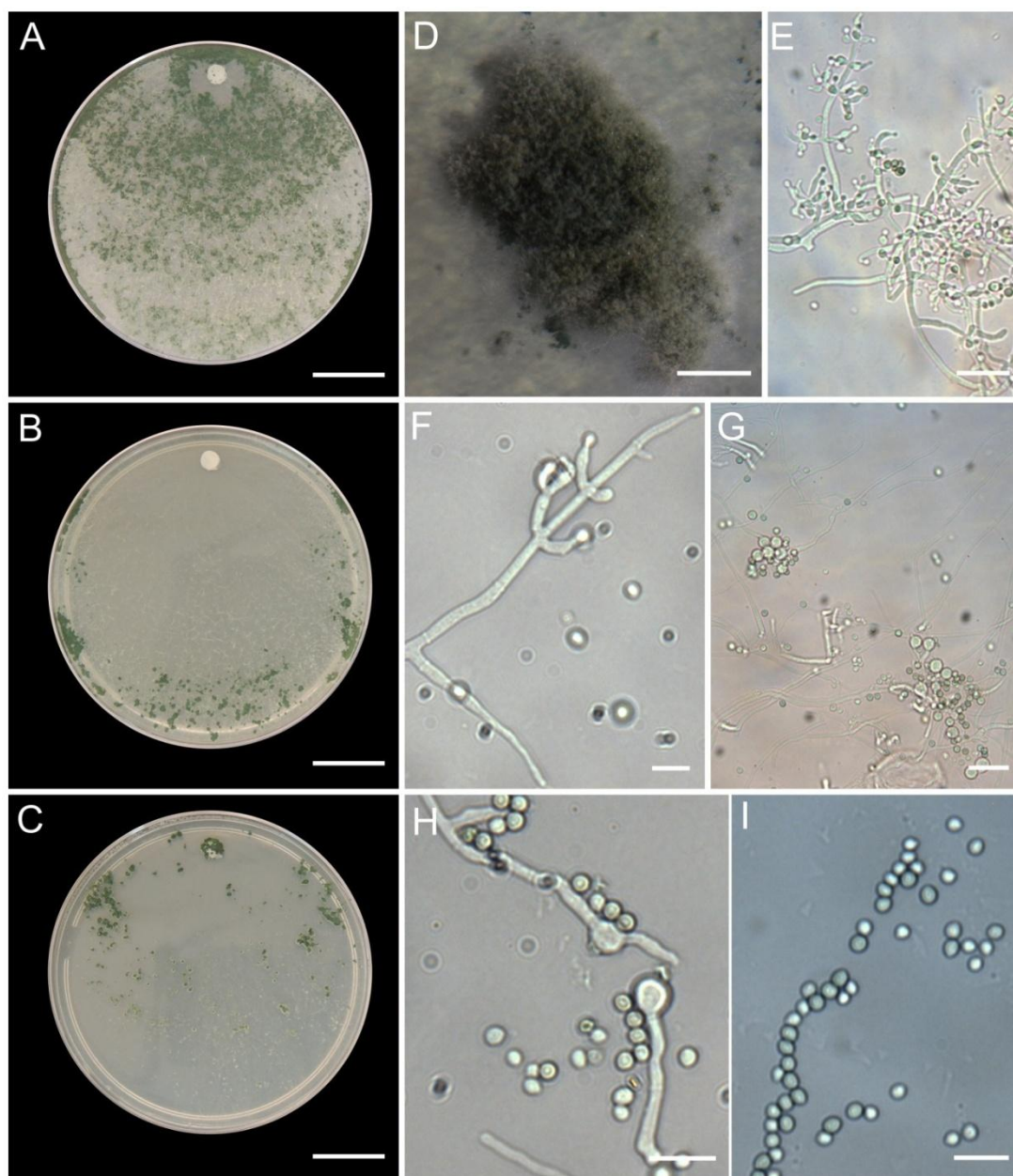


Figura 6. *Trichoderma* sp. VIC 44361 (A-I). Aparência da colônia (meios BDA, MDA e ANS, 7d, 25 °C) (A, B e C); Aparência de pústulas de conidiação em ANS (D); Conidióforos e fiálides (ANS) (E, F); Agrupamento de clamidósporo-like (G); Clamidósporos (H); Conídios (I). Barras de escala: A, B, C, = 20 mm, D = 0,5 mm, E, G = 20 μm, F, H, I = 10 μm.

***Trichoderma* sp. VIC 44363**

Características da cultura: crescimento ótimo em todos os meios a 30°C. Em MDA, apresentou crescimento de 59,5 - 61,5 mm a 25°C, 77,5 mm a 30°C e 7,5 - 10,5 mm a 35°C, após 72 h (Tabela 4). Colônia hialina, delgada. Nenhum pigmento foi observado nos meios de cultura, sem odor. Clamidósporos próximos as regiões esporuladas, globosos, terminais e intercalares. Produção de conídios notado após 1 dia, verde escuro, formando pústulas soltas e irregulares, dispostas em várias zonas concêntricas, separadas. Conidióforos formando eixos principais grandes, parecido com “*Pachybasium*” (Figura 7). Fiálides com (5,0 - 8,0 - 9,0(- 16,0) x (2,0 - 3,0 - 3,0(- 4,0) μ m, (n=30) (Tabela 4), ampuliformes. Conídios verdes, lisos, subglobosos ou ovais, com tamanhos variando de (2,0-)3,0 - 3,0(4,0) x (2,0-)3,0-3,0(4,0) μ m, (n=30) (Tabela 4). Em BDA, apresentou 64,5 - 66,5 mm a 25°C, 67,5 - 74,5 mm a 30°C e 13,5 - 16,5 mm a 35°C, após 72 h (Tabela 4). O micélio cresceu na placa toda após 4 dias a 25°C, com micélio denso. Em ANS, apresentou 46,5 - 50,5 mm a 25°C, 50,5 - 54,5 mm a 30°C e 4,5 - 7,5 mm a 35°C, após 72 h (Tabela 4). O micélio preencheu a placa toda após 7 dias a 25°C. Colônia hialina e fina. Nenhum pigmento observado em meio de cultura e nenhum odor notado. Clamidósporos notado após 1 dia, numerosos, terminal e intercalados, globosos. Produção de conídios notado após 2 dias, dispostos em várias zonas concêntricas espalhando-se do centro para fora, tornando-se verde escuro.

Habitat: Endofítico, presentes em raízes de árvores de *Hevea* spp.

Distribuição: Bacia amazônica, Brasil.

A ser proposto como holótipo: 17F5R-AM

Nota. *Trichoderma* sp. VIC 44363 é uma espécie tropical, endofítica, presente em raízes de *Hevea brasiliensis*. Pertence ao clado *Brevicompactum* (Figura 7). *Trichoderma* sp. VIC 44363 apresenta numerosos clamidósporos com formato aglomerado, rápido crescimento, nenhum odor notado e nenhum pigmento observado. Conídios verdes, ovais ou subglobosos (2,0 - 4,0 x 2,0 - 4,0). *Trichoderma* sp. VIC 44363 apresenta ótimo crescimento a 30°C em todos os meios (MDA 77,5 mm, BDA 67,5 - 74,5 mm e ANS 50,5 - 54,5 mm, após 72 h).

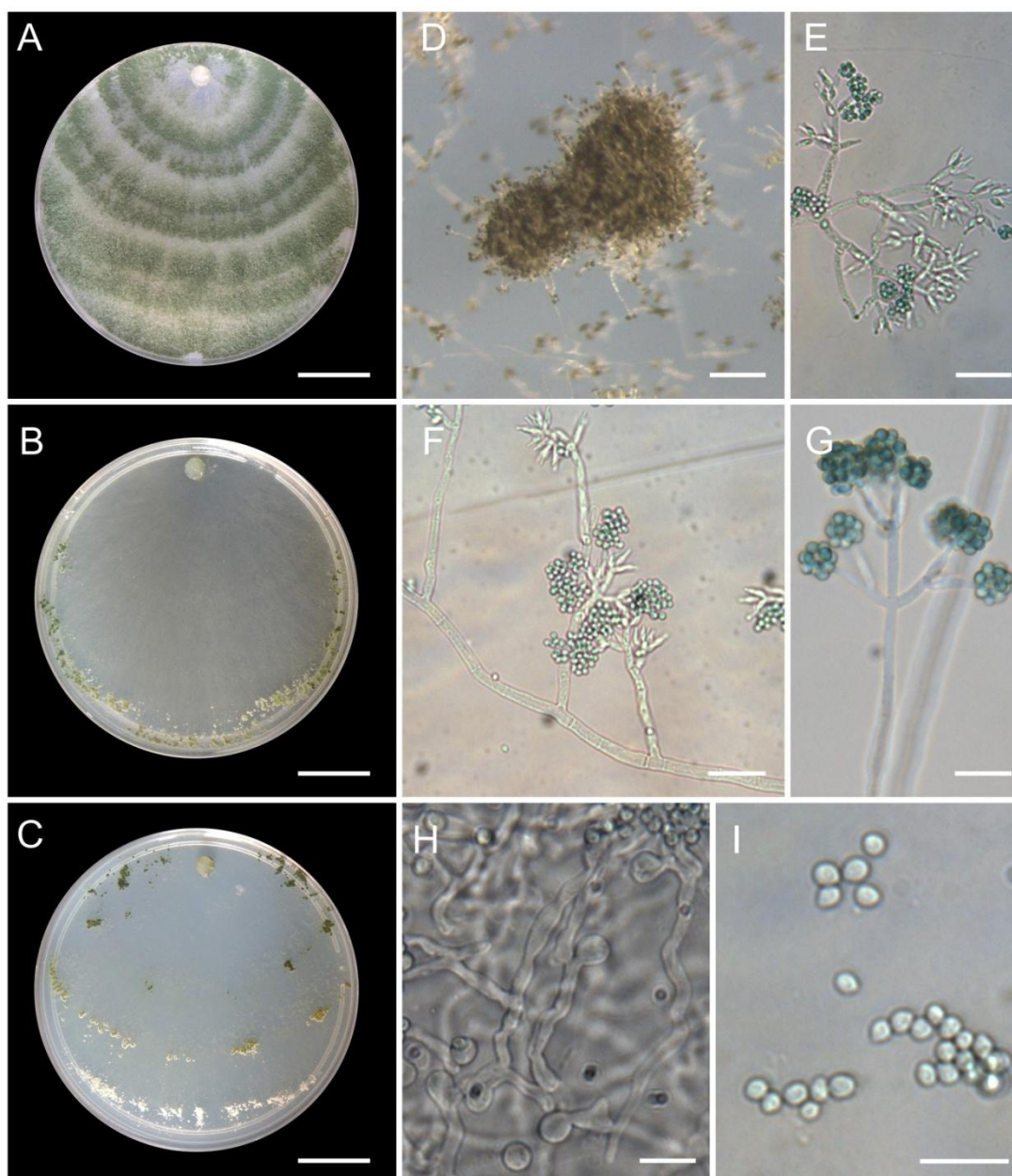


Figura 7. *Trichoderma* sp. VIC 44363 (A-I). Aparência da colônia (meios BDA, MDA e ANS, 7d, 25 °C) (A, B e C); Aparência de pústulas de conidiação em ANS (D); Conidióforos e fiálides (ANS) (E, F e G); Agrupamento de clamidósporo-like (H); Conídios (I). Barras de escala: A, B, C = 20 mm, D = 0,2 mm, E, F = 20 µm, G, H, I = 10 µm.

***Trichoderma* sp. VIC 44364**

Características da cultura: crescimento ótimo em meio BDA e MDA, a 25°C. Crescimento limitado a 35°C. Em MDA, apresentou crescimento de 46,5 - 48,5 mm a 25°C, 45,5 - 50,5 mm a 30°C e 14,5 - 16,5 mm a 35°C, após 72 h (Tabela 4). Colônia hialina, fina, nenhum odor notado e nenhum pigmento observado nos meios de cultura analisados. Clamidósporos subglobosos, terminais. Esporulação notada apenas em culturas velhas. Não foi observada a formação de pústulas e nem a formação de zonas concêntricas. Conidióforos simétricos, compreendendo um eixo principal reconhecível. Fiálides surgem em ângulo de pouco menos de 90 ° em relação ao eixo principal, ramos mais longos perto da base e ramos curtos ou fiálides solitárias que surgem na parte final do conidióforo. Fiálides tipicamente retas, cilíndricas ou ligeiramente mais grossas no meio (Figura 8). As fiálides apresentam tamanhos de (4,0 - 5,0 - 5,0(-11,0) x (2,0 - 3,0 - 3,0(- 4,0) µm, (n=30) (Tabela 4), ampuliforme, com 3 ou mais fiálides por métula. Conídios verdes, lisos, ligeiramente subglobosos com (2,0-)3,0 - 3,0(4,0) x (2,0-)3,0 - 3,0(5,0) µm, (n=30) (Tabela 4). Poucos clamidósporos observados, subglobosos quando terminais. Em BDA, o crescimento variou de 47,5 - 57,5 mm a 25°C, 54,5 - 58,5 mm a 30°C e 15,5 - 17,5 mm a 35°C, após 72 h (Tabela 4). O micélio cresceu na placa toda após 4 dias a 25°C, com micélio denso e cotonoso. Em ANS, apresentou crescimento de 26,5 - 31,5 mm a 25°C, 35,5 - 36,5 mm a 30°C e 8,5 - 10,5 mm a 35°C, após 72 h (Tabela 4). Colônia hialina e fina. Nenhum pigmento notado em meio de cultura, nenhum odor e não foi observada a formação de pústulas (Figura 8).

Habitat: Endofítico presentes em caules de árvores de *Hevea brasiliensis*.

Distribuição: Bacia amazônica, Brasil.

A ser proposto como holótipo: 22F20C-AC

Nota. *Trichoderma* sp. VIC 44364 é uma espécie tropical, endofítica, presente em caule de *Hevea brasiliensis*. Pertencente ao clado Viride (Figura 8). *Trichoderma* sp. VIC 44364 produz poucos clamidósporos, crescimento rápido, nenhum pigmento notado em meio de cultura e nenhum odor, não formou pústulas em nenhum meio analisado. Conídios globosos ou subglobosos, diferentes do *Trichoderma rogersonii*, reconhecido por seus conídios elipsoidais. Conídios verdes (2,0 - 4,0 x 2,0 - 5,0). Comparado com *T. rogersonii*, *Trichoderma* sp. VIC 44364 apresentou crescimento rápido em meio de cultura MDA a 25 °C (46,5 - 48,5 mm), BDA (47,5 - 57,5 mm) e ANS (26,5 - 31,5 mm).

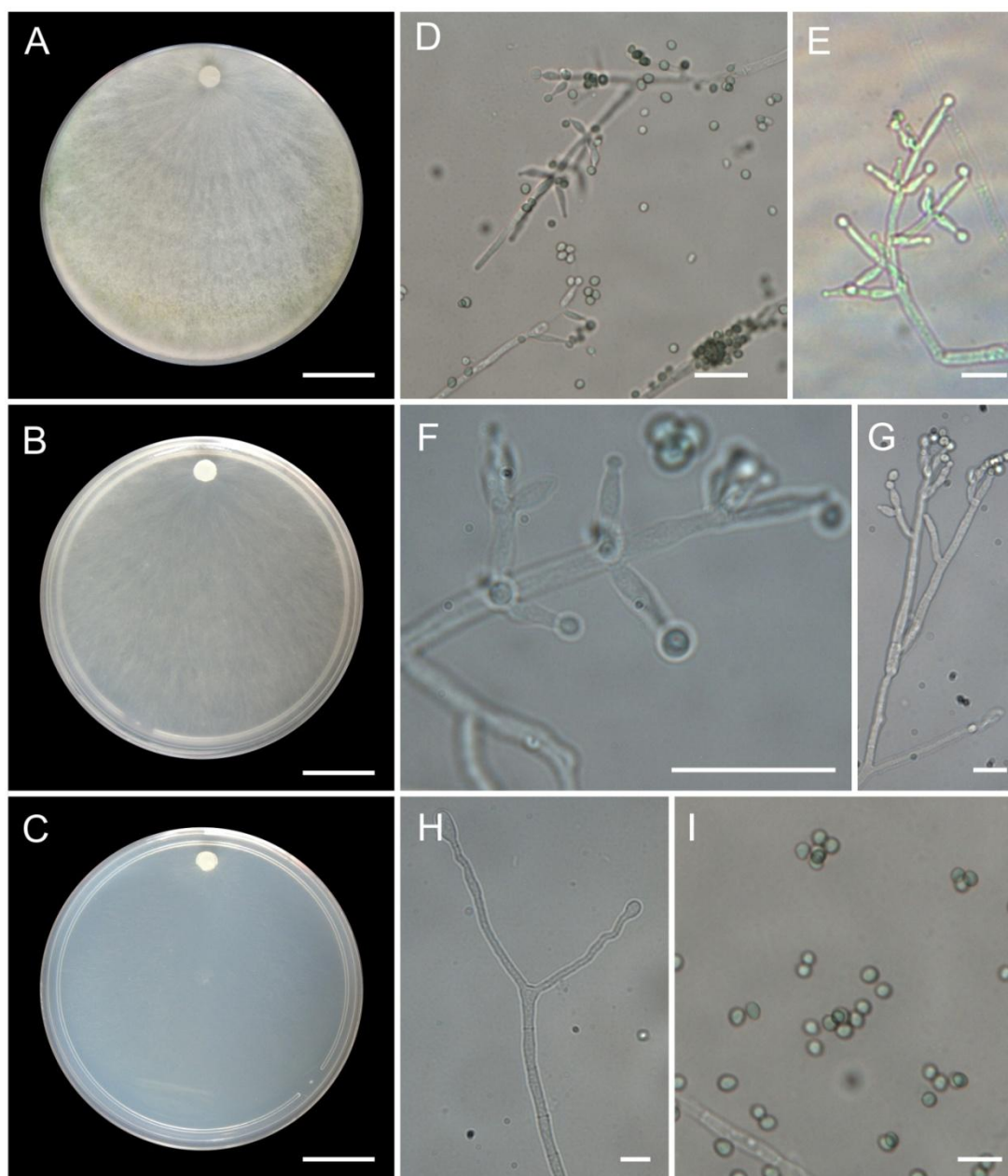


Figura 8. *Trichoderma* sp. VIC 44364 (A-I). Aparência da colônia (meios BDA, MDA e ANS, 7d, 25 °C) (A, B e C); Conidióforos e fiálides (ANS) (D,E, F e G); Clamidósporos (H); Conídios (I). Barras de escala: A, B, C = 20 mm, D, E, F, G, H, I = 10 µm.

Tabela 4. Comparação das espécies baseada nas variações das características morfológicas.

Característica	Espécie						
	<i>T. brevicompactum</i>	<i>T. rogersonii</i>	<i>T. atroviride</i>	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44362	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44361	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44364	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44363
Conídio							
Comprimento do conídio µm	2,54 (± 0,18)	(2,7-)3,5 - 4,5(-5,5)	(2,8-)3,2 - 4,0 (-4,7)	(2,0-)3,0 - 4,0(4,0)	(2,0-)3,0 - 3,0(-4,0)	(2,0-)3,0 - 3,0 - (4,0)	(2,0-)3,0 - 3,0 - (4,0)
Largura do conídio µm		(2,2-)2,5 - 3,2(-4,2)	(2,8-)3,0 - 3,5 (-3,8)	(2,0-)3,0 - 3,0(4,0)	(3,0-)3,0 - 3,0(-4,0)	(2,0-)3,0 - 3,0 (-5,0)	(2,0-)3,0 - 3,0 - (4,0)
Fiálide							
Comprimento da fiálide µm	5,50 [± 0,39]	(3,5-)6,0 - 10,0(-17,5)	(4-)6 - 10 (-12)	(4,0-)8,0 - 8,0 (-12,0)	(3,0-)6,0 - 6,0 (-13,0)	(4,0-)5,0 - 5,0 (-11,0)	(5,0-)8,0 - 9,0 (-16,0)
Largura da fiálide µm	3,56 [± 0,24]	(2,0-)2,5 - 3,5(-4,0)	(2,0-)2,3 - 3,0 (-3,3)	(2,0-)3,0 - 3,0 (-4,0)	(2,0-)3,0 - 3,0 (-4,0)	(2,0-)3,0 - 3,0 (-4,0)	(2,0-)3,0 - 3,0 (-4,0)
Crescimento da colônia em BDA após 72h (mm)							
25 °C 72 h	-	(38-)40 - 48(-50)	57 - 62	77,5	77,5	47,5-57,5	64,5 - 66,5
30 °C 72 h	-	(40-)40 - 52 (-60)	40 - 43	72,5 - 74,5	60,5 - 67,5	54,5 - 58,5	67,5 - 74,5
35 °C 72 h	-	(0-)0,7 - 4(-5)	1,1	11,5 - 12,5	6,5 - 11,5	15,5 - 17,5	13,5 - 16,5
Crescimento da colônia em ANS após 72h (mm)							
25 °C 72 h	-	(15-)21- 31(-33)	34 - 37	37,5 - 41,5	3,5 - 7,5	26,5 - 31,5	46,5 - 50,5
30 °C 72 h	-	(12-)14 - 28(-35)	25 - 29	46,5 - 48,5	19,5 - 22,5	35,5 - 36,5	50,5 - 54,5
35 °C 72 h	-	0 - 3,2	1,1	14,5 - 15,5	0,5 - 1,5	8,5 - 10,5	4,5 - 7,5
Crescimento da colônia em MDA após 72h (mm)							
25 °C 72 h	-	-	45 - 48	77,5	77,5	46,5 - 48,5	59,5 - 61,5
30 °C 72 h	-	-	38 - 42	70,5 - 72,5	60,5 - 62,5	45,5 - 50,5	77,5
35 °C 72 h	-	-	<1	11,5 - 12,5	6,5 - 11,5	14,5 - 16,5	7,5 - 10,5

4. Discussão

4.1 Uso dos marcadores IRAP e REMAP para análise da variabilidade genética e a triagem dos isolados do gênero *Trichoderma*

Em nosso estudo, a formação de agrupamentos dos 38 isolados utilizando os marcadores IRAP e REMAP possibilitou a realização de uma triagem inicial, reduzindo assim, a utilização de isolados repetidos na análise filigenética.

As técnicas IRAP e REMAP foram utilizadas em vários estudos para evidenciar a variabilidade genética de diferentes espécies de fungos, como *Lentinula edodes* (Xiao et al., 2011), *Pyrenophora graminea* (Zein et al., 2010), *Moniliophthora perniciosa* (Santana et al., 2012) e *Pseudocercospora fijiensis* (de Queiroz et al., 2014). Em adição, Santos et al. (2016) avaliando a variabilidade genética de isolados endofíticos do gênero *Diaporthe* encontrados em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) também encontraram elevada variabilidade, semelhantes aos resultados do presente estudo.

Embora já tenha sido demonstrada a eficiência dos marcadores moleculares IRAP e REMAP para a análise da variabilidade genética de diferentes espécies de fungos (Santana et al., 2013), até o momento não havia sido descrita a aplicação desses marcadores para a análise da variabilidade genética de espécies endofíticas do gênero *Trichoderma*. Esses marcadores também foram muito eficientes para a detecção de isolados duplicados, que haviam sido encontrados no mesmo tecido.

Em relação às espécies pertencentes ao gênero *Trichoderma*, estudos anteriores demonstraram que é comum haver elevada variabilidade genética entre os isolados do gênero (Consolo et al., 2012; Al-Sadi et al., 2015; Skoneczny et al., 2015) corroborando com os dados da presente pesquisa.

Desta maneira, nós suportamos que o estabelecimento e uso de marcadores moleculares como o IRAP e REMAP, que atuem de maneira estável e acurada podem contribuir para a distinção de diferentes isolados comerciais ou não, pertencentes ao gênero *Trichoderma*, por exemplo, de maneira rápida e precisa, favorecendo o estudo da variabilidade genética, além de auxiliar na identificação de novas espécies (Xiao et al., 2011).

4.2 Identificação molecular das espécies do gênero *Trichoderma*

De um total de 38 isolados do gênero *Trichoderma* obtidos de diferentes fragmentos de plantas de *Hevea* spp., 30 isolados foram identificados ao nível molecular e morfológico representado principalmente os clados Viride e Harzianum. Em estudo realizado por Gazis e Chaverri (2010) com intuito de acessar a diversidade de fungos endofíticos de *H. brasilienses* no Peru, também foi observado entre os fungos do gênero *Trichoderma* representantes do clado Harzianum (*T. harzianum*) e do clado Viride (*T. koningiopsis*), sendo que os mais abundantes estavam também presentes no caule. Isolados de *Trichoderma harzianum* endofíticos presente no caule também foram obtidos de *Theobroma gileri*, no Equador (Evans et al., 2003). *Trichoderma koningiopsis* é relatada como uma das espécies mais frequentes em clima tropical, encontrada como endofítica em troncos de árvores de *Theobroma cacao* (Bailey et al., 2009). Foi verificado também que algumas espécies relatadas como *T. harzianum* encontradas em clima tropical foram descritas como novas espécies do clado Harzianum, como é o caso de *Trichoderma amazonicum* (Chaverri et al., 2011).

O resultado do nosso estudo revela que *Trichoderma* spp. endofíticas estão presentes em folhas, caules e raízes de plantas de *Hevea* spp. nativas da floresta amazônica brasileira. Além disso, quatro espécies novas são descritas, baseado nas características morfológicas e moleculares. Novas espécies do gênero podem ser identificadas em habitat natural (Chaverri et al., 2011; Chaverri et al., 2015). Outros trabalhos também têm descrito novas espécies endofíticas do gênero *Trichoderma*, como por exemplo, *T. amazonicum*, *T. evansii*, *T. martiale* e *T. taxi* (Zhang et al., 2007; Hanada et al., 2008; Druzhinina et al., 2011; Chaverri et al., 2011).

Nossos resultados evidenciaram o agrupamento dos 30 isolados, identificados a nível molecular e morfológico, em cinco clados: Viride, Harzianum, Virens, Lone lineages e Brevicompactum. Outro estudo realizado com *Hevea brasilienses*, na Amazônia peruana, já havia relatado a distribuição de 39 isolados endofíticos de *Trichoderma* spp. apenas nos clados Harzianum e Viride (Gazis & Chaverri, 2010). Foi relatado que havia uma maior predominância de isolados representantes do clado Harzianum (32 de 39 isolados), diferindo dos dados desta pesquisa, na qual a maior predominância dos isolados foi observada no clado Viride (19 de 30 isolados).

A espécie predominante neste estudo foi *T. koningiopsis*, com 19 isolados, pertencente ao clado Viride. De acordo com Samuels et al. (2006), esta é uma espécie cosmopolita encontrada como saprofítica e endofítica e tem sido relatada em *Theobroma cacao*, *Theobroma gileri* e *Hevea brasiliensis* (Samuels et al., 2006; Gazis e Chaverri, 2010). Ainda dentro do clado Viride foi encontrado *T. ovalisporum*, que também tem sido relatada como espécie endofítica em *Theobroma grandiflorum* e *Theobroma* spp. (Evans et al., 2003; Holmes et al., 2004). Esta mesma espécie apresenta relatos de ocorrência no sudeste Asiático e na América do Sul (Samuels et al., 2006).

No presente estudo, nós propomos duas novas espécies endofíticas (*Trichoderma* sp. VIC 44361 e *Trichoderma* sp. VIC 44362) isoladas do caule e de folhas de *H. brasiliensis*, sendo ambas relacionadas filogeneticamente à *T. atroviride*. A espécie *T. atroviride* tem ocorrência relatada em regiões Neotropicais e na Europa, vivendo sobre cascas de árvores ou como micoparasitas (Hoyos-Carvajal et al. 2009; Jaklitsch, 2011). Como endofítica, essa espécie já foi relatada na China presentes em *Cephalotaxus fortunei* e *Camptotheca acuminata* (Zheng et al., 2011; Pu et al., 2013).

A espécie proposta neste estudo (*Trichoderma* sp. VIC 44364) é relacionada filogeneticamente com a espécie *T. rogersonii*. Esta espécie *T. rogersonii*, foi relatada na América do Norte e na Europa isolada de casca de árvores (Samuels et al., 2006), mas não como endofítica. Outra espécie proposta neste estudo (*Trichoderma* sp. VIC 44363) é relacionada filogeneticamente a espécie *T. brevicompactum* que já foi relatada em regiões Neotropicais, mais precisamente na América do Sul e do Norte e, também, na Ásia. No entanto, *T. brevicompactum* como endofítica foi relatado apenas em alho (*Allium sativum*) na China (Shentu et al., 2014), e não tem sido relatada como endofítica em espécies arbóreas em clima tropical, até o presente momento.

Dentre os isolados que foram identificados no presente estudo, cinco pertencem ao clado Harzianum. Estes resultados corroboram com os observados por Chaverri et al. (2015), que relatam que algumas espécies já descritas como endofíticas em árvores e climas tropicais também pertencem clado Harzianum. Algumas espécies já foram relatadas por ocorrerem como endofítica em climas

Neotropicais como *T. lentiforme* e *T. endophyticum* pertencentes ao clado Harzianum (Chaverri et al., 2015).

Estudos em *Hevea* spp. revelam que endofíticos do gênero *Trichoderma* podem apresentar novas espécies com potencial biotecnológico para utilização tanto na agricultura como em outros segmentos (Bailey et al., 2006; Shentu et al., 2014).

4.3 Análise filogenética

A reconstrução filogenética realizada neste estudo foi bem suportada (Figura 4), ressaltando-se que a identificação molecular é baseada na análise concatenada/multilocus (ITS rDNA, TEF1- α , ACT e RPB2). No presente estudo, os clados com maior porcentagem de isolados foram o clado Viride e o Harzianum. Dentro do clado Viride vários subclados são formados, representados pelos subclados *T. koningiopsis*, *T. erinaceum*, *T. atroviride* e *T. ovalisporum*. Alguns estudos já evidenciaram a presença destes representantes/subclados com ocorrência endofítica (Bailey et al., 2009; Evans et al. 2003; Holmes et al., 2004; Gazis e Chaverri, 2010). No clado Harzianum as espécies podem ser bem distinguidas dentro dos subclados, incluindo espécies que são conhecidas apenas como endofíticas em folhas e caules de plantas tropicais na América do Sul (Chaverri et al., 2015). Além dos isolados pertencentes aos clados Harzianum e Viride, nós também identificamos isolados presentes nos clados Virens, *Lone lineages* e Brevicompactum, evidenciando que as espécies endofíticas em clima tropical estão bem difundidas entre as diferentes espécies do gênero *Trichoderma*.

4.4 Quatro novas espécies de *Trichoderma* propostas como novas

O presente estudo identificou novas espécies de *Trichoderma* endofíticas por meio de análise filogenética e morfológica. As novas espécies *Trichoderma* sp. VIC 44362 e *Trichoderma* sp. VIC 44361 são claramente diferentes de *T. atroviride*, resultado observado a partir da análise concatenada/multilocus das diferentes regiões gênicas e intergênica (Figura 4). *Trichoderma atroviride* é uma espécie comumente encontrada em solo, casca de árvores e, ou com atividade micoparasítica, sendo distribuída principalmente na Europa, América Central e do Norte (Jaklitsch, 2011).

Enquanto que *Trichoderma* sp. VIC 44362 e *Trichoderma* sp. VIC 44361 foram encontradas como endofíticas em folhas e caules de *Hevea* spp. na floresta amazônica. Apesar de apresentarem nichos ecológicos distintos, suas características morfológicas são similares. *Trichoderma* sp. VIC 44362 apresentam pouca variação no tamanho dos conídios e fiálides, mas difere na taxa de crescimento em todos os meios analisados. *Trichoderma* sp. VIC 44361 é similar a *T. atroviride* na disposição dos conidióforos e fiálides e na abundância de clamidósporos, sendo que o tamanho das fiálides e conídios apresentam uma pequena diferença. Em relação à taxa de crescimento é possível observar grande diferença entre as espécies comparadas em meio BDA 72 h (*Trichoderma* sp. VIC 44361 com 77,5 mm e *T. atroviride* 57- 62 mm) (Tabela 4). *Trichoderma atroviride* é conhecida apenas como saprofítica e micoparasita com distribuição na Europa e América do Norte (Jaklitsch, 2011) e, as novas espécies relacionadas (*Trichoderma* sp. VIC 44362 e *Trichoderma* sp. VIC 44361) foram encontradas como endofíticas em *Hevea brasiliensis* na América do Sul.

As espécies descritas pertencentes ao clado *Brevicompactum* apresentam um conidióforo tipo “pachybasii” com suas fiálides pequenas e compactas (Kraus et al., 2004). No presente estudo, a nova espécie relacionada a esse clado apresenta características similares, como tamanho, forma e coloração dos conídios, o crescimento ótimo à 30 °C, que é também semelhante em ambas as espécies. No entanto, as fiálides da espécie endofítica *Trichoderma* sp. VIC 44363 são menos agregadas e maiores em relação à espécie *T. brevicompactum*. A espécie *T. brevicompactum* foi relatada como habitante de solo na América do Norte e na Europa, sendo também relatada como endofítica por Shentu et al. (2014), em alho (*Allium sativum*), na China. Entretanto, não há relato *T. brevicompactum* como endofítica descrito em literatura em clima tropical, principalmente na América do Sul.

Trichoderma sp. VIC 44364 se aproxima de *T. rogersonii* pelas suas características morfológicas e moleculares, mas é facilmente distinguida pela morfologia dos conídios. *Trichoderma* sp. VIC 44364 possui conídios do tipo subgloboso para globoso e *T. rogersonii* elipsoidal (Samuels et al., 2006). Além disto, outras diferenças também podem ser observadas na taxa de crescimento em BDA, após 72 h no escuro a 25 °C (47,5 - 57,5 mm *Trichoderma* sp. VIC 44364 e 38-50 mm para *T. rogersonii*). *Trichoderma rogersonii* formam pústulas em meio

MDA, enquanto que em *Trichoderma* sp. VIC 44364 não foi observada a formação de pústulas em qualquer tipo de meio analisado. Entretanto, a disposição dos conidióforos de *Trichoderma* sp. VIC 44364 é bastante parecida com *T. rogersonii*, apresentam o mesmo padrão de ramificação, uma vez que hifas intercalares podem ser observadas em ambas as espécies.

Ao considerarmos as espécies propostas como novas neste estudo, nenhuma de suas espécies relacionadas havia sido encontrada como endofíticas em espécies arbóreas nativas da floresta amazônica brasileira. Assim, a elevada plasticidade deste gênero confere melhor adaptação as mais diferentes condições geográficas e com isso, pode promover a especiação das espécies por habitat (Chaverri et al., 2011; Chaverri et al., 2015).

O presente estudo propõe a identificação de quatro novas espécies endofíticas do gênero *Trichoderma* oriundo de plantas nativas da floresta amazônica brasileira e sugere a utilização dos marcadores IRAP e REMAP para auxiliar na seleção e triagem de isolados a serem identificados e para a análise da variabilidade genética.

5. Referências

- Abramoff, M.D., Magalhaes, P.J., Ram, S.J. "Image Processing with ImageJ" (2004). *Biophotonics International*, v, 11, n. 7, p. 36-42.
- Al-Sadi, A.M., Al-Oweisi, F.A., Edwards, S.G., Al-Nadabi, H., Al-Fahdi, A.M. (2015). Genetic analysis reveals diversity and genetic relationship among *Trichoderma* isolates from potting media, cultivated soil and uncultivated soil. *BMC Microbiology*, v. 15, n. 1, p. 147.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, n. 3, p. 403-410.
- Bae, H., Sicher, R.C., Kim, M.S., Kim, S.H., Strem, M.D., Melnick, R.L., Bailey, B.A. (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, n. 11, p. 3279-3295.
- Bailey, B.A., Strem, M.D., Wood, D. (2009). *Trichoderma* species form endophytic associations within *Theobroma cacao* trichomes. *Mycological Research*, v. 113, n. 12, p. 1365-1376.
- Bailey, B.A., Bae, H., Strem, M.D., Roberts, D.P., Thomas, S.E., Crozier, J., Samuels, G.J., Choi, I.Y., Holmes, K.A. (2006). Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta*, v. 224, p. 1149-1164.
- Bischof, R. H., Ramoni, J., Seiboth, B. (2016). Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microbial Cell Factories*, v. 15, n. 1, p. 1.
- Carbone, I., Kohn, L.M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, v. 91, p. 553-556.
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., Samuels, G.J. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, v. 107, n. 3, p. 558-590.

- Chaverri, P., Gazis, R.O., Samuels, G.J. (2011). *Trichoderma amazonicum*, a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. *Mycologia*, v. 103, n. 1, p. 139-151.
- Chaverri, P., Samuels, G.J. (2004). *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. *Studies in Mycology*, v. 48, p. 1-116.
- Chaverri, P. & Gary, J. (2003). Samuels. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Consolo, V. F., Mónaco, C. I., Cordo, C. A., Salerno, G. L. (2012). Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n. 4, p. 1389-1398.
- Crozier, J., Thomas, S.E., Aime, M.C., Evans, H.C.; Holmes, K.A. (2006). Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies isolated from stems and pods of *Theobroma cacao*. *Plant Pathology*, v. 55, p. 783–791.
- de Queiroz, C. B., Santana, M. F., Da Silva, G. F., Mizubuti, E. S. G., de Araújo, E. F., de Queiroz, M. V. (2014). Use of the IRAP marker to study genetic variability in *Pseudocercospora fijiensis* populations. *Current Microbiology*, v. 68, n. 3, p. 358-364.
- Druzhinina, I.S, Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V., Kubicek, C.P. (2011). *Trichoderma*—the genomics of opportunistic success. *Nature Review Microbiology*, v. 9, p. 749-759.
- Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., Komoń-Żelazowska, M., Mulaw, T.B., Bissett, J. (2010). 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.
- Evans, H. C., Holmes, K. A., Thomas, S. E. (2003). Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a

- preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological progress*, v. 2, n. 2, p. 149-160.
- Furlani Júnior, E., Gonçalves, P.S. Cultura da seringueira. 1ª ed. Ilha Solteira, SP, Editores: Enes Furlani Júnior, Paulo de Souza Gonçalves, p. 113- 118. 2012.
- Furtado, E.L., Trindade, D.R. Doenças da seringueira (*Hevea* spp.). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A (Ed.). Manual de fitopatologia. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.559-567. 2005.
- Gazis, R. & Chaverri, P. (2010). Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *Fungal Ecology*, v. 3, n. 3, p. 240-254.
- Goldfarb, M., Santana, M. F., Salomão, T. M. F., Pereira, P. H. S., de Queiroz, M. V., de Barros, E. G. (2016). Technique IRAP (*Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism*) to study the genetic variability in *Sclerotinia sclerotiorum* populations. *Australasian Plant Pathology*, v. 45, n. 4, p. 357-360.
- Gond, S.K., Verma, V.C., Kumar, A., Kumar, V., Kharwar, R.N. (2007). Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Corraeae (Rutaceae) from Vanasi (India). *World Journal Microbiology Biotechnology*, v. 23, p. 1371–1375.
- Hanada, R. E., de Jorge Souza, T., Pomella, A. W., Hebbar, K. P., Pereira, J. O., Ismaiel, A., Samuels, G. J. (2008). *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. *Mycological Research*, v. 112, n. 11, p. 1335-1343.
- Harada, M. L., Schneider, H., Schneider, M. C., Sampaio, I., Czelusniak, J., Goodman, M. (1995). DNA evidence on the phylogenetic systematics of New World monkeys: support for the sister-grouping of Cebus and Saimiri from two unlinked nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 4, n. 3, p. 331-349.

- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, n. 1, p. 43-56.
- Holmes, K.A., Schroers, H-J., Thomas, S.E., Evans, H.C., Samuels, G.J (2004). Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America. *Mycological Progress*, v. 3, p. 199-210.
- Hora Júnior, B. T. Da., De Macedo, D. M., Barreto, R. W., Evans, H. C., Mattos, C. R. R., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G. (2014). Erasing the past: A new identity for the damoclean pathogen causing South American leaf blight of rubber. *Plos One*, v.9, n. 8.
- Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S., Bissett, J. (2009). Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genetics and Biology*, v. 46, n. 9, p. 615-631.
- Huelsensbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, v. 17, p. 754-755.
- Jaklitsch, W. M. (2011). European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores. *Fungal Diversity*, v. 48, n. 1, p. 1-250.
- Jaklitsch, W. M., and H. Voglmayr. (2015). Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in Mycology*, v. 80, p. 1-87.
- Jaklitsch, W. M., Komon, M., Kubicek, C. P., Druzhinina, I. S. (2005). *Hypocrea voglmayrii* sp. nov. from the Austrian Alps represents a new phylogenetic clade in *Hypocrea/Trichoderma*. *Mycologia*, v. 97, n. 6, p. 1365-1378.
- Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Suoniemi, A., Schulman, A. (1999). IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 98, n. 5, p. 704-711.
- Kopchinskiy, A., Komon, M., Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S. (2005). *TrichoBLAST*: a multiloci database of phylogenetic markers for *Trichoderma* and *Hypocrea*

- powered by sequence diagnosis and similarity search tools. *Mycological Research*, v. 109, p. 658-660.
- Kraus, G. F., Druzhinina, I., Gams, W., Bissett, J., Zafari, D., Szakacs, G., Kubicek, C. P. (2004). *Trichoderma brevicompactum* sp. *Mycologia*, v. 96, n. 5, p. 1059-1073.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Börner, T., Guého, E. (1999). Molecular reidentification of human pathogenic *Trichoderma* isolates as *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma citrinoviride*. *Medical Mycology*, v. 37, n. 1, p. 25-33.
- Kuswinanti, T., Syamun, E., Masniawati, A. (2015). The potency of endophytic fungal isolates collected from local aromatic rice as indole acetic acid (IAA) producer. *Procedia Food Science*, v. 3, p. 96-103.
- Le Guen, V., Guyot, J., Mattos, C.R.R., Seguin, M., Garcia, D. (2008). Long lasting rubber tree resistance to *Microcyclus ulei* characterized by reduced conidial emission and absence of teleomorph. *Crop Protection*, v. 27, n. 12, p. 1498-1503.
- Lipińska, L., Klewicki, R., Klewicka, E., Kołodziejczyk, K., Sójka, M., Nowak, A. (2016). Antifungal Activity of *Lactobacillus* sp. Bacteria in the Presence of Xylitol and Galactosyl-Xylitol. *BioMed Research International*, v. 8.
- Liu, Y.J., Whelen, S., Hall, B.D. (1999). Phylogenetic relationships among Ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution*, v. 16, p. 1799-1808.
- Lu, B., Druzhinina, I. S., Fallah, P., Chaverri, P., Gradinger, C., Kubicek, C. P., Samuels, G. J. (2004). *Hypocrea/Trichoderma* species with pachybasium-like conidiophores: teleomorphs for *T. minutisporum* and *T. polysporum* and their newly discovered relatives. *Mycologia*, v. 96, n. 2, p. 310-342.
- Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., Kenerley, C.M. (2013). *Trichoderma* research in the genome era. *Annual Review of Phytopathology*, v. 51, p. 105-129.

- Nirenberg Hl. 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der Fusarium-Sektion Liseola. Mitt Biol Bundesanst Land-Forstwirtschaft Berl-Dahl, 169:1-117.
- Nylander, J.A.A. (2004). MrModeltestv2. Program distributed by the author. In "Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden".
- Overton, B.E., Stewart, E.L., Geiser, D.M. (2006). Taxonomy and phylogenetic relationships of nine species of *Hypocrea* with anamorphs assignable to *Trichoderma* section Hypocreanum. *Studies in Mycology*, v. 56, p. 39-65.
- Pereira, J.C., Marques, N.P., Rodrigues, A., Oliveira, T.B.de., Boscolo, M., Silva, R., Gomes, E., Martins, D.A.B. (2015). Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. *Journal of Applied Microbiology*, v. 118, n. 4, p. 928-939.
- Pidot, S., Ishida, K., Cyrulies, M., Hertweck, C. (2014). Discovery of clostrubin, an exceptional polyphenolic polyketide antibiotic from a strictly anaerobic bacterium. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 53, p. 7856-7859.
- Pu, X., Qu, X., Chen, F., Bao, J., Zhang, G., Luo, Y. (2013). Camptothecin-producing endophytic fungus *Trichoderma atroviride* LY357: isolation, identification, and fermentation conditions optimization for camptothecin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, n. 21, p. 9365-9375.
- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Rannala, B., & Yang, Z. (1996). Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*, v. 43, n. 3, p. 304-311, 1996.
- Samuels, G. J. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, v. 96, n. 2, p. 195-206.

- Samuels, G. J., Dodd, S. L., Lu, B. S., Petrini, O., Schroers, H. J., Druzhinina, I. S. (2006). The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology*, v. 56, p. 67-133.
- Santana, M. F., Batista, A. D., Ribeiro, L. E., de Araújo, E. F., de Queiroz, M. V. (2013). Terminal repeat retrotransposons as DNA markers in fungi. *Journal of Basic Microbiology*, v. 53, n. 10, p. 823-827.
- Santana, M. F., Araújo, E.F., Souza, J. T., Mizubuti, E.S.G., Queiroz, M.V. (2012). Development of molecular markers based on retrotransposons for the analysis of genetic variability in *Moniliophthora perniciosa*. *European Journal of Plant Pathology*, v. 134, p. 497-507.
- Santos, L.V., Queiroz, M.V., Santana, M.F., Soares, M.A., Barros, E.G., Araújo, E.F., Langin, T. (2012). Development of new molecular markers for the *Colletotrichum* genus using RetroCII sequences. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 28, n. 3, p. 1087-1095.
- Santos, T. T., Souza Leite, T., Queiroz, C. B., Araújo, E. F., Pereira, O. L., Queiroz, M. V. (2016). High genetic variability in endophytic fungi from the genus *Diaporthe* isolated from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Brasil. *Journal of Applied Microbiology*, v. 120, n. 2, p. 388-401.
- Saravanakumar, K., Fan, L., Fu, K., Yu, C., Wang, M., Xia, H., Chen, J. (2016b). Cellulase from *Trichoderma harzianum* interacts with roots and triggers induced systemic resistance to foliar disease in maize. *Scientific Reports*, v. 6, p. 35543.
- Saravanakumar, K., Yu, C., Dou, K., Wang, M., Li, Y., Chen, J. (2016). Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Biological Control*, v. 94, p. 37-46.
- Shentu, X., Zhan, X., Ma, Z., Yu, X., Zhang, C. (2014). Antifungal activity of metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic. *Brasilian Journal of Microbiology*, v. 45, n. 1, p. 248-254.
- Skoneczny, D., Oskiera, M., Szczech, M., Bartoszewski, G. (2015). 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.
- Swofford, D. L., Waddell, P. J., Huelsenbeck, J. P., Foster, P. G., Lewis, P. O., Rogers, J. S. (2001). Bias in phylogenetic estimation and its relevance to the choice between parsimony and likelihood methods. *Systematic Biology*, v. 50, p. 525-539.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, n. 12, p. 2725-2729.
- Tang, C., Huang, D., Yang, J., Liu, S., Sakr, S., Li, H., Qin, Y. (2010). The sucrose transporter HbSUT3 plays an active role in sucrose loading to laticifer and rubber productivity in exploited trees of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant, Cell & Environment*, v. 33, n. 10, p. 1708-1720.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L, Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 40, p. 1-10.
- Vitti, A., Pellegrini, E., Nali, C., Lovelli, S., Sofo, A., Valerio, M., Nuzzaci, M. (2016). *Trichoderma harzianum* T-22 Induces Systemic Resistance in Tomato Infected by Cucumber mosaic virus. *Frontiers in Plant Science*, v. 7.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T., Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. Academic Press, Inc., New York.
- Xiao, Y., Dai, Y., Lu, Y., Liu, W., Wang, Z., Bian, Y. (2011). Development of IRAP-SCAR marker for strain identification in *Lentinula edodes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 27, n. 7, p. 1731-1734.
- Zein, I., Jawhar, M., Arabi, M. I. E. (2010). Efficiency of IRAP and ITS-RFLP marker systems in accessing genetic variation of *Pyrenophora graminea*. *Genetics and Molecular Biology*, v. 33, n. 2, p. 328-332.

- Zhang, C. L., Liu, S. P., Lin, F. C., Kubicek, C. P., Druzhinina, I. S. (2007). *Trichoderma taxi* sp. , an endophytic fungus from Chinese yew *Taxus mairei*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 270, n. 1, p. 90-96.
- Zheng, C. J., Sun, P. X., Jin, G. L., Qin, L. P. (2011). Sesquiterpenoids from *Trichoderma atroviride*, an endophytic fungus in *Cephalotaxus fortunei*. *Fitoterapia*, v. 82, n. 7, p. 1035-1038.
- Zhu, J. H., Xu, J., Chang, W. J., Zhang, Z. L. (2015). Isolation and Molecular Characterization of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid Synthase Genes in *Hevea brasiliensis*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 2, p. 4136-4149.

CAPÍTULO II

ISOLADOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO *Trichoderma* PROMISSORES PARA O CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Resumo

Trichoderma spp. endofíticos associados a plantas nativas de *Hevea* spp. presentes no bioma Amazônia têm potencial para serem utilizados no controle biológico de fitopatógenos, embora tenham sido pouco explorados. Neste estudo, vinte e cinco isolados endofíticos de *Hevea* spp. do gênero *Trichoderma* foram testados *in vitro* contra quatro fitopatógenos (*Colletotrichum karstii*, *C. laticiphilum*, *C. lindemuthianum* e *Fusarium verticillioides*). O filtrado liofilizado de quatro isolados de *Trichoderma* spp. endofíticos 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363), 24F6C-AM (*T. koningiopsis*), 245F13C-AC (*T. koningiopsis*) e 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362), apresentaram os melhores resultados de atividade antimicrobiana frente aos fungos fitopatogênicos. Estes quatro isolados demonstraram atividade de quitinase e β -1,3-glucanase. O isolado 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363) apresentou os melhores resultados em relação à inibição do crescimento micelial e da germinação dos conídios de todos os fitopatógenos testados. Além disso, as menores concentrações mínimas inibitórias dos extratos orgânicos brutos foram observadas para esse isolado.

Palavras chaves: metabólitos secundários; enzimas; atividade antimicrobiana

1. Introdução

Produtos químicos têm sido amplamente utilizados na agricultura para o controle de insetos e de micro-organismos (fungos e bactérias) com o objetivo de proteger as culturas e alcançar bons índices produtivos. Contudo, o manejo inadequado e o uso intensivo desses produtos podem conferir resistência desses organismos aos agrotóxicos, bioacumulação nas cadeias alimentares, o aumento da poluição ambiental, a perda de biodiversidade e, principalmente, riscos à saúde humana (Kim et al., 2017; Monnerat et al., 2017). Assim, o desenvolvimento de pesquisas que promovam ou possibilitem novas perspectivas para a redução do uso de agrotóxicos é essencial para a sustentabilidade da produção agrícola (Le Cointe et al., 2016). Neste cenário, destaca-se o controle biológico como uma alternativa viável em relação aos agrotóxicos, devido à capacidade de controlar as doenças sem causar danos ao meio ambiente (Gafni et al., 2015).

Dentre os agentes de biocontrole utilizados na agricultura frente a diversos fitopatógenos, destacam-se os fungos. Nos últimos anos, os fungos endofíticos têm ganhado maior destaque no controle biológico por apresentarem resultados promissores (Yuan et al., 2017; Potshangbam et al., 2017). Endofíticos são definidos como aqueles que colonizam partes internas de tecidos de plantas saudáveis, sem causar sintomas de doença (Petrini, 1991). Em adição, a estreita relação entre a interação planta-endófito pode se constituir uma alternativa viável para o controle de fitopatógenos (Mousa & Raizada, 2013; Chen et al., 2016), por meio da produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana.

Diversos estudos reportam o potencial de fungos endofíticos no controle de fungos fitopatogênicos, como o patógeno *Colletotrichum dematium* controlado por *Curvularia pallescens* (Nascimento et al., 2015); *Fusarium guttiforme* controlado por *Trichoderma* spp. (De Souza et al., 2016); *Pyrenophora tritici-repentis* controlado por *Trichoderma hamatum* (Larran et al., 2016) e *Ustilagoidea virens* controlado por *Antennariella placitae* (Andargie et al., 2017). Adicionalmente, o gênero *Trichoderma* destaca-se por apresentar diferentes mecanismos de ação contra fitopatógenos, como competição por espaço e nutrientes (Savazzini et al., 2009), produção de compostos antimicrobianos voláteis e não-voláteis (Vinale et al., 2014;

Bae et al., 2016), produção de enzimas relacionadas ao micoparasitismo (Geraldine et al., 2013) e promoção do crescimento vegetal (Zhang et al., 2016).

De fato, espécies do gênero *Trichoderma* estão entre os micro-organismos antagonistas mais utilizados no biocontrole de plantas (Monteiro et al., 2015; Valenzuela et al., 2015; Toghueo et al., 2016; Chen et al., 2016; Lee et al., 2016). Ressalta-se que estes fungos são utilizados com sucesso no controle biológico na agricultura brasileira, sendo possível encontrar produtos como Tricovab[®], que é um fungicida microbiológico a base do fungo *Trichoderma stromaticum*, utilizado no biocontrole da vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*) na cultura do cacaueiro (*Theobroma cacao*) com eficácia de até 97% (BRASIL, 2013).

Os metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp. demonstraram atividade inibitória contra o patógeno *Phytophthora* sp. (Bae et al., 2016). Similarmente, metabólitos produzidos pelos fungos endofíticos *T. atroviride* e *T. koningii* também apresentaram atividade antagônica contra *Pyricularia oryzae*, *Diplodia seriata*, *Phaeobotryon cupressi* e *Spencermartinsia viticola* (Hosseyini-Moghaddam & Soltani, 2014). Além disso, compostos bioativos com atividade antagônica têm sido isolados e identificados (p.ex. Viridepirona isolada de *Trichoderma viride*) (Evidente et al., 2003).

A produção de enzimas extracelulares é o ponto chave para que o micoparasitismo seja eficiente durante a interação de *Trichoderma* spp. versus fitopatógenos (Geraldine et al., 2013). Assim, a atividade das enzimas quitinase, β -1,3-glucanase e proteases são correntemente investigadas durante a seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para serem utilizados no controle biológico, como é o caso do controle de *Botrytis cinerea* no tomateiro (You et al., 2016).

Diferentes fitopatógenos acometem as culturas agrícolas, conforme exemplificado por *Colletotrichum karstii* e *Colletotrichum laticiphilum*, agentes etiológicos da antracnose na seringueira (*Hevea* spp.). Ambos causam antracnose nas folhas de seringueira, deixando os tecidos necróticos, consequentemente diminuindo as taxas fotossintéticas e ocasionando redução na produção de borracha (Cai et al., 2016; Hunupolagama et al., 2017). Outra espécie de grande importância na agricultura é *Colletotrichum lindemuthianum*, agente etiológico da antracnose no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), doença que afeta a produção mundial de feijão (Padder et al., 2016). *Fusarium verticillioides*, agente etiológico da podridão rosada

da espiga de milho (*Zea mays*), também é capaz de causar grandes perdas econômicas na produção mundial de milho, infectando as plantas em todas as fases de desenvolvimento (Maschietto et al., 2017). Assim, estudar medidas de biocontrole para esses fitopatógenos pode revelar espécies de *Trichoderma* promissoras para uso no controle biológico e ser uma alternativa ecológica para minimizar os problemas gerados por métodos agroquímicos.

Em estudos anteriores, foram identificados 38 isolados de *Trichoderma* endofíticos de plantas de seringueiras nativas da Amazônia brasileira, totalizando 11 espécies (dados não publicados). Adicionalmente, foram identificadas e propostas quatro novas espécies de *Trichoderma* (*Trichoderma* sp. VIC 44361, *Trichoderma* sp. VIC 44363, *Trichoderma* sp. VIC 44362 e *Trichoderma* sp. VIC 44364). Diante do potencial que algumas espécies do gênero *Trichoderma* apresentam, avaliar esses isolados quanto ao controle de fungos fitopatogênicos (*C. karstii*, *C. laticiphilum*, *C. lindemuthianum* e *F. verticillioides*) por meio de ensaios de cultura dupla, atividade antagônica, análise do perfil metabólito secundário e atividade enzimática pode revelar agentes potenciais de biocontrole.

2. Material e métodos

2.1 Isolados de *Trichoderma* spp. endofíticos e fungos fitopatogênicos

As espécies de *Trichoderma* endofíticos utilizados neste estudo estão depositados na Micoteca do Laboratório de Genética Molecular de Fungos – Bioagro – Campus UFV – Viçosa/MG (Brasil). Um total de 25 isolados foi avaliado neste estudo (Tabela 1). Os fitopatógenos analisados foram *Colletotrichum karstii*, *Colletotrichum laticiphilum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Fusarium verticillioides*.

Tabela 1. Isolados de *Trichoderma* spp. endofíticos da seringueira (*Hevea* spp.) utilizados neste estudo.

Código dos Isolados	Espécies
22F20C-AC	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44364
432F8C-AM	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44361
17F5R-AM	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44363
23F18C-AC	<i>Trichoderma harzianum</i>
549F18C-AC	<i>Trichoderma harzianum</i>
762F17F-AC	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44362
763F25F-AM	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44362
764F2C-AM	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44362
20F5C-AM	<i>Trichoderma erinaceum</i>
610F5C-AM	<i>Trichoderma erinaceum</i>
24F6C-AM	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
58F6C-AM	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
265F6C-AM	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
619F6C-AM	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
815F11R-AM	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
21F13C-AC	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
3F13C-AC	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
245F13C-AC	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
765F5C-AM	<i>Trichoderma harzianum</i>
247F12R-AC	<i>Trichoderma harzianum</i>
4F9R-AC	<i>Trichoderma ovalisporum</i>
26F9R-AC	<i>Trichoderma ovalisporum</i>
508F9R-AC	<i>Trichoderma ovalisporum</i>
597F2C-AC	<i>Trichoderma spirale</i>
84F15C-AM	<i>Trichoderma virens</i>

* F-AC (Folha/Acre), C-AC (Caule/Acre), R-AC (Caule/Acre); F-AM (Folha/Amazonas), C-AM (Folha/Amazonas), R-AM (Folha/Amazonas).

2.2 Ensaio de cultura dupla

O potencial antagônico dos isolados de *Trichoderma* spp. endofíticos aos fungos fitopatogênicos foi determinado por meio do método de cultura dupla descrito por Campanile et al. (2007). Os isolados de *Trichoderma* spp. e os quatro fungos fitopatogênicos foram cultivados separadamente em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA, infusão de batata, 200 g; glicose, 20 g; ágar, 17 g; água destilada para completar o volume de 1 L) por cinco e sete dias, respectivamente. Posteriormente, foram inoculados em pontos opostos em cada placa de Petri com meio BDA, um disco de micélio (5 mm de diâmetro) do isolado de *Trichoderma* spp. e um disco de micélio do fitopatógeno. Os fungos fitopatogênicos *C. karstii*, *C. laticiphilum* e *C. lindemuthianum* foram inoculados 48 h antes da inoculação dos isolados de *Trichoderma*. O tratamento controle consistiu do cultivo dos fitopatógenos na ausência dos isolados de *Trichoderma* spp.

Os fungos foram incubados a 25 ± 2 °C até a colônia do fungo do tratamento controle preencher toda a placa. A porcentagem de inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos foi calculada de acordo com a seguinte fórmula (Whipps, 1987):

$$(DM - dm) / DM \times 100$$

Onde, DM = diâmetro médio das colônias de três replicatas do tratamento controle e dm = diâmetro médio das colônias de três replicatas de cada tratamento. Os valores de diâmetro foram mensurados em milímetro.

2.3 Atividade antagônica a partir do meio de cultura liofilizado

Os isolados de *Trichoderma* foram cultivados por cinco dias em meio BDA. Posteriormente, cinco discos de micélio (5 mm de diâmetro) foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio batata-dextrose (BD) (Himedia®). O cultivo controle foi realizado com ausência dos isolados de *Trichoderma*. Os frascos foram incubados por 7 dias sob agitação constante de 150 rpm à 25 °C de acordo com metodologia proposta por Isaías et al. (2014).

O filtrado da cultura de cada fungo endofítico e do cultivo controle foram liofilizados, pesados e diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) (Merk®) na concentração de 1% (p/v) e adicionados ao meio BDA nas seguintes concentrações:

700 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para avaliar a atividade antagônica contra *C. karstii* e *C. laticiphilum* e 1 mg mL^{-1} para *C. lindemuthianum* e *F. verticillioides*. Posteriormente, um disco de micélio (5 mm de diâmetro) de cada fitopatógeno foi inoculado em placas de Petri contendo o meio BDA com a adição das concentrações dos filtrados liofilizados. Os tratamentos foram compostos por três replicatas.

As culturas foram incubadas em câmaras BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 h, por sete dias para *C. karstii* e *C. laticiphilum*; dez dias para *F. verticillioides* e 12 dias para *C. lindemuthianum*. A inibição do crescimento dos fitopatógenos foi avaliada com o auxílio de paquímetro digital de precisão por meio da medição do diâmetro das colônias. A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada conforme descrito anteriormente (subitem 2.2).

2.4 Inibição da germinação dos conídios e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) a partir do extrato bruto

Os fungos foram submetidos ao processo de fermentação para obtenção dos metabólitos extracelulares, conforme descrito anteriormente (subitem 2.3). O filtrado obtido a partir da fermentação foi misturado com o solvente orgânico acetato de etila na mesma proporção usada para a extração dos metabólitos. A fase orgânica foi coletada e o acetato de etila foi removido por evaporação em rotaevaporador com temperatura de 50 °C. Posteriormente, os extratos brutos foram armazenados a - 20 °C.

O ensaio de microdiluição foi realizado conforme descrito em CLSI (2008). Os extratos brutos dos isolados 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362), 24F6C-AM (*T. koningiopsis*), 245F13C-AC (*T. koningiopsis*) foram submetidos a diluições seriadas de 6000 a 0,18 $\mu\text{g/mL}$ nos testes com *C. karstii*, *C. laticiphilum*, *C. lindemuthianum* e *F. verticillioides*. Por outro lado, para o extrato produzido pelo isolado 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363) foram realizadas diluições de 6000 a 0,18 $\mu\text{g/mL}$ para o *F. verticillioides*; diluições de 125,0 a 3,90 $\mu\text{g/mL}$ para *C. karstii*, *C. laticiphilum*; e diluições de 7,82 a 0,24 $\mu\text{g/mL}$ para *C. lindemuthianum*. Adicionalmente, DMSO (0,5% v/v) foi usado como controle de toxicidade.

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços (CELLSTAR® 96, Sigma-Aldrich) por meio da aplicação prévia de 100 μL de meio GPY (10 g de glicose; 5 g

de peptona; 1 g de extrato de levedura, água destilada para completar 1 L), seguida da aplicação de 100 µL dos extratos diluídos, e por último, 100 µL da suspensão de conídios (10^6 conídios/mL).

A germinação e o tamanho do tubo germinativo dos conídios foram observados em microscópio óptico (Dialux 22 EB) e comparados com o controle para determinar a CMI (Hosseyni-Moghaddam & Soltani, 2014). A porcentagem de germinação foi determinada por meio da contagem de 100 conídios por replicata.

A concentração mais baixa do extrato bruto que inibiu 100% da germinação dos conídios dos fitopatógenos foi considerada a CMI. Todos os testes foram realizados em três replicatas.

2.5 Obtenção do perfil dos metabólitos secundários de *Trichoderma* spp. utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)

A caracterização dos metabólitos secundários foi realizada por meio da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM). Os extratos brutos concentrados (5 mg/mL) foram dissolvidos em 1 mL de acetato de etila e filtrados (0.45-µm). Posteriormente, o solvente foi evaporado no SpeedvacConcentrator (ThermoScientific). Todas as amostras foram submetidas a dois processos de derivatização, para aumentar a volatilidade dos compostos presentes nas amostras. Para a primeira derivatização, todas as amostras (secas) foram dissolvidas em 40 µL de piridina (Sigma-Aldrich), contendo metoxiaminahidroclorido (20 mg/mL de piridina, Sigma-Aldrich) foram incubadas por 2 h a 37 °C sob agitação de 950 rpm em Thermomixer (Bioer). Na segunda derivatização, foram adicionados 70 µL de N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA, Sigma-Aldrich) às amostras como estabelecido por Lisec et al. (2006) e estas foram incubadas por 30 min a 37 °C sob agitação de 950 rpm. Alíquotas de 100 µL foram transferidas para frascos de vidro e posteriormente, analisadas em cromatografia gasosa.

Para analisar as amostras, foi utilizado o sistema CG-EM TruTOF, Cromatógrafo Agilent, Technologies 7890A e espectrômetro TruTOF® HT TOFMS (LECO), equipado com uma coluna capilar com 30 m (DB-35 MS, Agilent Technologies) de acordo com Lisec et al. (2006). Um volume de 1 µL de cada

amostra foi injetado no modo splitless a 230 °C, carregado pelo gás hélio em fluxo contínuo de 2 mL/min. Durante o processo de análise das amostras no CG-EM, a temperatura inicial do forno foi mantida constante a 80°C e, posteriormente, foi estabelecido um aumento de 15°C/min até alcançar 330°C e mantida durante 6 min. Os cromatogramas tiveram a linha de base corrigida e sua deconvolução foi realizada utilizando o software ChromaTOF (LECO).

2.6 Atividades enzimáticas de β -1,3-glucanase e quitinase

Dois meios foram testados para a produção das enzimas: Meio 1 mineral não tamponado [2 g/L de K_2HPO_4 ; 0,64 g/L de KH_2PO_4 ; 1 g/L de $(NH_4)_2SO_4$; 1,1 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,6 g/L de extrato de levedura; 1 g/L de peptona (Sigma-Aldrich)]; e Meio 2 mineral não tamponado adicionado de 1% (p/v) de macerado de micéliodo fungo *F. verticillioides* utilizado como fonte de carbono. A fim de obter o micélio utilizado como fonte de carbono no meio 2, o fungo *F. verticillioides* foi inoculado sobre papel celofane depositado na superfície de meio BDA e cultivado durante 7 dias a 25 °C. Após o crescimento, o micélio foi retirado com o auxílio de uma espátula, seco em temperatura ambiente e macerado em nitrogênio líquido utilizando almofariz e pistilo, 1% (p/v) do pó obtido foi autoclavado separadamente e adicionado ao meio mineral não tamponado conforme descrito por You et al. (2016). Os isolados de *Trichoderma* spp. foram crescidos em meio BDA por 7 dias e cinco discos (5 mm de diâmetro) de micélio de cada isolado foram inoculados nos dois tipos de meio em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, incubados a 120 rpm, a 28 °C, por 48 h, em triplicata. O sobrenadante obtido foi estocado a - 20 °C e o experimento foi realizado em triplicata.

A atividade de β -1,3-glucanase foi determinada utilizando laminarina (Sigma-Aldrich) (Bara et al., 2003). A mistura foi preparada em microtubos, onde foram adicionados 10 μ L do filtrado contendo enzimas e 20 μ L de laminarina 0,25 % (p/v) diluída em acetato de sódio (50 mM, pH 5,0), e incubada a 40 °C no Thermomixer (Bioer) por 15 min (Ramada et al., 2010). Posteriormente, foram adicionados à mistura 100 μ L do reagente DNS (ácido 3,5-Dinitrosalicílico) (10 g de DNS; NaOH (2N); 300 g de sal Rochelle para 1 L) e esta foi incubada a 95 °C, por 5 min. Para a determinação dos açúcares redutores, 100 μ L da reação foram transferidos para microplacas de 96 poços (CELLSTAR® 96, Sigma-Aldrich) e a análise

espectrofotométrica foi realizada com a medição da absorbância em 540 nm utilizando o leitor de ELISA (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer). A curva padrão foi preparada com glicose (Sigma-Aldrich), com concentração estoque de 2 mg/mL. Todos os testes foram realizados com três replicatas. Uma unidade (U) de enzima foi definida como a quantidade em 1 mL do sobrenadante da cultura para liberar 1 µg de glicose em 40 °C por 15 min.

A atividade de quitinase foi determinada utilizando quitina coloidal (Sigma-Aldrich) como substrato conforme descrito por Ataei et al. (2016), com adaptações. A reação foi preparada com 100 µL do filtrado contendo enzimas, 100 µL do substrato contendo 1% de quitina, preparado em tampão fosfato (20 mM, pH 7,5). A temperatura de incubação foi 50 °C por 60 min (Ting & Chai et al., 2015). Para parar a reação foram adicionados 200 µL de DNS na mistura e incubada a 95 °C por 15 min. Um volume de 200 µL foi transferido para microplacas de 96 poços (Sigma-Aldrich) e a análise espectrofotométrica foi realizada pela medição da absorbância em 530 nm utilizando o leitor de ELISA. Todos os testes foram realizados com três replicatas. A curva padrão foi preparada com N-acetil-D-glicosamina (Sigma-Aldrich), com concentração estoque de 20 mg/mL.

2.7 Análises estatísticas

Para o ensaio de cultura dupla e atividade antagônica o delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Posteriormente, os dados de crescimento micelial da cultura dupla e da atividade antagônica foram submetidos à ANOVA e quando ocorreu significância, foi realizado o teste de Scott-Knott, ao nível de 1% ($p < 0,01$).

Para a atividade enzimática, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4 (dois tipos de meio de cultivo e quatro isolados de *Trichoderma* spp.). Posteriormente, os dados da atividade da β -1,3-glucanase e quitinase foram submetidos à ANOVA e quando ocorreu significância, foi realizado o teste de Tukey, ao nível de 1% ($p < 0,01$).

3. Resultados

3.1 Ensaio de cultura dupla

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram capazes de crescer e esporular sobre o micélio das quatro espécies de fungos fitopatogênicos, havendo diferenças significativas entre os isolados por meio do teste de Scott-Knott ($p < 0,01$).

No ensaio envolvendo *F. verticillioides*, os isolados 432F8C-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44361), 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362), 764F2C-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362), 762F17F-AC (*Trichoderma* sp. VIC 44362) e 26F9R-AC (*T. ovalisporum*) apresentaram os melhores resultados de inibição, com valores médios variando de 69,65 a 72,25% em relação ao tratamento controle (Tabela 2; Figura 1).

Em relação à inibição de *C. karstii*, todos os isolados foram superiores ao tratamento controle e não diferiram estatisticamente entre si. Os valores médios de inibição variaram entre 58,09 a 65,07% (Tabela 2).

Para o *C. laticiphilum* os isolados 432F8C-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44361), 762F17F-AC (*Trichoderma* sp. VIC 44362), 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362), 764F2C-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362), 610F5C-AM (*T. erinaceum*), 3F13C-AC (*T. koningiopsis*), 21F13C-AC (*T. koningiopsis*), 24F6C-AM (*T. koningiopsis*), 247F12R-AC (*T. harzianum*), 26F9R-AC (*T. ovalisporum*) e 508F9R-AC (*T. ovalisporum*) apresentaram maiores valores de inibição, com médias entre 62,64 a 65,64% em comparação ao tratamento controle (Tabela 2).

A análise da inibição de *C. lindemuthianum* também evidenciou que todos os isolados foram superiores ao tratamento controle, mas sem diferenças estatística entre si, conforme observado para o fitopatógeno *C. karstii*. Os valores médios de inibição variaram entre 48,43 a 56,70% (Tabela 2).

Os isolados 432F8C-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44361), 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362), 764F2C-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362), 762F17F-AC (*Trichoderma* sp. VIC 44362) e 26F9R-AC (*T. ovalisporum*) destacaram-se nessa análise por estarem presentes entre os melhores resultados considerando-se os quatro fitopatógenos *F. verticillioides*, *C. karstii*, *C. laticiphilum* e *C. lindemuthianum* (Tabela 2; Figura 1).

Tabela 2. Valores médios de crescimento e porcentagem de inibição do crescimento micelial de *F. verticillioides*, *C. karstii*, *C. latipophilum* e *C. lindemuthianum* obtidos por meio do ensaio de cultura dupla com os isolados de *Trichoderma* spp.

Isolados	Nome científico	Crescimento Micelial (mm)				Inibição do Crescimento Micelial(%)			
		F. v	C. k	C. l	C. li	F. v	C. k	C. l	C. li
Controle		85,00 a	85 a	78,69 a	42,33 a				
(265F6C-AM)	<i>T. koningiopsis</i>	32,69 d	33,45 b	31,28 b	21,83 b	61,54	60,65	60,25	48,43
(4F9R-AC)	<i>T. ovalisporum</i>	29,08 e	34,76 b	30,85 b	19,83 b	65,79	59,11	60,80	53,15
(26F9R-AC)	<i>T. ovalisporum</i>	25,64 g	33,00 b	27,77 c	19,33 b	69,84	61,18	64,71	54,33
(763F25F-AM)	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44362	24,12 g	29,69 b	27,04 c	20,00 b	71,62	65,07	65,64	52,75
(23F18C-AC)	<i>T. harzianum</i>	35,95 c	33,23 b	33,37 b	20,17 b	57,71	60,91	57,59	52,35
(610F5C-AM)	<i>T. erinaceum</i>	27,18 f	33,17 b	29,25 c	19,33 b	68,02	60,98	62,83	54,33
(58F6C-AM)	<i>T. koningiopsis</i>	38,49 b	32,27 b	31,58 b	19,83 b	54,72	62,04	59,87	53,15
(619F6C-AM)	<i>T. koningiopsis</i>	29,54 e	35,86 b	31,64 b	20,00 b	65,25	57,81	59,79	52,75
(84F15C-AM)	<i>T. virens</i>	30,23 e	32,80 b	30,78 b	20,83 b	64,44	61,41	60,88	50,79
(24F6C-AM)	<i>T. koningiopsis</i>	27,07 f	31,54 b	27,25 c	21,17 b	68,15	62,89	65,37	49,99
(597F2C-AC)	<i>T. spirales</i>	28,88 e	32,21 b	30,86 b	22,17 b	66,02	62,11	60,78	47,63
(765F5C-AM)	<i>T. harzianum</i>	28,80 e	31,27 b	32,14 b	19,33 b	66,12	63,21	59,16	54,33
(764F2C-AM)	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44362	23,59 g	31,97 b	29,22 c	18,33 b	72,25	62,39	62,87	56,70
(22F20C-AC)	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44364	30,05 e	31,75 b	31,76 b	22,17 b	64,65	62,65	59,64	47,63
(247F12R-AC)	<i>T. harzianum</i>	27,52 f	32,98 b	28,34 c	19,67 b	67,62	61,20	63,99	53,53
(20F5C-AM)	<i>T. erinaceum</i>	39,87 b	33,45 b	31,05 b	19,17 b	53,09	60,65	60,54	54,71
(815F11R-AM)	<i>T. koningiopsis</i>	30,27 e	32,24 b	30,71 b	20,00 b	64,39	62,07	60,97	52,75
(432F8C-AM)	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44361	25,8 g	32,30 b	28,51 c	19,17 b	69,65	62,00	63,77	54,71
(549F18C-AC)	<i>T. harzianum</i>	31,15 e	35,62 b	31,12 b	18,67 b	63,35	58,09	60,45	55,89
(3F13C-AC)	<i>T. koningiopsis</i>	27,52 f	33,04 b	29,4 c	21,13 b	67,62	61,13	62,64	50,08
(508F9R-AC)	<i>T. ovalisporum</i>	28,77 e	31,21 b	27,80 c	19,50 b	66,15	63,28	64,67	53,93
(21F13C-AC)	<i>T. koningiopsis</i>	31,59 e	30,33 b	28,04 c	21,00 b	62,84	64,32	64,37	50,39
(245F13C-AC)	<i>T. koningiopsis</i>	26,75 f	30,66 b	30,44 b	21,17 b	68,53	63,93	61,32	49,99
(762F17F-AC)	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44362	24,87 g	34,06 b	27,19 c	18,67 b	70,74	59,93	65,45	55,89
(17F5R-AM)	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44363	35,00 c	33,86 b	34,66 b	20,66 b	58,82	60,16	55,95	51,19
CV (%)		4,06	5,75	5,88	7,29				

*F.v (*Fusarium verticillioides*); C. k (*Colletotrichum karstii*); C. l (*Colletotrichum latipophilum*); C. li (*Colletotrichum lindemuthianum*).

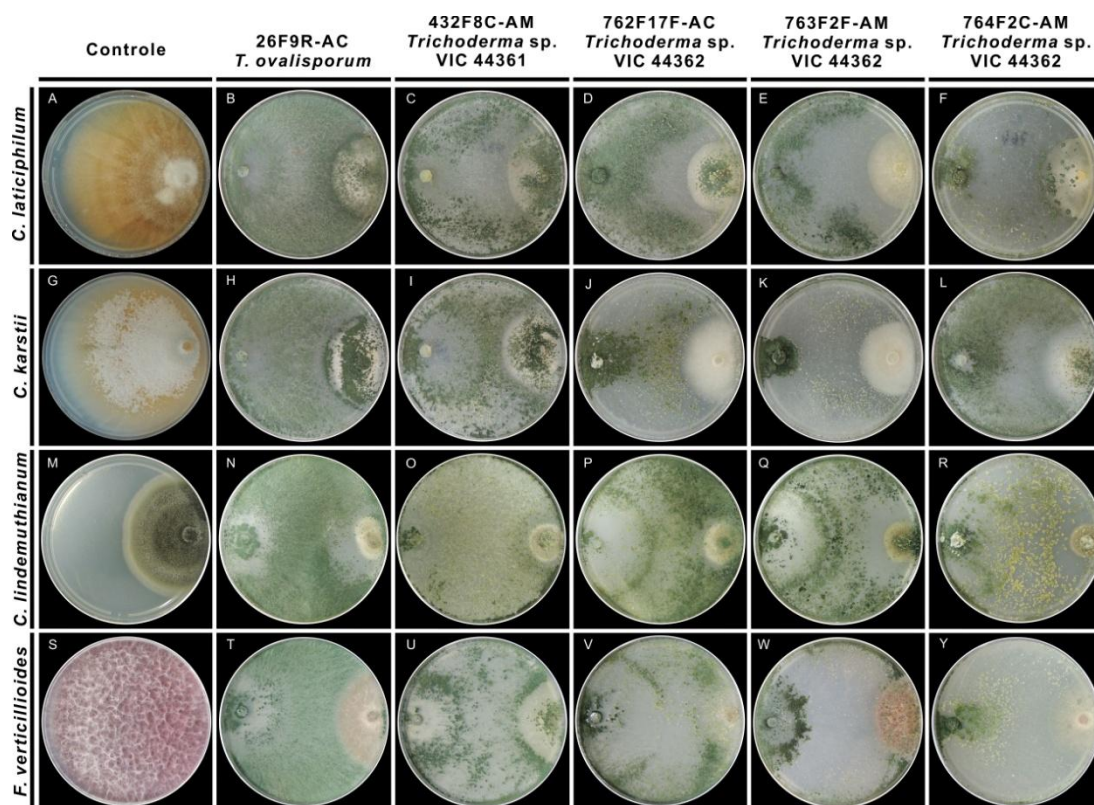


Figura 1. Cultura dupla dos isolados de *Trichoderma* spp. versus fungos fitopatogênicos. Culturas crescidas em meio BDA dos isolados 26F9R-AC (*T. ovalisporum*) (b, h, n, t), 432F8C-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44361) (c, i, o, u), 762F17F-AC (*Trichoderma* sp. VIC 44362) (d, j, p, v), 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362) (e, k, q, w) e 764F2C-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362) (f, l, r, y) versus *C. laticipilum* (b, c, d, e, f), *C. karstii* (h, i, j, k, l), *C. lindemuthianum* (n, o, p, q, r) e *F. verticillioides* (t, u, v, w, y).

3.2 Atividade antagônica a partir do filtrado liofilizado

Os extratos de *Trichoderma* spp. apresentaram atividade antimicrobiana contra as quatro espécies de fitopatógenos (*F. verticillioides*, *C. karstii*, *C. laticiphilum* e *C. lindemuthianum*), havendo diferenças significativas entre os isolados por meio do teste de Scott-Knott ($p < 0,01$).

No ensaio com *F. verticillioides*, o isolado 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363) destacou-se com a maior média de inibição do crescimento micelial (42,94%), seguido dos isolados 24F6C-AM (*T. koningiopsis*), 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362) e 245F13C-AC (*T. koningiopsis*) que apresentaram média de inibição do crescimento micelial igual a 23,39, 24,62 e 24,05%, respectivamente (Tabela 3).

Para o *C. karstii* o isolado 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363) apresentou a maior inibição (59,94%), seguido do isolado 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362), com a segunda maior média de inibição (43,40%) (Tabela 3).

Os dados de inibição de *C. laticiphilum* evidenciaram o melhor resultado para o isolado 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363), com porcentagem de inibição do crescimento micelial igual a 62,98%. Além deste isolado, o isolado 245F13C-AC (*T. koningiopsis*) apresentou o segundo melhor resultado de inibição, com inibição do crescimento micelial igual a 32,88% (Tabela 3).

Para *C. lindemuthianum*, os isolados 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363) e 24F6C-AM (*T. koningiopsis*) apresentaram as maiores médias de inibição igual a 89,73 e 88,02%, respectivamente. Outro interessante isolado foi 58F6C-AM (*T. koningiopsis*), que apresentou valores médios de 65,21% (Tabela 3).

O isolado 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363) destacou-se entre os demais, por ter apresentado as maiores porcentagens de inibição do crescimento micelial dos quatro fitopatógenos. Os isolados 24F6C-AM (*T. koningiopsis*), 245F13C-AC (*T. koningiopsis*) e 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362) também demonstraram ser promissores para o biocontrole (Figura 2).

Tabela 3. Valores médios de crescimento e porcentagem de inibição do crescimento micelial de *F. verticillioides*, *C. karstii*, *C. laticiphilum* e *C. lindemuthianum* pelo método de difusão em ágar utilizando o liofilizado de culturas com os isolados de *Trichoderma* spp. obtidos por fermentação.

Extratos liofilizados ¹		Crescimento Micelial (mm)				Inibição do Crescimento Micelial (%)			
	Nome científico	F. v	C. k	C. l	C. li	F. v	C. k	C. l	C. li
Controle - DMSO		85,0 a	63,68 a	56,29 a	58,43 a				
(265F6C-AM)	<i>T. koningiopsis</i>	85,0 a	51,37 e	46,95 e	48,67 c	0,00	19,33	16,59	16,70
(4F9R-AC)	<i>T. ovalisporum</i>	85,0 a	55,35 d	51,08 c	50,33 b	0,00	13,08	9,26	13,86
(26F9R-AC)	<i>T. ovalisporum</i>	81,63 b	54,15 d	52,53 b	46,67 c	3,96	14,97	6,68	20,13
(763F25F-AM)	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44362	64,07 e	36,04 g	42,92 g	45,08 d	24,62	43,40	23,75	22,85
(23F18C-AC)	<i>T. harzianum</i>	85,0 a	59,81 b	53,40 b	48,83 c	0,00	6,08	5,13	16,43
(610F5C-AM)	<i>T. erinaceum</i>	71,68 c	59,54 b	51,01 c	44,25 d	15,67	6,50	9,38	24,27
(58F6C-AM)	<i>T. koningiopsis</i>	72,67 c	52,73 f	46,24 e	20,33 h	14,51	17,20	17,85	65,21
(619F6C-AM)	<i>T. koningiopsis</i>	69,84 d	51,35 e	44,75 f	34,83 e	17,84	19,36	20,50	40,39
(84F15C-AM)	<i>T. virens</i>	85,00 a	57,67 c	56,13 a	50,50 b	0,00	9,44	0,28	13,57
(24F6C-AM)	<i>T. koningiopsis</i>	65,12 e	46,50 f	41,07 h	7,00 i	23,39	26,98	27,04	88,02
(597F2C-AC)	<i>T. spirales</i>	85,00 a	56,74 c	55,35 a	51,62 b	0,00	10,90	1,67	11,65
(765F5C-AM)	<i>T. harzianum</i>	85,00 a	57,80 c	55,74 a	48,08 c	0,00	9,23	0,98	17,71
(764F2C-AM)	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44362	71,56 c	53,38 e	50,24 c	50,23 b	15,81	16,17	10,75	14,03
(22F20C-AC)	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44364	85,00 a	57,96 c	54,69 a	50,23 b	0,00	8,98	2,84	14,03
(247F12R-AC)	<i>T. harzianum</i>	81,20 b	60,00 b	56,16 a	47,63 c	4,47	5,78	0,23	18,48
(20F5C-AM)	<i>T. erinaceum</i>	81,87 b	54,86 d	48,49 d	50,92 b	3,68	13,85	13,86	12,85
(815F11R-AM)	<i>T. koningiopsis</i>	85,00 a	58,77 b	52,78 b	43,17 d	0,00	7,71	6,24	26,12
(432F8C-AM)	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44361	85,00 a	57,60 c	54,65 a	50,08 b	0,00	9,55	2,91	14,29
(549F18C-AC)	<i>T. harzianum</i>	85,00 a	58,37 c	55,92 a	49,00 c	0,00	8,34	0,66	16,14
(3F13C-AC)	<i>T. koningiopsis</i>	71,00 c	44,74 f	39,81 i	27,25 g	16,47	29,74	29,28	53,36
(508F9R-AC)	<i>T. ovalisporum</i>	84,41 a	57,76 c	49,31 d	47,17 c	0,69	9,30	12,40	19,27
(21F13C-AC)	<i>T. koningiopsis</i>	83,49 b	52,99 e	50,57 c	28,17 g	1,78	16,79	10,16	51,79
(245F13C-AC)	<i>T. koningiopsis</i>	64,56 e	47,00 f	37,78 j	30,24 f	24,05	26,19	32,88	48,25
(762F17F-AC)	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44362	68,55 d	57,18 c	50,34 c	50,67 b	19,35	10,21	10,57	13,28
(17F5R-AM)	<i>Trichoderma</i> sp. VIC 44363	48,50 f	25,51 h	20,84 k	6,00 i	42,94	59,94	62,98	89,73
CV (%)		1,89	2,32	2,22	3,54				

*F.v (*Fusarium verticillioides*); C. k (*Colletotrichum karstii*); C. l (*Colletotrichum laticiphilum*); C. li (*Colletotrichum lindemuthianum*).

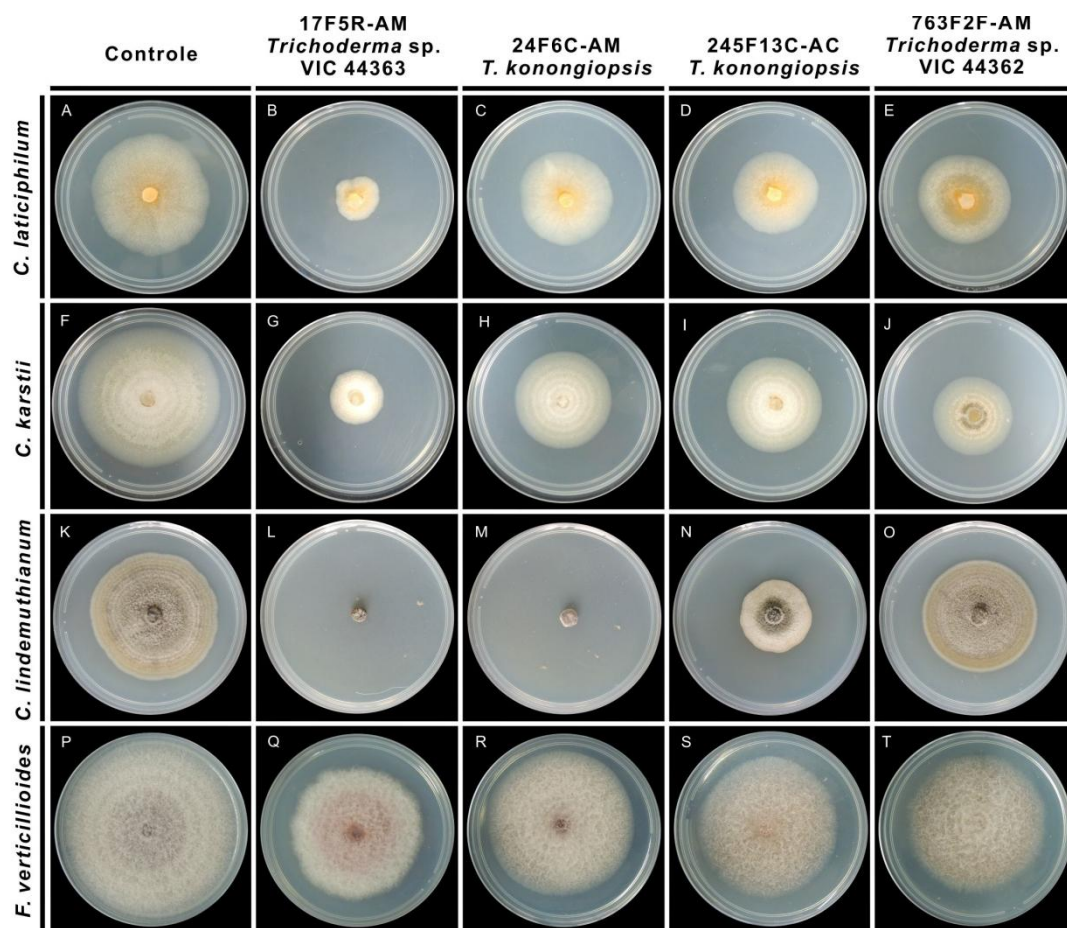


Figura 2. Efeito antagonista do liofilizado das culturas dos *Trichoderma* spp. versus fungos fitopatogênicos. Os isolados 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363) (b, g, l, q), 24F6C-AM (*T. konongiopsis*) (c, h, m, r), 245F13C-AC (*T. konongiopsis*) (d, i, n, s) e 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362) (e, j, o, t) versus fungos fitopatogênicos *C. laticiphilum* (b, c, d, e), *C. karstii* (g, h, i, j), *C. lindemuthianum* (l, m, n, o) e *F. verticillioides* (q, r, s, t).

3.3 Inibição da germinação dos conídios e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) a partir do extrato bruto

O isolado 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363) apresentou os melhores resultados de inibição, com capacidade de inibir todos os fitopatógenos analisados, com valores médios de CMI igual a 3000; 62,5; 31,24; e 3,91 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *F. verticillioides*, *C. karstii*, *C. laticiphilum* e *C. lindemuthianum*, respectivamente (Tabela 4).

O isolado 24F6C-AM (*T. koningiopsis*) foi capaz de inibir a germinação dos conídios de *C. karstii* (6000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *C. lindemuthianum* (3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$); contudo, para *F. verticillioides* não foi observada a inibição e, conseqüentemente, não foi possível determinar a CMI (Tabela 4). O isolado 245F13C-AC, também da espécie *T. koningiopsis*, foi capaz de inibir somente *C. lindemuthianum* (6000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabela 4). O isolado 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362) foi capaz de inibir somente a germinação dos conídios do *C. lindemuthianum* (6000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito dos extratos brutos de *Trichoderma* spp. na inibição da germinação dos conídios dos fungos fitopatogênicos.

<i>Trichoderma</i> spp.	Patógeno							
	<i>F. verticillioides</i>		<i>C. karstii</i>		<i>C. laticiphilum</i>		<i>C. lindemuthianum</i>	
	% ^a	CMI ^b	%	CMI	%	CMI	%	CMI
17F5R-AM	100	3000	100	62,5	100	31,24	100	3,91
24F6C-AM	- ^c	-	100	6000	-	-	100	3000
245F13C-AC	-	-	-	-	-	-	100	6000
763F25F-AM	-	-	-	-	-	-	100	6000

^aPorcentagem de inibição da germinação dos esporos. ^bConcentração mínima inibitória (CMI) (X $\mu\text{g/mL}$). ^cNão ativo. As concentrações variaram de 6000 a 0,19 $\mu\text{g/mL}$ dependendo do fitopatógeno a ser controlado. A porcentagem da germinação dos esporos foi calculada baseada na contagem de 100 conídios em três replicatas.

3.4 Perfil dos metabólitos secundários bioativos

Os quatro isolados de *Trichoderma* spp. selecionados com base na sua eficiência antagônica contra os fitopatógenos, descrita anteriormente, foram submetidos a análise de seus perfis de metabólitos secundários por meio da técnica CG-EM.

Os cromatogramas obtidos dos extratos brutos dos quatro isolados 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363), 24F6C-AM (*T. koningiopsis*), 245F13C-AC (*T. koningiopsis*) e 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362) são mostrados na Figura 3. A análise dos cromatogramas gerados revelou perfis de metabólitos distintos entre os mesmos (Figura 3).

O isolado 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363), que apresentou os melhores resultados em relação ao antagonismo dos quatro fitopatógenos tem perfil diferente dos demais cromatogramas analisados, com picos majoritários nos tempos de retenção entre 800 e 1000 s (Figura 3B). Os isolados 24F6C-AM (*T. koningiopsis*) e 245F13C-AC (*T. koningiopsis*), apresentam perfis próximos, caracterizados por um envelope de picos sobrepostos entre 800 e 1000 s, em uma disposição diversa daquela verificada para o isolado 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363). O isolado 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362) apresentou um perfil caracterizado pela predominância de picos nos tempos de retenção entre 400 e 800 s (Figura 3E). Devido ao grande número de picos sobrepostos, não foi possível analisar com precisão as massas específicas dos metabólitos produzidos pelos isolados testados e a identificação automática dos picos também não foi realizada, pois não há uma base de dados para CG-EM de metabólitos de fungos, como ocorre para o metaboloma de plantas.

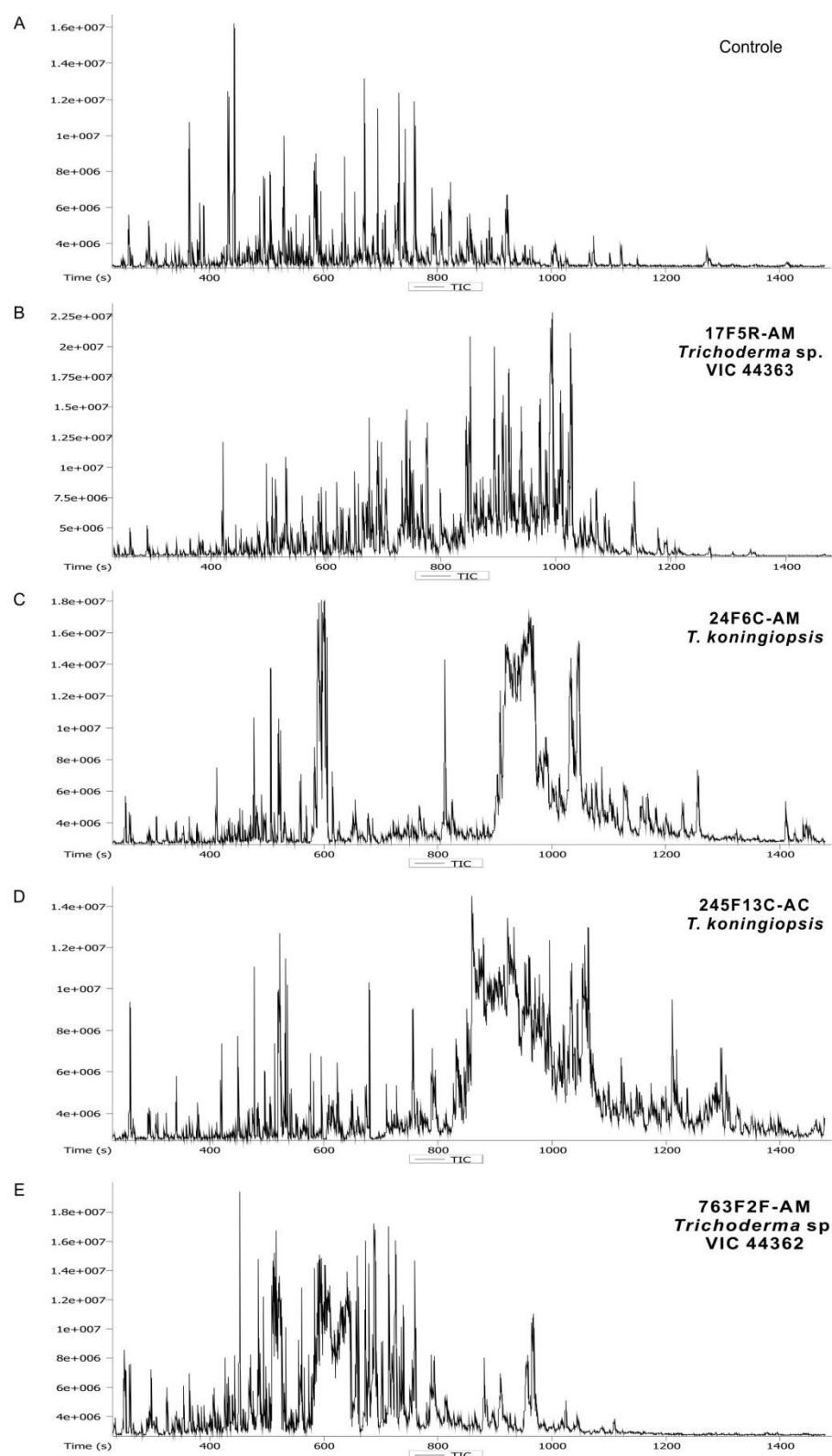


Figura 3. Cromatogramas totais da corrente de íons totais - *Total ion current chromatograms* (TIC). Extratos brutos obtidos utilizando acetato de etila do meio não inoculado (controle) (a); isolado 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363) (b); 24F6C-AM (*T. koningiopsis*) (c); 245F13C-AC (*T. koningiopsis*) (d) e; 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362) (e).

3.5 Atividade enzimática relacionada ao micoparasitismo

Os quatro isolados apresentaram atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase nos dois tipos de meio analisados. A avaliação dos resultados da atividade da β -1,3-glucanase evidenciaram a interação significativa entre os dois meios de cultivo e os quatro isolados de *Trichoderma* spp. ($p < 0,01$). A análise dos resultados de atividade da quitinase não indicou interação significativa entre os dois fatores (meios de cultivo e isolados de *Trichoderma* spp.) ($p > 0,05$).

Os filtrados do meio de cultivo 2 (com presença de micélio do fungo *F. verticillioides*) apresentaram as maiores médias de atividade da β -1,3-glucanase em relação àqueles obtidos com o meio 1 (controle), exceto para os filtrados do isolado 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363) que não apresentaram diferenças estatística entre os meios. No meio de cultivo 2, o filtrado do isolado 24F6C-AM (*T. koningiopsis*) apresentou a maior média de atividade enzimática, igual a 837,67 U mL⁻¹, diferindo estatisticamente dos isolados 245F13C-AC (*T. koningiopsis*) e 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362), com médias de 600,27 e 614,43 U mL⁻¹, respectivamente. A atividade da β -1,3-glucanase calculada para os filtrados desses três isolados diferiu daquela apresentada pelo isolado 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363) que apresentou valor médio igual a 250,51 U mL⁻¹. Considerando somente o meio 1 (controle), os quatro isolados não apresentaram diferenças entre si, com valores médios variando entre 129,93 e 169,70 U mL⁻¹ (Figura 4).

Para a atividade da quitinase não foram observadas diferenças significativas entre os isolados de *Trichoderma* spp. ($p > 0,05$). Os valores médios no meio de cultivo 1 para os isolados 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363), 24F6C-AM (*T. koningiopsis*), 245F13C-AC (*T. koningiopsis*) e 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362) foi igual a 168,12; 197,27; 173,45 e 196,78 U mL⁻¹, respectivamente (Figura 5). Os valores médios no meio de cultivo 2 para os isolados 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363), 24F6C-AM (*T. koningiopsis*), 245F13C-AC (*T. koningiopsis*) e 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362) foi igual a 207,59; 231,99; 233,77 e 242,57 U mL⁻¹, respectivamente (Figura 5).

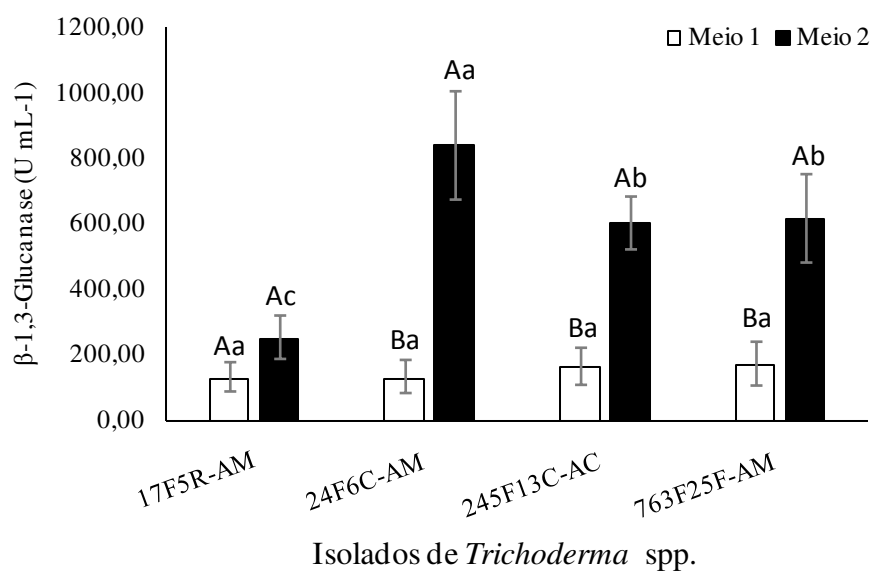


Figura 4. Atividade da β -1,3-glucanase de quatro isolados de *Trichoderma* spp. O Meio de cultivo 1 representa o tratamento controle e o Meio de cultivo 2 representa o tratamento com adição de micélio de *F. verticillioides* como fonte de carbono. Letras maiúsculas comparam cada isolado com seus respectivos meios e letras minúsculas comparam os isolados em cada meio. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. As barras representam o desvio padrão. N=3.

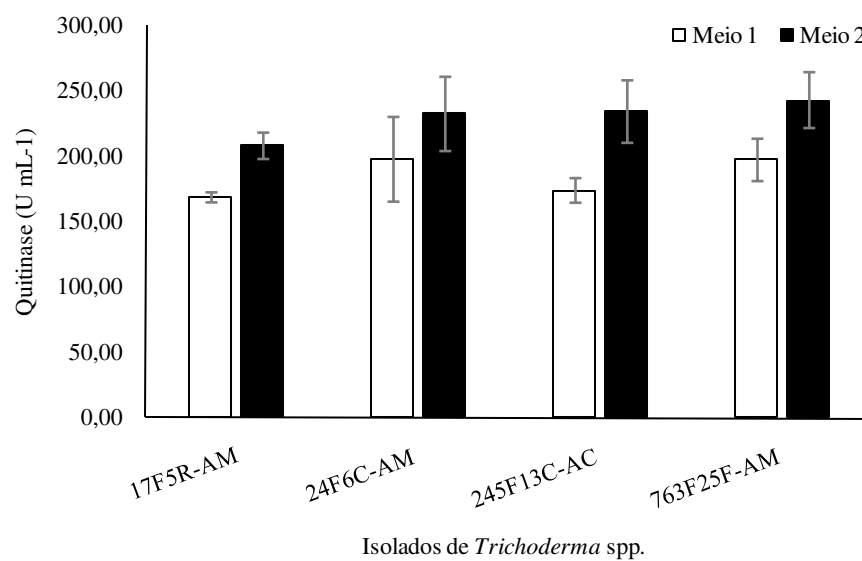


Figura 5. Atividade da quitinase de quatro isolados de *Trichoderma* spp. O Meio de cultivo 1 representa o tratamento controle e o Meio de cultivo 2 representa o tratamento com adição de micélio de *F. verticillioides* como fonte de carbono. As barras representam o desvio padrão. N=3.

4. Discussão

Fungos do gênero *Trichoderma* estão entre os micro-organismos mais usados no biocontrole (You et al., 2016), sendo que mais de 60% dos biofungicidas registrados à base de fungos contêm isolados desse gênero (Verma et al., 2007). De acordo com Chaverri et al. (2011) espécies de *Trichoderma* encontradas em *Hevea* spp. no seu local de origem podem apresentar potencial para serem usadas como agentes do biocontrole de fitopatógenos. Nossos resultados obtidos a partir dos isolados de *Trichoderma* spp. endofíticos de seringueiras nativas da Amazônia confirmam o potencial para uso no controle de fungos fitopatogênicos, com maior destaque para o isolado 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363).

Na análise de cultura dupla, os isolados 432F8C-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44361), 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362), 764F2C-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362), 762F17F-AC (*Trichoderma* sp. VIC 44362) e 26F9R-AC (*T. ovalisporum*) apresentaram os melhores resultados de inibição dos fitopatógenos *C. karstii*, *C. laticiphilum*, *C. lindemuthianum* e *F. verticillioides* (Tabela 2; Figura 1). A sobreposição dos isolados de *Trichoderma* spp. as colônias dos fitopatógenos é nitidamente observada (Figura 1), resultado da ação parasítica destes isolados de *Trichoderma* spp. Resultados similares ao observado na presente pesquisa foram reportados em outros estudos envolvendo espécies do gênero *Trichoderma* como agente de biocontrole, conforme observado para *Trichoderma hamatum* que reduziu o crescimento da colônia no ensaio de cultura dupla contra *Pyrenophora tritici-repentis* (Larran et al., 2016) e *Trichoderma viride* que inibiu o crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* (John et al., 2010).

As espécies *Trichoderma* sp. VIC 44362 (isolados 763F25F-AM, 764F2C-AM e 762F17F-AC) e *Trichoderma* sp. VIC 44361 (isolado 432F8C-AM), ambas estudadas pela primeira vez quanto ao potencial para o biocontrole, são filogeneticamente relacionadas à espécie *T. atroviride* (Brito et al., dados não publicados). Espécies como *T. atroviride* são conhecidas por produzir compostos voláteis antimicrobianos, como 6-pentil- α -pirona (6-PP) (Stoppacher et al., 2010). Adicionalmente, Toghueo et al. (2016) também observaram que *T. atroviride* endofíticos inibiu o crescimento micelial de *Fusarium solani* em placa. De acordo

com esses mesmos autores, este potencial de inibição está relacionado a compostos antimicrobianos voláteis produzidos por estes isolados endofíticos.

Espécies do gênero *Trichoderma* caracterizam-se por apresentarem resistência a inibidores produzidos por outros microorganismos (Daryaei et al., 2016). Além disso, são capazes de atuar por meio da produção de compostos voláteis e não-voláteis, competição por espaço e nutrientes, atividade enzimática e parasitismo (Brito et al., 2014), o que pode ter contribuído diretamente para os isolados (p.ex. 432F8C-AM, 763F25F-AM, 764F2C-AM, 762F17F-AC e 26F9R-AC) terem inibido o crescimento micelial dos fitopatógenos no presente estudo. Segundo Carvalho et al. (2014), um dos principais mecanismos de ação antagonista do gênero *Trichoderma* se deve a maior velocidade em colonizar os espaços e competir pelos nutrientes, o que contribui para inibir os fitopatógenos. A habilidade de espécies de *Trichoderma* suprimir o crescimento de fitopatógenos *in vitro* torna-os candidatos para futuros testes *in vivo* (Valenzuela et al., 2015).

No presente estudo, ao testarmos o filtrado liofilizado do cultivo dos isolados, observamos as maiores porcentagens de inibição do crescimento micelial de *F. verticillioides* (42,94%), *C. karstii* (59,94%), *C. laticiphilum* (62,98%) e *C. lindemuthianum* (89,73%) com o isolado 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363). Adicionalmente, o filtrado liofilizado de 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363) apresentou os menores valores de concentração mínima inibitória (CMI) frente aos quatro fitopatógenos. Esses resultados sugerem que as inibições do crescimento em placa e da germinação de esporos estão relacionadas com metabólitos secundários produzidos por essa espécie. De fato, *Trichoderma* spp. apresentam potencial para a produção de metabólitos secundários, os quais apresentam amplo espectro de ação antimicrobiana, como os peptídeos não-ribossômicos (p.ex. *peptaibols* e sideróforos), policetídeos, terpenoides, pironas (p.ex. 6-pentil-pirona) e isocianatos (Zeilinger et al., 2016).

A espécie *Trichoderma* sp. VIC 44363 (isolado 17F5R-AM) é filogeneticamente relacionada à espécie *Trichoderma brevicompactum*, ambos pertencentes ao clado *Brevicompactum* (Brito et al., dados não publicados). *Trichoderma brevicompactum* é reportada como uma espécie capaz de produzir moléculas de tricotecenos (p.ex. tricodermim), com potencial antifúngico e inibidores de síntese protéica (Shentu et al., 2014a; Shentu et al., 2014b). A

capacidade de produção de metabólitos antifúngicos por espécies de fungos pertencentes ao clado *Brevicompectum* corrobora com o fato de *Trichoderma* sp. VIC 44363 apresentar excelentes resultados de inibição dos patógenos nos ensaios que envolvem a produção de metabólitos no presente estudo.

De fato, espécies do gênero *Trichoderma* apresentam diversos metabólitos secundários capazes de inibir o crescimento de fitopatógenos, seja através de compostos orgânicos voláteis ou por compostos orgânicos não-voláteis (Vinale et al., 2013, 2014; Bae et., 2016). No presente estudo, o perfil do metaboloma dos isolados 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363), 24F6C-AM (*T. koningiopsis*), 245F13C-AC (*T. koningiopsis*) e 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362) evidenciaram contrastes que podem estar relacionadas com as estratégias químicas desses fungos endofíticos frente aos fitopatógenos (Figura 3). Devido à ausência de uma base de dados dedicada a metabólitos de fungos detectados por CG-EM, não foi possível realizar a identificação confiável dos metabólitos presente nas amostras. Mais estudos serão realizados para correta identificação destes metabólitos produzidos em meio BD, utilizando as técnicas de CG-EM e também CL-EM (Cromatografia líquida-espectrômetro de massas). Além disso, esses extratos serão submetidos a fracionamentos para determinar de fato que composto pode estar atuando na inibição dos fitopatógenos analisados.

Trichoderma spp. são conhecidos pela síntese de uma variedade de enzimas hidrolíticas (p.ex. quitinase, glucanase, xilanase e protease) relacionadas a degradação da parede celular de outros fungos (Carvalho, 2015; Vinodkumar et al., 2017), sendo o estudo destas enzimas uma ferramenta útil para identificação de candidatos promissores para o controle biológico (Lopes et al., 2012). No presente estudo os isolados mais promissores para uso no biocontrole (p.ex. 17F5R-AM, 763F25F-AM, 24F6C-AM e 245F13C-AC) apresentaram a capacidade de produzir β -1,3-glucanase e quitinase (Figura 4 e 5). Várias enzimas líticas, incluindo β -glucanases, quitinases e proteases, são produzidas durante ação micoparásita de *Trichoderma* spp. agindo de forma sinérgica na degradação da parede celular do hospedeiro (Martin et al., 2007). Guigón-López et al. (2015) avaliaram a expressão de enzimas relacionadas ao micoparasitismo durante o parasitismo de *Trichoderma asperellum* contra o patógeno *Phymatotrichopsis omnivora*, agente etiológico da podridão das raízes em algodão. Esses autores reportaram que os resultados da

análise de expressão de genes demonstram claramente que o micoparasitismo é estreitamente relacionado à expressão simultânea de quitinase e β -1,3-glucanase.

A alta atividade das enzimas hidrolíticas quitinase, celulase, protease e β -1,3-glucanase de *Trichoderma asperellum* demonstraram elevado potencial para o controle biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (Saravanakumar et al., 2016). Adicionalmente, β -1,3-glucanase foi reportada como uma enzima chave para redução do mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Geraldine et al., 2013). Estudos prévios também demonstraram que isolados de *Trichoderma* spp. foram capazes de produzir quitinases e β -1,3-glucanase durante a interação com *Sclerotium rolfii* e *Pythium aphanidermatum*, sendo assim capazes de degradar os dois principais componentes da parede celular desses fitopatógenos (Rao et al., 2016).

Em conclusão, nossos resultados revelam o potencial biotecnológico dos isolados de *Trichoderma* spp. endofíticos de *Hevea* spp. da Amazônia brasileira, com perspectivas para uso no biocontrole. Os isolados 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363), 763F25F-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44362), 24F6C-AM (*T. koningiopsis*) e 245F13C-AC (*T. koningiopsis*) apresentam potencial para controlar os fitopatógenos *C. karstii*, *C. laticiphilum*, *C. lindemuthianum* e *F. verticillioides*; com destaque para o isolado 17F5R-AM (*Trichoderma* sp. VIC 44363) que possui a capacidade de produzir metabólitos secundários com elevada atividade antimicrobiana. Pesquisas futuras sobre *Trichoderma* sp. VIC 44363 como bioformulante podem otimizar o seu potencial como agentes de biocontrole de fungos fitopatogênicos.

Referências

- Andargie, M., Congyi, Z., Yun, Y., Li, J. (2017). Identification and evaluation of potential bio-control fungal endophytes against *Ustilagonoidea virens* on rice plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 33, n. 6, p. 120.
- Ataei, A., Zamani, M., Motallebi, M., Haghebeen, K., Ziaei, M., Jourabchi, E. (2016). Increased antifungal activity of Chit42 from *Trichoderma atroviride* by addition of a chitin binding domain. *Tropical Plant Pathology*, v. 41, n. 6, p. 350-356.
- Bae, S. J., Mohanta, T. K., Chung, J. Y., Ryu, M., Park, G., Shim, S., ... & Kim, J. J. (2016). *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. *Biological Control*, v. 92, p. 128-138.
- Bara, M. T. F., Lima, A. L., Ulhoa, C. J. (2003). Purification and characterization of an exo- β -1, 3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 219, n. 1, p. 81-85.
- BRASIL, (2013). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/restrito/lerNoticia.asp?id=2085>
- Brito, J. P., Ramada, M. H., de Magalhães, M. T., Silva, L. P., Ulhoa, C. J. (2014). Peptaibols from *Trichoderma asperellum* TR356 strain isolated from Brazilian soil. *Springer Plus*, v. 3, n. 1, p. 600.
- Cai, Z. Y., Liu, Y. X., Shi, Y. P., Mu, H. J., Li, G. H. (2016). First Report of Leaf Anthracnose Caused by *Colletotrichum karstii* of Rubber Tree in China. *Plant Disease*, v. 100, n. 12, p. 2528.
- Carvalho, D. D. C., Geraldine, A. M., Lobo Junior, M., Mello, S. C. M. (2015). Biological control of White mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 50, n. 12, p. 1220-1224.

- Carvalho, D. D., Lobo Junior, M., Martins, I., Inglis, P. W., Mello, S. (2014). Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. *Tropical Plant Pathology*, v. 39, n. 5, p. 384-391.
- Campanile, G., Ruscelli, A., Luisi, N. (2007). Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in planta tests. *European Journal of Plant Pathology*, v. 117, n. 3, p. 237-246.
- Chaverri, P., Gazis, R. O., Samuels, G. J. (2011). *Trichoderma amazonicum*, a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. *Mycologia*, v. 103(1), 139-151.
- Chen, J. L., Sun, S. Z., Miao, C. P., Wu, K., Chen, Y. W., Xu, L. H., ... & Zhao, L. X. (2016). Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. *Journal of Ginseng Research*, v. 40, n. 4, p. 315-324.
- CLSI (2008). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 18th informational supplement, M100-S18. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Daryaei, A., Jones, E. E., Ghazalibiglar, H., Glare, T. R., Falloon, R. E. (2016). Effects of temperature, light and incubation period on production, germination and bioactivity of *Trichoderma atroviride*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 120, n. 4, p. 999-1009.
- De Souza, J. T., Trocoli, R. O., Monteiro, F. P. (2016). Plants from the Caatinga biome harbor endophytic *Trichoderma* species active in the biocontrol of pineapple fusariosis. *Biological Control*, v. 94, p. 25-32.
- Evidente, A., Cabras, A., Maddau, L., Serra, S., Andolfi, A., Motta, A. (2003). Viridepyronone, a new antifungal 6-substituted 2 h-pyran-2-one produced by *Trichoderma viride*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 24, p. 6957-6960.

- Gafni, A., Calderon, C.E., Harris, R., Buxdorf, K., Dafa-Berger, A., Zeilinger-Reichert, E., Levy, M. (2015). Biological control of the cucurbitpowdery mildew pathogen *Podosphaera xanthii* by means of the epiphytic fungus *Pseudozyma aphidis* and parasitism as a mode of action. *Frontiers in Plant Science*, v. 6.
- Geraldine, A. M., Lopes, F. A. C., Carvalho, D. D. C., Barbosa, E. T., Rodrigues, A. R., Brandão, R. S., ... & Junior, M. L. (2013). Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. *Biological Control*, v. 67, n. 3, p. 308-316.
- Guigón-López, C., Vargas-Albores, F., Guerrero-Prieto, V., Ruocco, M., Lorito, M. (2015). Changes in *Trichoderma asperellum* enzyme expression during parasitism of the cotton root rot pathogen *Phymatotrichopsis omnivora*. *Fungal Biology*, v. 119, n. 4, p. 264-273.
- Hosseyini-Moghaddam, M. S., Soltani, J. (2014). Bioactivity of endophytic *Trichoderma* fungal species from the plant family Cupressaceae. *Annals of Microbiology*, v. 64, n. 2, p. 753-761.
- Hunupolagama, D. M., Chandrasekharan, N. V., Wijesundera, W. S. S., Kathriarachchi, H. S., Fernando, T. H. P. S., Wijesundera, R. L. C. (2017). Unveiling Members of *Colletotrichum acutatum* Species Complex Causing *Colletotrichum* Leaf Disease of *Hevea brasiliensis* in Sri Lanka. *Current Microbiology*, v. 74, n. 6, p. 747-756.
- Isaias, O., Martins, I., da Silva, J. B. T., da Silva, J. P., Corrêa, S., de Mello, M. (2014). Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. *Summa Phytopathol, Botucatu*, v. 40, n. 1, p. 34-41.
- John, R. P., Tyagi, R. D., Prévost, D., Brar, S. K., Pouleur, S., & Surampalli, R. Y. (2010). Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against

- Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Protection*, v. 29, n. 12, p. 1452-1459.
- Kim, K. H., Kabir, E., Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of The Total Environment*, v. 575, p. 525-535.
- Larran, S., Simón, M. R., Moreno, M. V., Siurana, M. S., Perelló, A. (2016). Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease. *Biological Control*, v. 92, p. 17-23.
- Le Cointe, R., Simon, T. E., Delarue, P., Hervé, M., Leclerc, M., Poggi, S. (2016). Reducing the use of pesticides with site-specific application: the chemical control of *Rhizoctonia solani* as a case of study for the management of soil-borne diseases. *PloS One*, v. 11, n. 9, p. e0163221.
- Lee, S., Yap, M., Behringer, G., Hung, R., Bennett, J. W. (2016). Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biology and Biotechnology*, v. 3, n. 1, p. 7.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., Fernie, A. R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature protocols*, v. 1, n. 1, p. 387.
- Lopes, F. A. C., Steindorff, A. S., Geraldine, A. M., Brandão, R. S., Monteiro, V. N., Júnior, M. L., ... & Silva, R. N. (2012). Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology*, v. 116, n. 7, p. 815-824.
- Martin K., McDougall B.M., McIlroy S., Jayus, Chen J. E., Seviour R.J. (2007). Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal β -(1,3)- and β -(1,6)-glucanases. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 31, p. 168-192.

- Maschietto, V., Colombi, C., Pirona, R., Pea, G., Strozzi, F., Marocco, A., Lanubile, A. (2017). QTL mapping and candidate genes for resistance to *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination in maize. *BMC Plant Biology*, v. 17, n. 1, p. 20.
- Monnerat, R. G., Nachtigal, G. de F, Cruz, I., Bettiol, W., Campo, C. B. H. (2017). The Role of Embrapa in the Development of Tools to Control Biological Pests: A Case of Success. In: *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. Springer International Publishing, p. 213-222.
- Monteiro, V. N., Steindorff, A. S., Almeida, F. B. R., Lopes, F. A. C., Ulhoa, C. J., Félix, C. R., Silva, R. N. (2015). *Trichoderma reesei* mycoparasitism against *Pythium ultimum* is coordinated by G-alpha protein GNA1 signaling. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, v. 7, p. 1-7.
- Mousa, W. K., & Raizada, M. N. (2013). The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, p. 65.
- Nascimento, T. L., Oki, Y., Lima, D. M. M., Almeida-Cortez, J. S., Fernandes, G. W., Souza-Motta, C. M. (2015). Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. *Fungal ecology*, v. 14, p. 79-86.
- Padder, B. A., Kamfwa, K., Awale, H. E., Kelly, J. D. (2016). Transcriptome Profiling of the *Phaseolus vulgaris-Colletotrichum lindemuthianum* Pathosystem. *Plos One*, v. 11, n. 11, p. e0165823.
- Petrini, O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. In *Microbial ecology of leaves* Springer New York, p. 179-197.
- Potshangbam, M., Devi, S. I., Sahoo, D., Strobel, G. A. (2017). Functional Characterization of Endophytic Fungal Community Associated with *Oryza sativa* L. and *Zea mays* L. *Frontiers in Microbiology*, v. 8.

- Ramada, M. H. S., Lopes, F. Á. C., Ulhoa, C. J., do Nascimento Silva, R. (2010). Optimized microplate β -1, 3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. screening. *Journal of Microbiological Methods*, v. 81, n. 1, p. 6-10.
- Rao, K. M., Raju, K. S., Ravisankar, H. (2016). Cultural conditions on the production of extracellular enzymes by *Trichoderma* isolates from tobacco rhizosphere. *Brasilian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 1, p. 25-32.
- Saravanakumar, K., Yu, C., Dou, K., Wang, M., Li, Y., Chen, J. (2016). Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Biological Control*, v. 94, p. 37-46.
- Savazzini, F., Longa, C. M. O., Pertot, I. (2009). Impact of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 on soil microbial communities of a vineyard in northern Italy. *Soil biology and Biochemistry*, v. 41, n. 7, p. 1457-1465.
- Shentu, X. P., Liu, W. P., Zhan, X. H., Xu, Y. P., Xu, J. F., Yu, X. P., Zhang, C. X. (2014a). Transcriptome sequencing and gene expression analysis of *Trichoderma brevicompactum* under different culture conditions. *PloS one*, v. 9, n. 4, p. e94203.
- Shentu, X., Zhan, X., Ma, Z., Yu, X., Zhang, C. (2014b). Antifungal activity of metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic. *Brasilian Journal of Microbiology*, v. 45, n. 1, p. 248-254.
- Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krska, R., Schuhmacher, R. (2010). Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Microbiological Methods*, v. 81, n. 2, p. 187-193.
- Ting, A. S. Y., & Chai, J. Y. (2015). Chitinase and β -1, 3-glucanase activities of *Trichoderma harzianum* in response towards pathogenic and non-pathogenic isolates: Early indications of compatibility in consortium. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 4, n. 1, p. 109-113.

- Toghueo, R. M. K., Eke, P., Zabalgoeazcoa, Í., de Aldana, B. R. V., Nana, L. W., Boyom, F. F. (2016). Biocontrol and growth enhancement potential of two endophytic *Trichoderma* spp. from *Terminalia catappa* against the causative agent of Common Bean Root Rot (*Fusarium solani*). *Biological Control*, v. 96, p. 8-20.
- Valenzuela, N. L., Angel, D. N., Ortiz, D. T., Rosas, R. A., García, C. F. O., Santos, M. O. (2015). Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit. *Biological Control*, v. 91, p. 88-93.
- Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., Valero, J. R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, v. 37, n. 1, p. 1-20.
- Vinale, F., Manganiello, G., Nigro, M., Mazzei, P., Piccolo, A., Pascale, A., ... & Varlese, R. (2014). A novel fungal metabolite with beneficial properties for agricultural applications. *Molecules*, v. 19, n. 7, p. 9760-9772.
- Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., ... & Woo, S. L. (2013). Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 347, n. 2, p. 123-129.
- Vinodkumar, S., Indumathi, T., Nakkeeran, S. (2017). *Trichoderma asperellum* (NVTa2) as a potential antagonist for the management of stem rot in carnation under protected cultivation. *Biological Control*, v. 113, p. 58-64.
- Whipps, J. M. (1987). Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytologist*, v. 107, n. 1, p. 127-142.
- You, J., Zhang, J., Wu, M., Yang, L., Chen, W., Li, G. (2016). Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. *Biological Control*, v. 101, p. 31-38.

- Yuan, Y., Feng, H., Wang, L., Li, Z., Shi, Y., Zhao, L., ... & Zhu, H. (2017). Potential of endophytic fungi isolated from cotton roots for biological control against *Verticillium* wilt disease. *Plos One*, v. 12, n. 1, p. e0170557.
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., Mukherjee, P. K. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma*—Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*, v. 30, n. 2, p. 74-90.
- Zhang, S., Gan, Y., Xu, B. (2016). Application of plant-growth-promoting fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 enhances tolerance of wheat to salt stress through improvement of antioxidative defense system and gene expression. *Frontiers in Plant Science*, v. 7.

Conclusões Gerais

- Os fungos endofíticos do gênero *Trichoderma* isolados de *Hevea* spp. representam uma fonte de novas espécies propostas neste estudo;
- Os marcadores moleculares IRAP e REMAP podem ser utilizados para acessar a variabilidade genética dos isolados de *Trichoderma* spp. possibilitando a triagem de isolados repetidos;
- Isolados endofíticos de *Hevea* spp. do gênero *Trichoderma* apresentam atividade antimicrobiana capaz de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos;
- A atividade enzimática observada em alguns isolados é promissora para o emprego em trabalhos futuros de controle biológico de fungos fitopatogênicos.