

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**LUIZ FELIPE DA SILVA XAVIER**

***Trichoderma* spp.: FILOGENIA, DETECÇÃO DE dsRNA, CONTROLE BIOLÓGICO  
E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE *Phaseolus vulgaris***

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2020**

**LUIZ FELIPE DA SILVA XAVIER**

***Trichoderma* spp.: FILOGENIA, DETECÇÃO DE dsRNA, CONTROLE BIOLÓGICO  
E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE *Phaseolus vulgaris***

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

Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz

Coorientadores: Maurício Dutra Costa

Poliane Alfenas Zerbini

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

X3t  
2020

Xavier, Luiz Felipe da Silva, 1994-

*Trichoderma* spp. : filogenia, detecção de dsRNA, controle biológico e promoção de crescimento de *Phaseolus vulgaris* / Luiz Felipe da Silva Xavier. – Viçosa, MG, 2020.

78 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Marisa Vieira de Queiroz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.59-70.

1. Feijão-comum - Doenças e pragas - Controle biológico.  
2. dsRNA Viruses. 3. Crescimento (Plantas). 4. Filogenia.  
5. Trichoderma. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação  
em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 633.37294

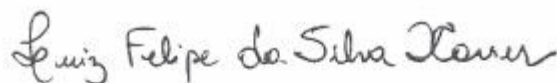
**LUIZ FELIPE DA SILVA XAVIER**

***Trichoderma* spp.: FILOGENIA, DETECÇÃO DE dsRNA, CONTROLE BIOLÓGICO  
E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE *Phaseolus vulgaris***

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

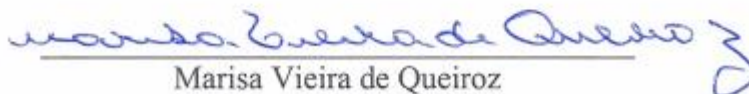
APROVADA: 10 de agosto de 2020.

Assentimento:



---

Luiz Felipe da Silva Xavier  
Autor



---

Marisa Vieira de Queiroz  
Orientadora

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a quem sempre esteve ao meu lado: meus pais, Amélia e Osório, e a meu irmão João Victor, meus tios, tias, primos e avós que acreditaram em mim.

## AGRADECIMENTOS

Quando iniciei a minha graduação, eu nunca imaginei que chegaria tão longe... Porém, coisas incríveis acontecem quando boas pessoas cruzam os nossos caminhos!

Agradeço a Deus, por me proporcionar saúde e força de vontade para estar onde estou;

A todos da minha família, especialmente meus pais, Amélia e Osório, que sempre me incentivaram a seguir o caminho acadêmico, bem como meu irmão João, minhas tias, tios e primos que me apoiaram desde o início de tudo;

Aos queridos colegas da pós e maravilhosas equipes dos laboratórios de Associações Micorrízicas, Ecologia Microbiana, Fisiologia de Microrganismos, Microbiologia de Alimentos, da cozinha do Bioagro e do E.C.S;

A Flávia, Thamylles, Lohan, Johan e equipe do laboratório de Vírus, pelo apoio dado em meio ao caos da pandemia;

A **todo** o incrível time da genética e aos novos amigos, em especial Ângela, Edy, Giarlã, Hanna, Janaína, Jéssica Ribeiro, Jéssica Rosa, Karen, Léo, Letícia, Mirele, Muri, Ozzy, Patrícia e Raphael, pela ajuda com a minha pesquisa e o mais importante, pelos bons momentos de convívio no laboratório e fora dele, os quais me proporcionaram lembranças memoráveis!;

A equipe do Bioagro, por manter o ambiente de trabalho organizado, e a equipe da secretaria do programa, pela agilidade e solicitude;

A coordenação do PPGMBA e a todos do corpo docente, pela valiosíssima contribuição a minha formação;

Aos coorientadores, pelos ensinamentos decisivos, e aos membros da banca examinadora, pela contribuição ao trabalho;

A minha orientadora, Dra. Marisa Vieira de Queiroz, a quem admiro muito pelo vasto conhecimento e experiência, por toda a paciência, incentivo e apoio durante todas as etapas da pesquisa;

Ao CNPq e FAPEMIG, pelo financiamento do projeto e a concessão da bolsa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – (CAPES) – Código de Financiamento 001;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com o trabalho,

Meu sincero MUITO OBRIGADO!

*“Nada neste mundo é tão pequeno que não possamos encontrar uma maneira de entendê-lo. E nada é tão grande que não possamos tentar enfrentá-lo”.*

Hank Green

## **BIOGRAFIA**

LUIZ FELIPE DA SILVA XAVIER, filho de Maria Amélia Alves da Silva e Osório Xavier, nasceu em 31 de julho de 1994 em Montes Claros, MG.

Iniciou sua graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado) na Universidade Estadual de Montes Claros no ano de 2012, concluindo o curso no ano de 2016.

Em março de 2018, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em agosto de 2020.

## RESUMO

XAVIER, Luiz Felipe da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2020. **Trichoderma spp.: filogenia, detecção de dsRNA, controle biológico e promoção de crescimento de *Phaseolus vulgaris*.** Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Coorientadores: Maurício Dutra Costa e Poliane Alfenas Zerbini

A microbiota do solo tem uma diversidade biológica única. Esses microrganismos têm enormes aplicações biotecnológicas, o que levou a um aumento no número de estudos que exploram esse potencial em benefício da indústria e da agricultura. No Brasil, o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma das culturas mais importantes, que é afetada por vários patógenos que causam perdas econômicas significativas. Fungos do solo do gênero *Trichoderma* são reconhecidos como agentes de controle biológico eficientes e representam uma alternativa promissora para o controle de patógenos do feijão comum, como *Colletotrichum lindemuthianum* (responsável pela doença antracnose), *Sclerotinia sclerotiorum* (responsável pela doença do mofo branco) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (responsável pela murcha de Fusarium). Como todos os organismos vivos do planeta, os fungos são suscetíveis a infecções virais. No entanto, essa interação permanece pouco documentada para *Trichoderma* spp. Portanto, o objetivo dessa pesquisa foi detectar a presença de micovírus (vírus que infectam fungos) em *Trichoderma* spp. isolados de solos de plantações de feijoeiro comum e determinar se estas linhagens de *Trichoderma* spp. são capazes de controlar fitopatógenos e promover o crescimento vegetal. Os micovírus foram detectados por meio da análise da presença de dsRNA. Os isolados de *Trichoderma* spp. foram identificados com base na análise filogenética das sequências nucleotídicas dos marcadores moleculares actina (*act*), fator de alongação da tradução 1- $\alpha$  (*tefl- $\alpha$* ) e espaçadores internos transcritos do rDNA (ITS1 e ITS2). Os isolados foram testados em ensaios de antagonismo *in vitro* aos fungos fitopatogênicos *C. lindemuthianum*, *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e em ensaios de promoção do crescimento vegetal. Seis isolados de *Trichoderma* spp. portadores de micovírus foram identificados em 59 isolados obtidos de amostras de solo de diferentes plantações de feijão comum. Os resultados revelaram três perfis diferentes de dsRNA em três espécies diferentes de *Trichoderma*, agrupadas nos clados Brevicompectum, Harzianum e Viride. Aqui, é relatado pela primeira vez em solo agrícola de Minas Gerais a espécie *T. arundinaceum*, que juntamente com *T. koningiopsis*, mostrou atividade antagonista eficaz contra os fitopatógenos do feijão comum. Além disso, *T.*

*koningiopsis* foi capaz de aumentar a massa seca de *P. vulgaris* em casa de vegetação. De modo geral, foram encontradas evidências de micovírus em *Trichoderma* spp., onde foi observado que 10,16% dos isolados apresentaram dsRNA. A influência desses micovírus nas atividades de micoparasitismo e de promoção de crescimento vegetal será determinada futuramente.

Palavras-chave: *Trichoderma*. DsRNA. Controle biológico. Promoção de crescimento. Filogenia. Feijão comum.

## ABSTRACT

XAVIER, Luiz Felipe da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2020. ***Trichoderma* spp.: phylogeny, dsRNA detection, biological control and *Phaseolus vulgaris* growth promotion.** Advisor: Marisa Vieira de Queiroz. Co-advisors: Maurício Dutra Costa and Poliane Alfenas Zerbini

Soil microbiota has a unique biological diversity. These microorganisms have enormous biotechnological applications, which has led to an increase in the number of studies exploring this potential for the benefit of industry and agriculture. In Brazil, common bean (*Phaseolus vulgaris*) is one of the most important crops, which is affected by several pathogens that cause significant economic losses. Soil fungi of the genus *Trichoderma* are recognized as efficient biological control agents and represent a promising alternative for the control of common bean pathogens, such as *Colletotrichum lindemuthianum* (responsible for anthracnose disease), *Sclerotinia sclerotiorum* (responsible for white mold disease) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (responsible for *Fusarium* wilt disease). Such all living organisms on the planet, fungi are susceptible to viral infections. However, this interaction remains poorly documented for *Trichoderma* spp. Therefore, the aim of this research was to detect the presence of mycovirus (viruses that infect fungi) in *Trichoderma* spp. isolated from soils from common bean crop fields and determine whether these *Trichoderma* spp. strains are able to control phytopathogens and promote plant growth. Mycoviruses were detected by analyzing the presence of dsRNA. *Trichoderma* spp. isolates were identified based on the phylogenetic analysis of nucleotide sequences of the molecular markers actin (*act*), translation elongation factor 1- $\alpha$  (*tef1- $\alpha$* ), and the internal transcribed spacers of rDNA (ITS1 and ITS2). The isolates were tested to *in vitro* antagonism assays to phytopathogenic fungi *C. lindemuthianum*, *S. sclerotiorum*, and *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* and for plant growth promotion assays. Six isolates of *Trichoderma* spp. harboring mycoviruses were screened from 59 isolates obtained from soil samples from different common bean crops. The results revealed three different dsRNA profiles in three different species of *Trichoderma*, which were grouped in the Brevicomactum, Harzianum, and Viride clades. Here, it is reported for the first time in agricultural soil from Minas Gerais the species *T. arundinaceum*, which together with *T. koningiopsis* showed efficiently antagonistic activity against the common bean phytopathogens. Furthermore, *T. koningiopsis* was able to increase the dry mass of *P. vulgaris* in the greenhouse. Altogether, evidence of mycovirus was

found in *Trichoderma* spp., where it was observed that 10.16% of the isolates harbored dsRNA. The influence of these mycoviruses on mycoparasitism and plant growth promotion activities will be determined in the future.

Keywords: *Trichoderma*. DsRNA. Biological control. Growth promotion. Phylogeny. Common beans.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
2.1. Isolamento e condições de crescimento.....	15
2.2. Extração de ácidos nucleicos .....	16
2.3. Caracterização dos dsRNAs .....	18
2.4. PCR e sequenciamento .....	18
2.5. Análise filogenética .....	21
2.6. Antagonismo <i>in vitro</i> .....	22
2.7. Promoção de crescimento.....	23
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
3.1. Isolamento dos fungos .....	25
3.2. Caracterização dos ácidos nucleicos.....	26
3.3. Análise filogenética .....	27
3.4. Antagonismo <i>in vitro</i> .....	34
3.5. Promoção de crescimento.....	43
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
4.1. Identificação molecular e análise filogenética.....	46
4.2. dsRNA em <i>Trichoderma</i> .....	50
4.3. Antagonismo <i>in vitro</i> e promoção de crescimento .....	53
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>58</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>59</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>71</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Phaseolus* contém aproximadamente 70 espécies descritas (BITOCCHI *et al.*, 2017) destacando-se 5 principais, que são domesticadas: *P. vulgaris* (feijão comum), *P. coccineus*, *P. lunatus*, *P. acutifolius* e *P. dumosus* (DELGADO-SALINAS *et al.*, 2006). Os feijoeiros podem ser plantados em todos os trópicos e regiões temperadas do mundo, crescendo em altitudes que variam de próximo ao nível do mar a mais de 3 mil metros acima deste (GRAHAM & RANALLI, 1997). Apesar de globalmente distribuído, estudos apontam que *P. vulgaris* teve sua origem no Novo Mundo, na Mesoamérica (México, Guatemala) (KAPLAN, 1965; DELGADO-SALINAS *et al.*, 2006).

O feijão é um alimento muito popular no Brasil, tendo um consumo médio estimado em 16 kg/habitante anualmente (RAMALHO *et al.*, 2016). O Brasil ocupa o terceiro lugar no ranking mundial da produção de feijão, atrás da Índia e Myanmar que se posicionam como primeiro e segundo lugar, respectivamente (FAOSTAT, 2018). Na safra 2019/2020, a produção brasileira do grão chegou a pouco mais de 3,02 milhões de toneladas em uma área plantada estimada em 2,92 milhões de hectares e com produtividade média em torno de 1.035 kg/ha. O estado do Paraná lidera a produção nacional de feijão, com 631,9 mil toneladas em uma área plantada de 383,1 mil hectares, o que equivale a um rendimento de 1.649 kg/ha. Minas Gerais detém a segunda colocação, somando 566,2 mil toneladas e uma área plantada de 367,2 mil hectares, totalizando 1.542 kg/ha. Por fim, o estado do Mato Grosso fica em terceiro lugar, produzindo 337,0 mil toneladas de feijão em uma área de 237,5 mil hectares, correspondente a 1.419 kg/ha (CONAB, 2019). Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), existem 360 cultivares de feijão registradas para cultivo, desenvolvidas em sua grande maioria por empresas públicas, principalmente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), o Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) (MAPA, 2020).

O feijão é cultivado em todos os estados da federação (CONAB, 2019) e como qualquer outra cultura, *P. vulgaris* está sujeito ao ataque de uma extensa variedade de fungos, bactérias e vírus que reduzem a produtividade. Uma das doenças mais destrutivas da cultura do feijoeiro mundialmente é o mofo branco, causado pelo fungo filamentosso *Sclerotinia sclerotiorum* (TU, 1988). Este patógeno é capaz de infectar pelo menos 408 espécies diferentes de plantas (revisado por BOLAND & HALL, 1994). No Brasil, o mofo branco tem forte impacto no

cultivo do feijão na região do Cerrado e nas áreas irrigadas, especialmente nos meses de inverno, os quais propiciam temperatura e umidade adequadas à germinação dos escleródios (FERRAZ *et al.*, 1999; ABREU & SOUZA, 2015), podendo acarretar em perdas de até 90% da produção (SINGH & SCHWARTZ, 2010). Outra doença importante da cultura no feijoeiro no país é a murcha de *Fusarium*, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, uma das mais de 70 *formae specialis* que compõem o complexo de espécies capaz de provocar infecções em diversos hospedeiros (RANA *et al.*, 2017). No Brasil, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* ocorre na maior parte das áreas produtoras de feijão (TOLEDO-SOUZA *et al.*, 2012), ocasionando reduções significativas na produção de grãos que podem chegar a mais de 80% em condições de estresse (ABAWI & PASTOR-CORRALES, 1990). Por fim, a antracnose provocada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, uma doença altamente lesiva ao feijoeiro que afeta a produtividade e qualidade dos feijões. O fungo *C. lindemuthianum* é um fitopatógeno especializado e seus hospedeiros se restringem aos feijões dos gêneros *Phaseolus* e *Vigna* (PASTOR-CORRALES & TU, 1989). A antracnose do feijoeiro é uma doença de distribuição mundial, porém, afeta com mais severidade aqueles países localizados nas zonas temperadas (PASTOR-CORRALES & TU, 1989). O fungo é capaz de lesionar todas as partes aéreas da planta (folhas, caule e vagens), levando a perdas de rendimento que podem chegar a 100%, caso sejam utilizadas sementes contaminadas e o ambiente forneça condições favoráveis ao desenvolvimento de *C. lindemuthianum* (HALVORSON *et al.*, 2016). A doença está amplamente espalhada, com maior número de registros nas regiões sul (SC, PR), sudeste (MG, SP) e centro oeste (MT) (NOGUEIRA *et al.*, 2019; COELHO *et al.*, 2016).

O controle de fitopatógenos por meio de pesticidas químicos eleva os custos de produção e pode provocar desequilíbrios ambientais. Assim, o controle biológico ressurgiu neste cenário como alternativa de grande interesse. Os fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* são descritos como agentes de biocontrole eminentes. Estes fungos são ascomicetos globalmente distribuídos que possuem diversos estilos de vida e estabelecem relações benéficas ou antagônicas com outros eucariotos - plantas, animais e outros fungos (HARMAN *et al.*, 2004). Mais de 50 produtos comerciais baseados em várias espécies dentro do gênero *Trichoderma* estão disponíveis e vem sendo utilizados contra os principais fungos fitopatogênicos do feijoeiro e de outras culturas, incluindo *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp., *Phytophthora* spp., e outros, fornecendo uma alternativa promissora à aplicação de produtos químicos. No Brasil, apenas seis produtos são licenciados para comercialização: Biotrich® (*T.*

*harzianum* e *T. viride* - Biovale Produtos Agropecuários Ltda., Rio Grande do Sul, Brasil), Quality WG® (*T. asperellum* - Laboratório de Biocontrole Farroupilha Ltda., Minas Gerais, Brasil), Trichodermax® EC (*T. asperellum* - Novozymes Latin America Ltda., Paraná, Brasil), Trichodermil® (*T. harzianum* - Itaforte BioProdutos, São Paulo, Brasil) ICB Nutrisolo SC e WP® (*T. viride*, *T. harzianum* e *T. koningii* - ICB BIOAGRITEC Ltda., Rio Grande do Sul, Brasil) e Trichodel® (*Trichoderma* spp. - Empresa Caxiense de Controle Biológico Ltda., Rio Grande do Sul, Brasil) (BETTIOL *et al.*, 2012).

O potencial de controle biológico de *Trichoderma* pode ser influenciado por um fator interessante: a presença de dsRNA. Conforme observado em análises *in vitro*, a fisiologia de linhagens de *Trichoderma* hospedeiras de dsRNAs pode sofrer alterações que resultam em aumento ou redução de sua capacidade de antagonismo (CHUN *et al.*, 2018b; YOU *et al.*, 2019). Apesar disso, um número limitado de pesquisas relata a investigação de dsRNA em fungos do gênero *Trichoderma*, o que mantém sua relação com os micovírus ainda obscura. Até o momento, tem-se conhecimento que fungos deste gênero são hospedeiros de micovírus pertencentes às famílias *Partitiviridae*, *Totiviridae*, *Hypoviridae* e foram relatados também alguns micovírus sem classificação precisa (CHUN *et al.*, 2018a; KHALIFA & MACDIARMID, 2019; YOU *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2019a; LIU *et al.*, 2019b).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Isolamento e condições de crescimento

Para a obtenção dos isolados, sete amostras de solos de lavouras de feijão não tratadas com fungicida foram coletadas em uma profundidade de até 10 cm. Três amostras de solo foram coletadas no campo experimental de feijão da Universidade Federal de Viçosa (UFV) no município de Coimbra, MG (20° 49' 43.4" S, 42° 45' 47.6" W). As outras quatro amostras gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. José Eustáquio de Souza Carneiro (Departamento de Fitotecnia, UFV) foram coletadas em quatro fazendas produtoras de feijão no município de Presidente Bernardes, MG (fazenda São Vicente, 20° 45' 00.6" S, 43° 04' 58.6" W; fazenda Grota do Vinhático, 20° 45' 03.9" S, 43° 04' 49.3" W; fazenda Mato Dentro, 20° 45' 13.5" S, 43° 05' 32.7" W e fazenda São Miguel, 20° 45' 18.4" S, 43° 05' 02.2" W). O método de diluição seriada foi utilizado para isolar as colônias (MELLO *et al.*, 2011, adaptado): a 10 g de cada amostra de solo foi acrescido 90 mL de água destilada estéril em frasco do tipo Erlenmeyer (250 mL), mantido sob agitação (150 rpm, 25 °C) por 1h até a completa dissolução de agregados do solo. Em seguida, a mistura foi diluída (1:1.000) e alíquotas de 100 µL da diluição 10<sup>-3</sup> foram inoculadas em meio seletivo para *Trichoderma* (TSM) (ELAD *et al.*, 1981) e incubadas a 25 °C por 5 dias em incubadora BOD com fotoperíodo (12 h luz; 12 h escuro) (Fanem, São Paulo, Brasil). O crescimento das colônias foi acompanhado diariamente e as colônias formadas foram transferidas para novas placas contendo BDA (Neogen Corporation, Michigan, Estados Unidos da América) e incubadas a 25 °C por 3 a 5 dias em incubadora BOD com fotoperíodo (12 h luz; 12 h escuro). Após esse período, discos de micélio (5 mm de diâmetro) foram transferidos para placas contendo ágar farinha de milho (CMA) (Neogen Corporation, Michigan, Estados Unidos da América) e incubadas a 25 °C por 3 a 5 dias em incubadora BOD com fotoperíodo (12 h luz; 12 h escuro) para estimular a esporulação. Para a purificação monospórica, suspensões de conídios de cada um dos isolados foram diluídas (1:100.000) e alíquotas foram inoculadas em meio ágar-água e incubadas a 25 °C por aproximadamente 16 h. Com auxílio de um microscópio estereoscópico e agulha entomológica, um único esporo de cada placa foi transferido para uma nova placa contendo BDA e as placas foram incubadas como supracitado (FERNANDEZ, 1993). Após três dias de crescimento, discos de micélio das colônias foram transferidos para frascos com água destilada estéril (CASTELLANI, 1939) e depositados na

colecção do Laboratório de Genética Molecular de Fungos (LGMF) do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agricultura (BIOAGRO, UFV).

## 2.2. Extração de ácidos nucleicos

Os ácidos nucléicos totais foram extraídos utilizando a metodologia proposta por SPECHT e colaboradores (1982), com modificação (desproteínização com fenol:clorofórmio ao invés de clorofórmio:álcool isoamílico). Suspensões de conídios de cada um dos isolados foram inoculadas sobre uma camada de papel celofane depositada na superfície de placas contendo BDA (CASSAGO *et al.*, 2002) e incubadas a 25 °C por 48 horas. O micélio tenro foi então cuidadosamente raspado das placas, macerado em almofariz e pistilo com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino e transferido para microtubos (2 mL). Em seguida, 400 µL de tampão de extração (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA pH 7,5, 150 mM NaCl e SDS 2% [peso/volume]) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) acrescido de Proteinase K (100 µg/mL) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América) foram adicionados. A mistura foi colocada em banho-maria a 70 °C por 15 min e homogeneizada gentilmente. Foram adicionados 350 µL de acetato de potássio (5 M) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e os tubos foram deixados em repouso no gelo por 30 min e centrifugados em seguida (11.200 g por 10 min). Após a centrifugação, o sobrenadante contendo os ácidos nucléicos foi cuidadosamente transferido para um novo microtubo. Em cabine de exaustão, foi adicionado ao sobrenadante o volume de 500 µL da mistura fenol-clorofórmio (1:1) (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos da América), os tubos foram invertidos gentilmente e colocados em repouso no gelo por 5 min; logo em seguida, foram centrifugados a 16.128 g por 10 min. A fase aquosa superior foi cuidadosamente pipetada e transferida para um novo microtubo. As etapas supracitadas foram repetidas, adicionando-se ao invés da mistura fenol-clorofórmio apenas o clorofórmio. Uma vez recuperada a fase aquosa em um novo microtubo, foi adicionado igual volume de isopropanol (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos da América) e a mistura foi acondicionada em freezer por aproximadamente 2 h. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 16.128 g por 10 min. Os sobrenadantes foram descartados, os pellets foram lavados em etanol 70% (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos da América) e novamente centrifugados nas mesmas condições. Os tubos foram colocados sobre uma folha limpa de papel absorvente em posição invertida, em temperatura ambiente, até a evaporação

dos resquícios de etanol. Os pellets foram reidratados em tampão TE (10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA pH 8,0) e armazenados em freezer (-20 °C).

Os ácidos nucléicos totais obtidos no processo de extração foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8% (Promega Corporation, Wisconsin, Estados Unidos da América) em TBE 1x (0,1 M Tris-base, 90 mM ácido bórico e 10 mM EDTA pH 8,0) a 5 V/cm (30 cm) utilizando o corante fluorescente GelRed™ (Biotium, California, Estados Unidos da América) e examinados em fotodocumentador com transiluminador ultravioleta (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil). As linhagens que apresentaram bandas extras, além daquela correspondente ao DNA genômico foram selecionadas para os experimentos seguintes.

Um segundo método de extração de ácidos nucléicos foi adotado visando ao aumento da obtenção de RNA. Foi utilizada a metodologia proposta por ROTT e JELKMANN (2001), com modificação (sem a adição de 2-mercaptoetanol). O micélio tenro foi obtido e macerado como descrito acima e transferido para microtubos (2 mL). Em seguida, 1 mL de tampão de extração (4 M hidrocloreto de guanidina, 0,2 M NaOAc pH 5,2, 25 mM EDTA pH 8,0, 1 M KOAc e PVP-40 2,5% [peso/volume]) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) foi adicionado a 100 mg de micélio macerado e homogeneizado. Uma alíquota de 500 µL da mistura foi transferida para um novo microtubo (2 mL) e foram adicionados 100 µL de SDS 10%. Após 10 min em banho-maria a 70 °C (agitação intermitente), os tubos foram deixados em repouso no gelo por 5 min e depois centrifugados a 18.928 g por 10 min. Após a centrifugação, 300 µL do sobrenadante contendo os ácidos nucléicos foram cuidadosamente transferidos para um novo microtubo. Foi adicionado ao sobrenadante o volume de 150 µL de etanol absoluto, 300 µL de iodeto de sódio (6 M) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e 25 µL de sílica ressuspendida (S5631) (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos da América). Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 10 min (agitação intermitente) e depois centrifugados a 4.032 g por 1 min. O pellet foi ressuspenso em 500 µL de tampão de lavagem (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 mM EDTA pH 8,0, 50 mM NaCl e etanol 50%) e centrifugado a 4.032 g por 1 min. A lavagem foi realizada novamente, nas mesmas condições, e o pellet foi seco a temperatura ambiente por 1 h antes de ser ressuspenso em 80 µL de água ultrapura DEPC (dietilpirocarbonato) (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos da América). Os tubos foram incubados em banho maria a 70 °C por 4 min e centrifugados a 18.928 g por 10 min. O sobrenadante (50 µL) foi recuperado em um novo microtubo e armazenado em freezer (-20°C).

### 2.3. Caracterização dos dsRNAs

Para confirmar a presença de dsRNA, digestões enzimáticas foram feitas da seguinte maneira: 1 U da DNase RQ1 (Promega Corporation, Wisconsin, Estados Unidos da América) foi adicionada para cada  $\mu\text{g}$  de ácidos nucleicos totais acrescido de 40 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM  $\text{MgSO}_4$  e 1 mM  $\text{CaCl}_2$  e a reação foi incubada a 37 °C por 30 min (VILCHES & CASTILLO, 1997; SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989); 1 U da Nuclease S1 (Promega Corporation, Wisconsin, Estados Unidos da América) foi adicionada para cada  $\mu\text{g}$  de ácidos nucleicos totais acrescido de 50 mM Acetato de sódio pH 4,5, 280 mM NaCl e 1 mM  $\text{ZnSO}_4$  e a reação foi incubada a 37 °C por 15 min (VILCHES & CASTILLO, 1997; SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989); e por fim, 2  $\mu\text{g}$  da RNase A (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos da América) foram adicionadas para cada  $\mu\text{g}$  de ácidos nucleicos totais e a reação foi incubada a 37 °C por 30 min (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989). Os produtos da digestão foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1x a 3 V/cm (30 cm) utilizando o corante fluorescente GelRed™ e examinados em fotodocumentador com transiluminador ultravioleta.

### 2.4. PCR e sequenciamento

Para realizar a identificação molecular dos isolados, foram amplificadas as regiões gênicas correspondentes a três marcadores filogenéticos: os espaçadores transcritos internos do rDNA (ITS1 e ITS2), uma sequência parcial do gene que codifica o fator de alongação 1-alfa da tradução (*tef1- $\alpha$* ) e uma sequência parcial do gene que codifica a subunidade alfa da actina (*act*) (tabela 1). As linhagens que apresentaram diferentes perfis de bandas extras além daquela correspondente ao DNA genômico foram selecionadas para os experimentos seguintes e tiveram as três regiões amplificadas por PCR. As demais linhagens tiveram a região ITS amplificada. Para a amplificação foi utilizado um termociclador C1000™ (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, Estados Unidos da América). O volume final foi ajustado para 25  $\mu\text{L}$ , contendo 5  $\mu\text{L}$  do tampão Colorless GoTaq® Flexi Buffer [5x] (Promega Corporation, Wisconsin, Estados Unidos da América), 2,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  [25 mM] (Promega Corporation, Wisconsin, Estados Unidos da América), 1,0  $\mu\text{L}$  de dNTPs [2,5 mM cada dNTP], 1,0  $\mu\text{L}$  de cada primer [5  $\mu\text{M}$ ]; 0,25  $\mu\text{L}$  de GoTaq® DNA Polymerase [5 U/ $\mu\text{L}$ ] (Promega Corporation,

Wisconsin, Estados Unidos da América), 4  $\mu\text{L}$  de DNA genômico [25 ng/ $\mu\text{L}$ ] e 10,25  $\mu\text{L}$  de água ultrapura. Os produtos da reação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,2% em TBE 1x a 5 V/cm (30 cm) utilizando o corante fluorescente GelRed™ e examinados em fotodocumentador com transiluminador ultravioleta. A purificação e o sequenciamento dos produtos amplificados foram realizados pela Macrogen (Macrogen, Inc., Seoul, Coreia do Sul). As sequências resultantes foram checadas e corrigidas manualmente e as sequências consenso foram geradas usando o software Geneious Prime™ versão 2019.2 (Biomatters Ltd., Auckland, Nova Zelândia) em Windows 10™ versão 1909 (Microsoft Corporation, Washington, Estados Unidos da América) e posteriormente comparadas com o banco de dados *TrichOKEY* versão 2.0, disponível em <http://www.isth.info/> (DRUZHININA *et al.*, 2005).

Tabela 1. Regiões gênicas usadas para identificação molecular dos isolados de *Trichoderma* spp. deste estudo.

Região gênica	Primer (5' - 3')	Condições	Produto	Referência dos primers
<b>ITS</b>	ITS1F	95 °C: 3 min; (95 °C: 1 min, 55 °C: 1 min, 72 °C: 1 min) x 36 ciclos; 72 °C: 10 min	SSU (parcial) + ITS1 + 5.8S + ITS2 + LSU (parcial) = ~630 pb	GARDES & BRUNS, 1993 / WHITE <i>et al.</i> , 1990
	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA			
	ITS4			
	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
<b><i>tef1-a</i></b>	EF1-728F	95 °C: 3 min; (95 °C: 1 min, 61 °C: 1 min, 72 °C: 1 min) x 36 ciclos; 72 °C: 10 min	Íntron 4 (maior) + éxon + íntron 5 (menor) = ~650 pb	CARBONE & KOHN, 1999 / KULLNIG-GRADINGER <i>et al.</i> , 2002
	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG			
	TEF1R			
	GCCATCCTTGGAGATAACCAGC			
<b><i>act</i></b>	TACT1	95 °C: 3 min; (95 °C: 1 min, 54 °C: 1 min, 72 °C: 1 min) x 36 ciclos; 72 °C: 10 min	Éxon (parcial) + íntron = ~750 pb	SAMUELS <i>et al.</i> , 2006
	TGGCACCACACCTTCTACAATGA			
	TACT2			
	TCTCCTTCTGCATACGGTCGGA			

## 2.5. Análise filogenética

Para estabelecer as relações filogenéticas dos isolados, as sequências consenso anteriormente obtidas foram alinhadas utilizando o algoritmo Muscle® do software MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis versão 7.0.26 (TAMURA *et al.*, 2013). O arquivo “NEXUS” (.nex) intercalado foi formatado usando o software PAUP\* versão 4.0b10 (SWOFFORD, 2002). Análises filogenéticas individuais de cada um dos três marcadores-bem como uma análise concatenada dessas três sequências foram feitas por meio da Inferência Bayesiana utilizando o software MrBayes versão 3.1 (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001) após a determinação do modelo de substituição de nucleotídeos mais adequado para aquele conjunto de dados por meio do software MrModeltest versão v2.3 (NYLANDER, 2004). O modelo selecionado para as três regiões, de acordo com Akaike Information Criterion (AIC), foi o GTR+I+G, com proporção de sítios invariáveis de 67,68% para ITS, 61,73% para *act* e 28,36% para *tef1- $\alpha$* . Duas corridas de quatro cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) foram executadas por 10.000.000 de gerações com amostragem a cada 1000 gerações, totalizando 10.000 árvores. Foi utilizado o programa Tracer versão 1.7.0 (RAMBAUT *et al.*, 2018) para verificar a convergência dos parâmetros amostrados pelas análises. As primeiras 2.500 árvores foram eliminadas (*burnin*) e uma árvore consenso foi então gerada a partir das árvores remanescentes. As árvores resultantes de cada análise foram visualizadas no software FigTree – Tree Figure Drawing Tool versão 1.4.4 (RAMBAUT, 2018), exportadas e editadas usando o software CorelDRAW® versão 18.1.0.661 (Corel Corporation, Ottawa, Canadá). Ramos com valores de probabilidade a *posteriori* inferiores a 95% foram desconsiderados (baixa confiabilidade) (RANNALA & YANG, 1996; LEACHÉ & REEDER, 2002). A análise filogenética concatenada foi feita a partir de uma matriz de 2027 caracteres (643 do marcador ITS, 723 do marcador *act* e 661 do marcador *tef1- $\alpha$* ) gerada utilizando o software Mesquite versão 3.61 (MADDISON & MADDISON, 2019) e executada no software MrBayes versão 3.1. As sequências obtidas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) utilizadas neste estudo estão descritas no Apêndice A.

## 2.6. Antagonismo *in vitro*

Os isolados selecionados foram submetidos a dois testes de antagonismo *in vitro* a três fungos fitopatogênicos da cultura do feijoeiro: *C. lindemuthianum* raça 89, agente causal da antracnose do feijoeiro, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, agente causal da murcha de *Fusarium* e *S. sclerotiorum*, agente causal do mofo branco. O ensaio de cultura pareada teve a finalidade de verificar a capacidade de micotrofia e crescimento de *Trichoderma* sobre os fitopatógenos. Primeiro, as colônias dos isolados de *Trichoderma* selecionados e também dos fitopatógenos foram crescidas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 20 mL de meio BDA em suas respectivas temperaturas ótimas: *C. lindemuthianum* raça 89, 22 °C por 10 dias; *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, 25 °C por 7 dias; *S. sclerotiorum*, 25 °C por 72 h; e *Trichoderma*, 25 °C por 48 h. Depois, discos de micélio (5 mm de diâmetro) retirados da borda de cada uma das colônias foram depositados em placas de Petri contendo meio BDA (20 mL), de modo que cada placa recebeu um disco de cada isolado de *Trichoderma* em um polo e um disco de cada patógeno no polo oposto (DENNIS & WEBSTER, 1971), separados por uma distância de aproximadamente de 5 cm (os discos de *C. lindemuthianum* foram colocados nas placas 5 dias antes do antagonista). As placas foram incubadas nas temperaturas ótimas para cada fitopatógeno e foram avaliadas após 10 dias (*C. lindemuthianum* raça 89); 7 dias (*F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*); e 72 h (*S. sclerotiorum*). Nas placas usadas como controle foram inoculados apenas os fitopatógenos. As placas foram fotografadas e a área das colônias dos fitopatógenos foi determinada utilizando o software ImageJ versão 1.53a (RASBAND, 2015). O percentual de inibição foi calculado utilizando a fórmula  $PI = [(C-T)/C] \times 100$ , onde C = a área da colônia do fitopatógeno na placa controle e T = a área da colônia do fitopatógeno na placa contendo *Trichoderma*. Os resultados passaram por análise de variância (ANOVA) (MAYO *et al.*, 2015) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com de 5% de significância. Os gráficos foram plotados usando o software GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, Califórnia). O experimento foi conduzido duas vezes em delineamento inteiramente casualizado e com triplicatas para cada tratamento.

O ensaio de atividade antifúngica teve por objetivo verificar a capacidade dos isolados de *Trichoderma* spp. de produzir metabólitos com atividade de inibição dos fitopatógenos. Discos de micélio (5 mm de diâmetro) foram removidos da borda das colônias de cada um dos isolados de *Trichoderma* após crescimento em meio BDA a 25 °C por 7 dias. Estes discos foram depositados no centro de placas de Petri sobre uma membrana de celofane posicionada sobre o

meio de cultura (BDA, 20 mL). As placas foram incubadas a 25 °C por 48 h e então a membrana de celofane foi cuidadosamente removida, levando consigo o micélio em crescimento. Em seguida, discos de micélio (5 mm de diâmetro) de cada um dos fitopatógenos (crescidos nas condições descritas anteriormente) foram depositados nas mesmas placas (LIMÓN *et al.*, 1999), que posteriormente foram incubadas nas temperaturas ótimas para cada fitopatógeno e avaliadas após 10 dias (*C. lindemuthianum* raça 89); 7 dias (*F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*); e 72 h (*S. sclerotiorum*). Nas placas controle não foi inoculado previamente o *Trichoderma*. O percentual de inibição foi calculado utilizando a fórmula  $PI = [(C-T)/C] \times 100$ , onde C = o diâmetro da colônia do fitopatógeno na placa controle e T = o diâmetro da colônia do fitopatógeno na placa contendo os metabólitos, ambos mensurados com auxílio de um paquímetro digital. Os resultados passaram por análise de variância (ANOVA) (MAYO *et al.*, 2015) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5% de significância). Os gráficos foram plotados usando o software GraphPad Prism. O experimento foi conduzido duas vezes em delineamento inteiramente casualizado e com triplicatas para cada tratamento.

## 2.7. Promoção de crescimento

Para avaliar a eficácia da promoção de crescimento vegetal em *P. vulgaris*, os isolados de *Trichoderma* selecionados foram submetidos a um ensaio *in vivo*, em casa de vegetação. Para produzir o inóculo, discos de micélio (5 mm de diâmetro) foram removidos da borda das colônias de cada um dos isolados de *Trichoderma* spp. após crescimento em meio BDA a 25 °C por 7 dias. Estes discos foram depositados em sacos de polietileno de alta densidade previamente esterilizados em autoclave contendo 50 g de arroz parboilizado umedecido (CARVALHO *et al.*, 2011). Os sacos foram incubados a 28 °C por 5 dias em incubadora BOD com fotoperíodo (12 h luz; 12 h escuro) e revolvidos manualmente todos os dias para fragmentar o micélio e aumentar a sua superfície de contato. Os conídios foram lavados do substrato com uma solução de Tween® 80 (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos da América) 0,1% estéril, filtrados em gaze estéril, contados em câmara de Neubauer e a concentração das suspensões foi ajustada para  $2 \times 10^7$  esporos/mL. As suspensões foram utilizadas logo após a preparação.

A inoculação foi feita de acordo com MAYO e colaboradores (2015). As sementes de *P. vulgaris* cultivar pérola (grupo comercial carioca) foram desinfestadas com etanol 70% por

1 min, hipoclorito de sódio 0,5% por 5 min, enxaguadas por 3 vezes em água destilada estéril e o excesso de água foi removido. As sementes foram imersas nas suspensões de esporos de cada isolado ou em água destilada estéril (tratamento controle) e secas durante 12 horas em cabine de fluxo laminar. As sementes foram plantadas em vasos plásticos (500 mL) contendo o substrato comercial Tropstrato® (Vida Verde Tecnologia em Substratos, São Paulo, Brasil) sem a adição de fertilizantes químicos. Os feijoeiros foram coletados no estágio v3 (primeira folha composta aberta), lavados em água corrente e armazenados em estufa de secagem a 60 °C por 5 dias (Fanem, São Paulo, Brasil). A massa seca total e a do sistema radicular foram mensuradas, os resultados passaram por análise de variância (ANOVA) (MAYO *et al.*, 2015) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5% de significância). Os gráficos foram plotados usando o software GraphPad Prism. O experimento foi conduzido duas vezes em delineamento inteiramente casualizado e com 10 plantas para cada tratamento.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Isolamento dos fungos

Foram obtidos 59 isolados de *Trichoderma* das sete amostras de solo utilizadas, sendo 16 deles (27,11%) provenientes dos solos coletados em Coimbra – MG e 43 originários dos solos coletados em Presidente Bernardes – MG (5 [8,47%] da fazenda São Vicente, 22 [37,28%] da fazenda Grota do Vinhático, 10 [16,94%] da fazenda Mato Dentro e 6 (10,16%) da fazenda São Miguel). Os isolados foram agrupados conforme morfologia da colônia e um representante de cada grupo foi aleatoriamente escolhido e fotografado (figura 1).

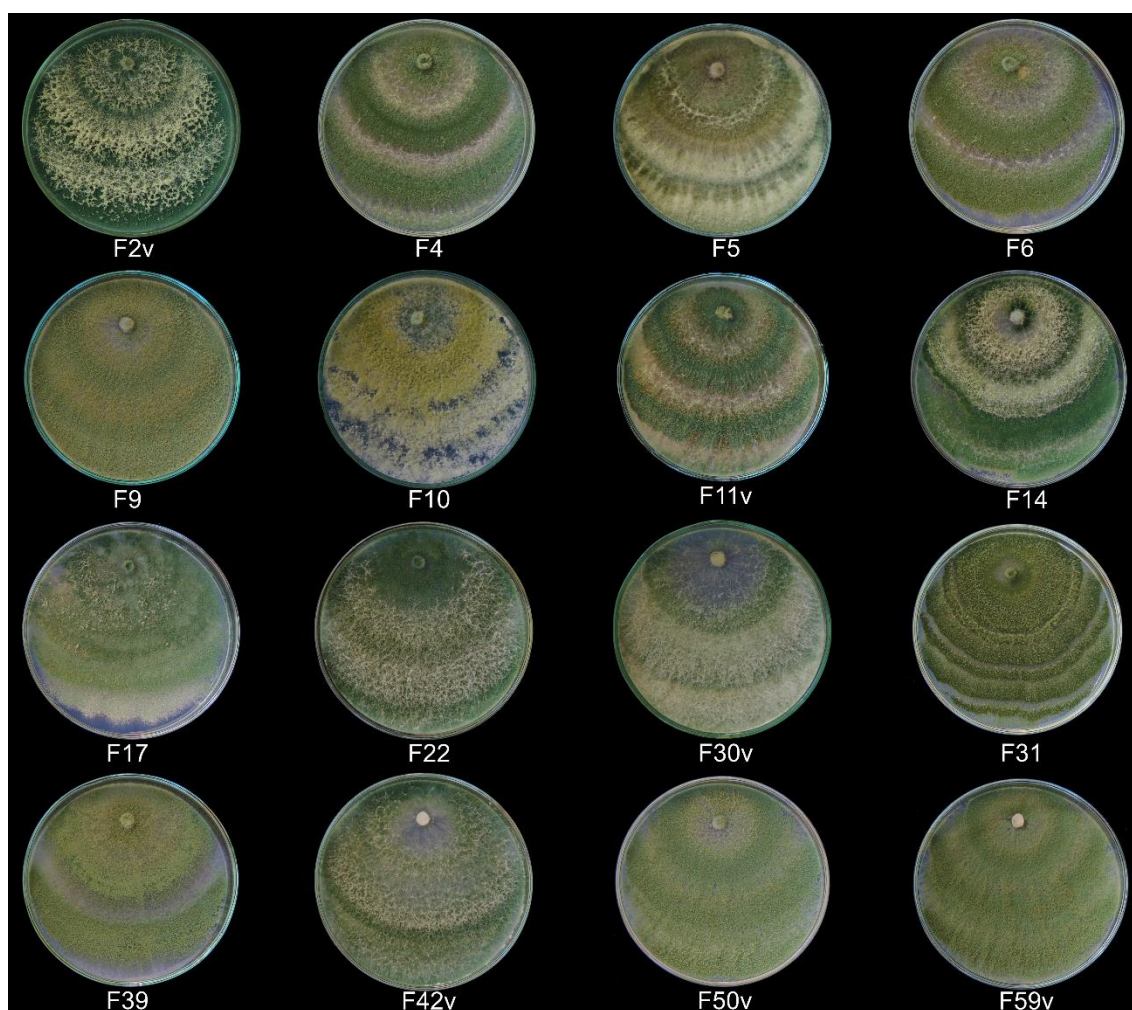


Figura 1. Morfologia das colônias dos isolados de *Trichoderma* spp. deste estudo crescidos em meio BDA. F2v – F14 = Coimbra, MG; F17 = fazenda São Vicente/Presidente Bernardes, MG;

F22 – F42v = fazenda Grota do Vinhático/Presidente Bernardes, MG; F50v = fazenda Mato Dentro/Presidente Bernardes, MG; e F59v = fazenda São Miguel/Presidente Bernardes/MG.

### 3.2. Caracterização dos ácidos nucleicos

Para a identificação de isolados que apresentam micovírus, foi realizada a extração de ácidos nucleicos totais de todos os isolados. Após a extração e avaliação da integridade dos ácidos nucleicos, foi observado que os isolados F2v, F11v, F30v, F42v, F50v e F59v apresentam bandas adicionais em relação a banda que representa o DNA cromossômico, sugerindo a presença de micovírus. Foram encontradas bandas de tamanhos diferentes entre estes isolados, variando de aproximadamente 0,8 Kb a 3,2 Kb. O isolado F2v apresentou um perfil com 4 fragmentos de aproximadamente 2,5, 2,9, 3,2 e 3,9 kb. O isolado F42v apresentou um perfil com 7 fragmentos de aproximadamente 0,8, 0,9, 1,0, 1,3, 1,8, 1,9, e 2,1 kb. Os isolados F50v e F59v compartilham um perfil semelhante, ambos com 3 fragmentos de aproximadamente 1,6, 1,8 e 2,0 kb. Os isolados F11v e F30v apresentaram 2 fragmentos cada um, com aproximadamente 1,2 e 1,6 Kb, entretanto, sua natureza não pôde ser determinada neste estudo (os ácidos nucleicos degradaram durante as manipulações em laboratório e após várias tentativas de extração usando protocolos diferentes, não foi possível concluir a análise destes isolados). Foram realizados tratamento dos ácidos nucleicos com nucleases para determinar a natureza das bandas adicionais observadas. Contudo, o dsRNA foi confirmado apenas nas linhagens F2v, F42v, F50v e F59v (figura 2).

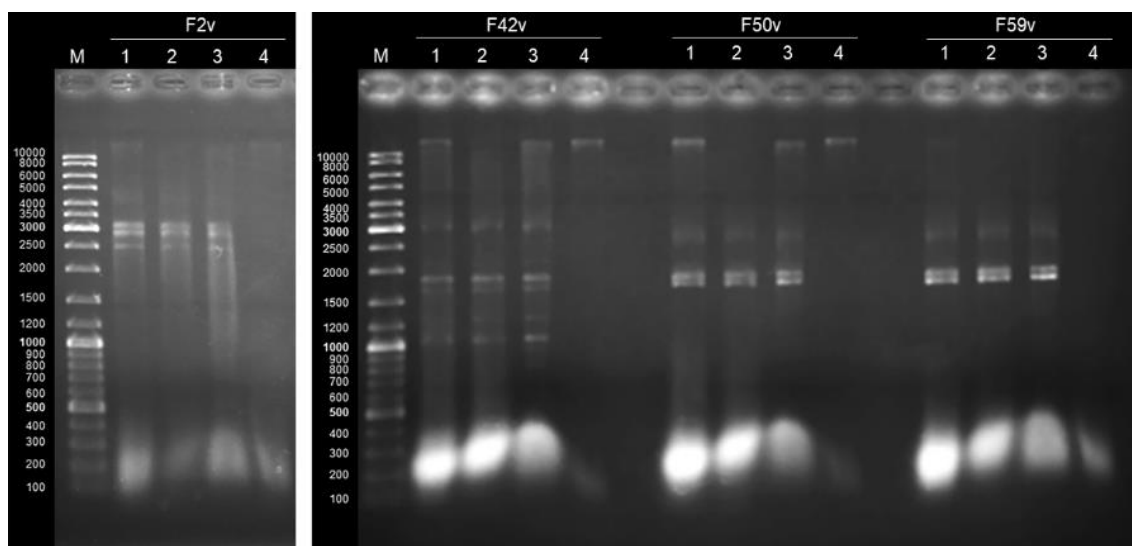
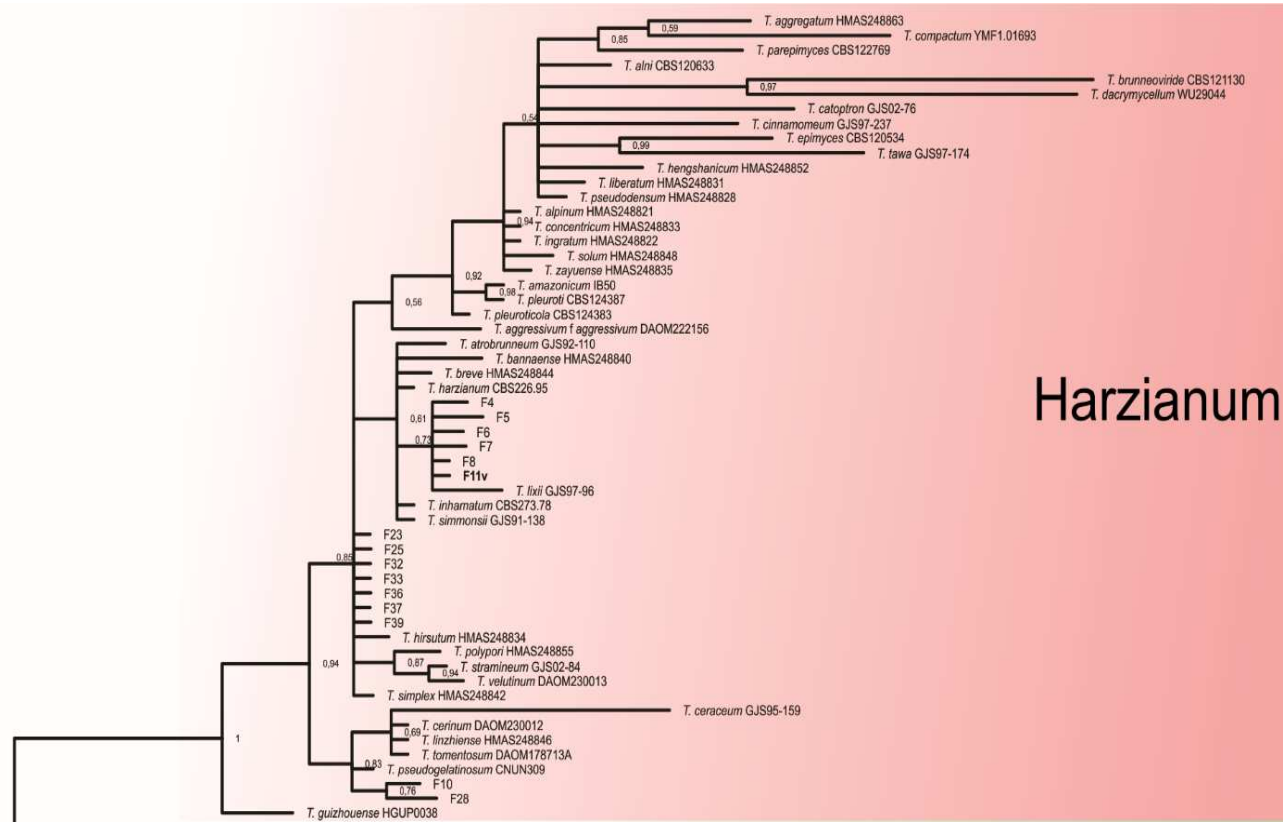


Figura 2. Perfil de ácidos nucleicos de *Trichoderma* spp. após digestão com nucleases. Linhas: 1) ácidos nucleicos sem digestão enzimática (contém DNA e RNA); 2) ácidos nucleicos tratados com DNase RQ1 (contém RNA); 3) ácidos nucleicos tratados com Nuclease S1 (contém dsRNA); 4) ácidos nucleicos tratados com RNase A (contém DNA); M) marcador O'GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América). Observe que nestes perfis ocorreu uma migração conjunta de fragmentos, ocultando a visualização de pelo menos uma banda em cada um.

### 3.3. Análise filogenética

A posição filogenética geral dos *Trichoderma* isolados neste estudo foi obtida com base nas sequências da região ITS de 39 linhagens (linhagens cujas sequências apresentaram qualidade insuficiente para montagem dos contigs foram desconsideradas nas análises) e 102 sequências disponíveis no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) (Apêndice A). De acordo com esta análise, os isolados foram agrupados nos clados *Brevicompectum* (6 isolados), *Harzianum* (15 isolados) e *Viride* (18 isolados), suportados por valores de probabilidade a *posteriori* iguais a 1 (figura 3). Devido à baixa resolução filogenética provida pelo marcador ITS, poucos ramos da árvore apresentaram valores de probabilidade a *posteriori* maiores ou iguais a 0,95, o que dificulta a identificação das espécies. Todavia, utilizando as sequências da região ITS e dos genes *act* e *tefl-α*, a análise filogenética permitiu identificar ao nível de espécie os isolados F2v (*Trichoderma asperelloides*), F30v e F42v (*Trichoderma koningiopsis*) e F50v e F59v (*Trichoderma arundinaceum*), todas com probabilidade a *posteriori* igual a 1. O isolado F11v foi posicionado junto a *Trichoderma lixii*, porém, com um valor de probabilidade a *posteriori* inferior a 0,95. Estas espécies foram agrupadas nos clados *Brevicompectum* (F50v e F59v), *Harzianum* (F11v) e *Viride* (F2v, F30v e F42v), todos suportados por valores de probabilidade a *posteriori* iguais a 1 (figura 4).





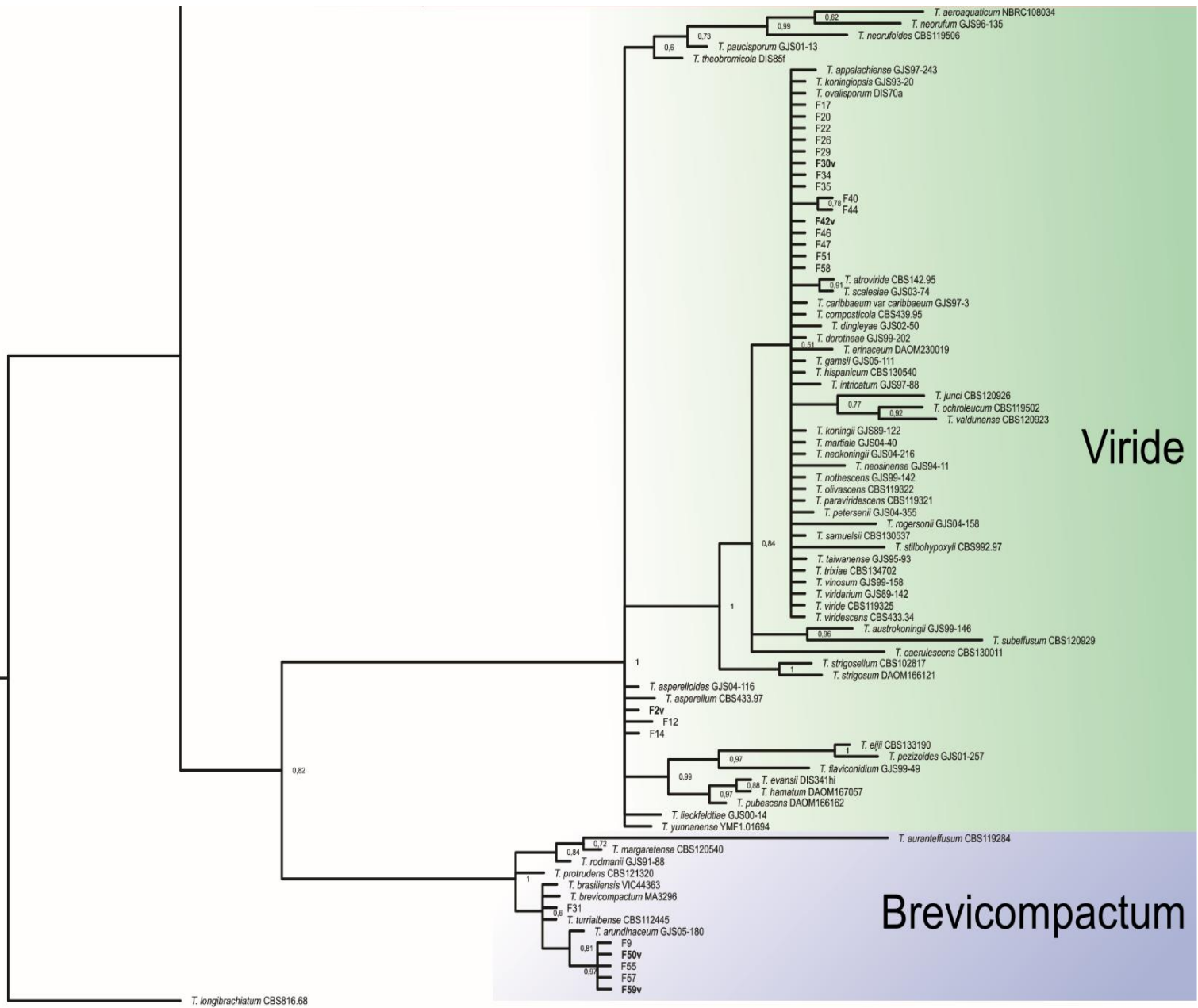
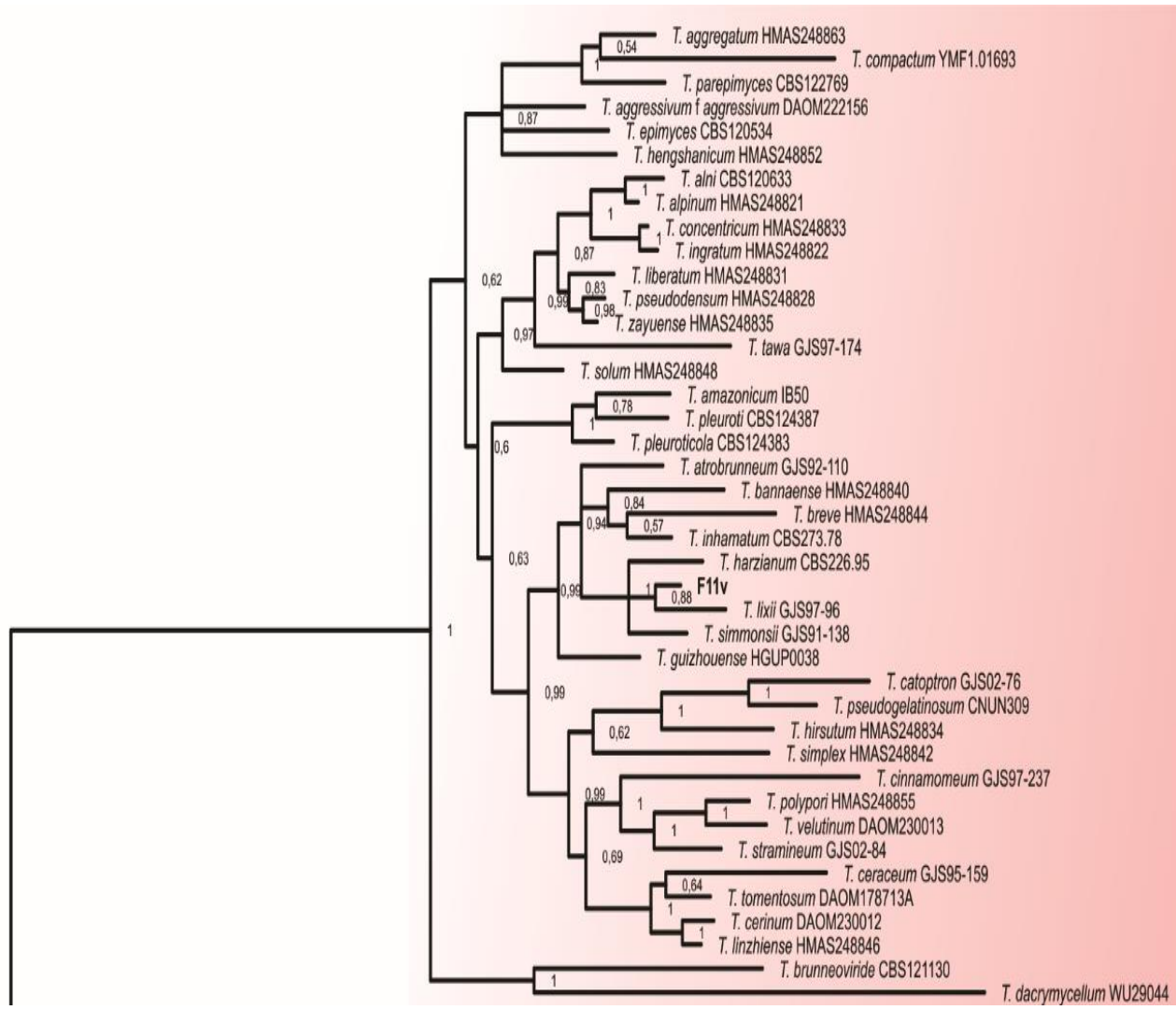
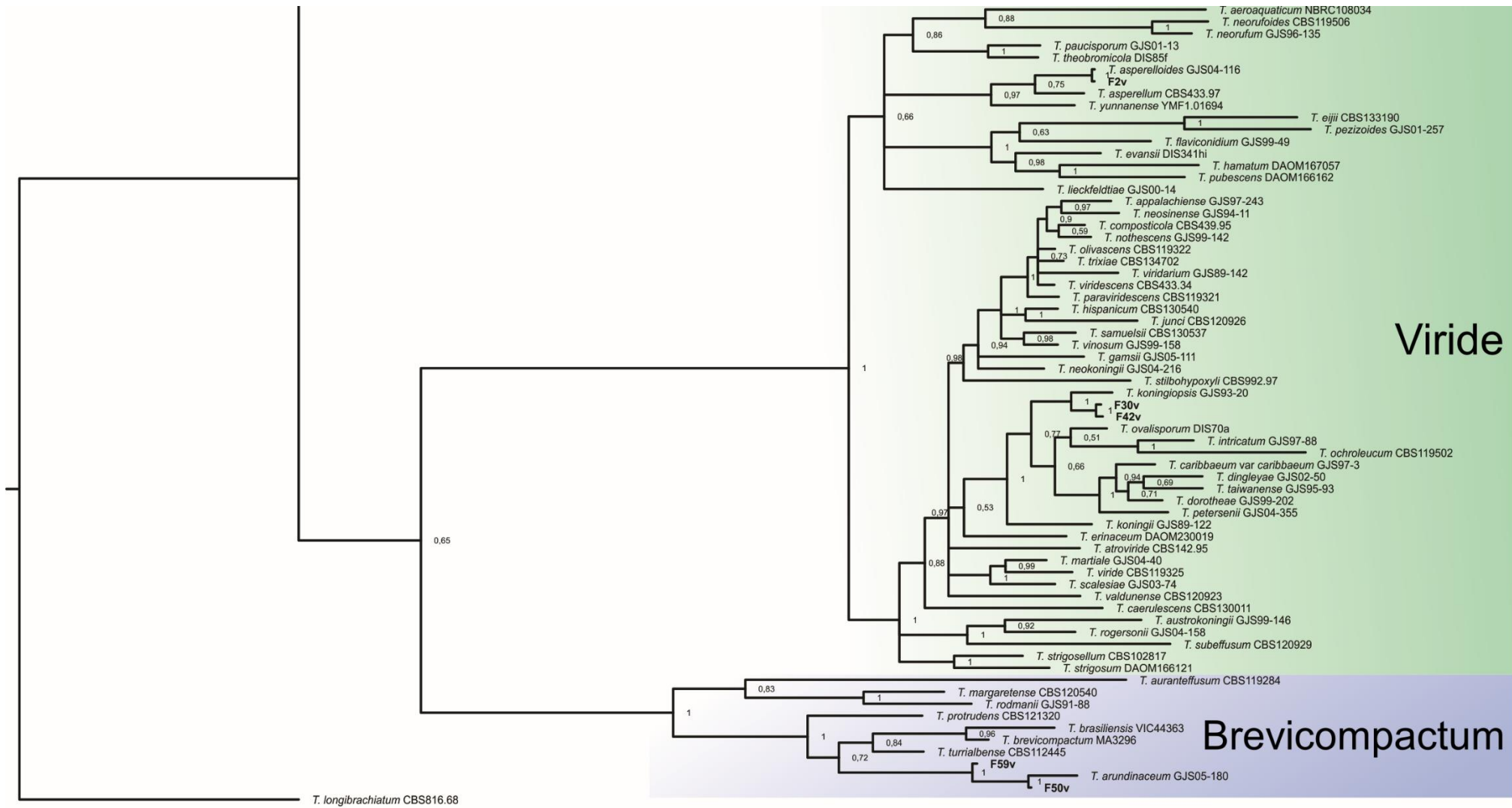


Figura 3. Árvore filogenética do marcador ITS gerada por Inferência Bayesiana. Os isolados portadores de dsRNA obtidos neste estudo estão destacados e os clados aos quais pertencem estão sombreados em tons de vermelho (clado Harzianum), verde (clado Viride) e azul (clado Brevicompectum). Numerais próximos aos ramos indicam a probabilidade a *posteriori*.



# Harzianum



0.07

Figura 4. Árvore filogenética concatenada dos marcadores *act*, *tefl-α* e ITS, gerada por Inferência Bayesiana. Os isolados obtidos neste estudo estão destacados e os clados aos quais pertencem estão sombreados em tons de vermelho (clado Harzianum), verde (clado Viride) e azul (clado Brevicom pactum). Numerais próximos aos ramos indicam a probabilidade a *posteriori*.

### 3.4. Antagonismo *in vitro*

Os seis isolados foram submetidos ao ensaio de cultura pareada e apresentaram resultados diferentes nos ensaios de inibição com cada um dos fitopatógenos (tabela 2) e nos ensaios de habilidade de micotrofia. Em relação ao *C. lindemuthianum* raça 89, não houve diferença estatística entre os isolados de *Trichoderma* (figura 5a) e todos foram capazes de crescer sobre o fitopatógeno (figura 6). Em relação ao *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, os isolados F2v, F11v, F30v e F42v mostraram os melhores resultados, enquanto que F50v e F59v foram inferiores (figura 5b). Somente os isolados F30v e F42v foram capazes de crescer sobre o fitopatógeno (figura 7). Quando avaliados contra *S. sclerotiorum*, os isolados de *Trichoderma* não mostraram diferenças significativas entre si, exceto F59v (figura 5c). Nenhum isolado cresceu completamente sobre este fitopatógeno, embora coberturas superiores a 40% tenham sido observadas para os isolados F30v e F42v (figura 8).

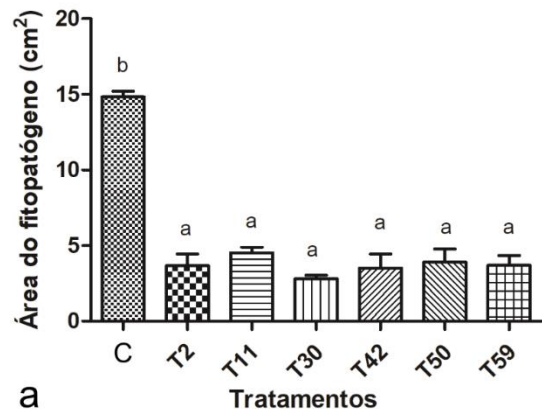
Tabela 2. Média do percentual de inibição dos fitopatógenos em testes de antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp.

Tratamento	Média do percentual de inibição / cultura pareada *			Média do percentual de inibição / produção de metabólitos *		
	<i>Cl.89</i>	<i>Fop</i>	<i>Ss</i>	<i>Cl.89</i>	<i>Fop</i>	<i>Ss</i>
<b>T2</b>	74,79	89,98	54,51	19,91	6,09	2,97
<b>T11</b>	69,01	87,36	61,32	7,29	2,77	5,07
<b>T30</b>	80,76	93,72	69,42	34,85	14,82	54,36
<b>T42</b>	75,91	92,31	72,36	35,56	20,13	73,67
<b>T50</b>	73,26	78,8	55,06	90,79	59,54	100
<b>T59</b>	74,68	81,72	43,82	85,59	57,38	100

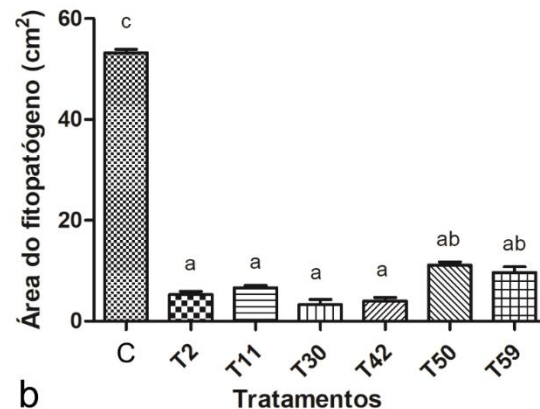
\* em relação ao controle de cada teste | *Cl.89* = *C. lindemuthianum* raça 89; *Fop* = *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*; *Ss* = *S. sclerotiorum*.

Em relação ao ensaio de produção de metabólitos, também foi observada heterogeneidade nos resultados. No ensaio com *C. lindemuthianum* raça 89, os isolados F50v e F59v demonstraram os melhores resultados, seguidos por F30v, F42v, F2v e F11v. Em todos os tratamentos o crescimento do fitopatógeno foi inferior ao controle (figura 9a e figura 10). No ensaio com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, F50v e F59v apresentaram os melhores resultados (equivalentes), seguidos por F30v e F42v. Todavia, as taxas de crescimento do fitopatógeno nos tratamentos correspondentes aos isolados F2v e F11v não diferiram do controle (figura 9b e figura 11). O mesmo padrão se manteve no ensaio com *S. sclerotiorum*, onde F50v e F59v mostraram os maiores níveis de inibição seguidos por F30v e F42v. O crescimento de *S. sclerotiorum* nos tratamentos com os isolados F2v e F11v foi semelhante ao controle (figura 9c e figura 12).

*Trichoderma* x *C. lindemuthianum* raça 89



*Trichoderma* x *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*



*Trichoderma* x *S. sclerotiorum*

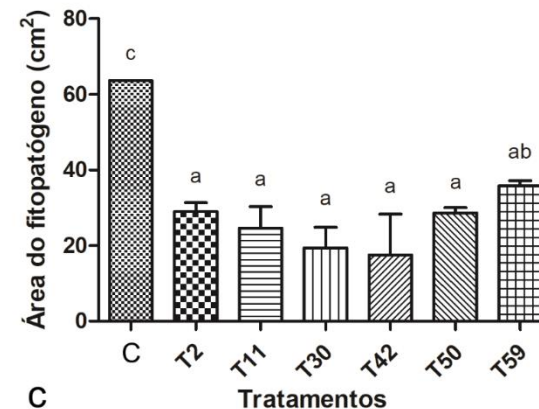


Figura 5. Inibição de três fitopatógenos por isolados de *Trichoderma* spp. Foi avaliado o diâmetro das colônias dos fitopatógenos em experimentos de cultura dupla. (a) *Colletotrichum lindemuthianum* raça 89 (teste em meio BDA, incubado a 22 °C e avaliado após 10 dias); (b) *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (teste em meio BDA, incubado a 25 °C e avaliado após 7 dias); (c) *Sclerotinia sclerotiorum* (teste em meio BDA, incubado a 25 °C e avaliado após 3 dias). C = tratamento controle; T2 = tratamento F2v; T11 = tratamento F11v; T30 = tratamento F30v; T42 = tratamento F42v; T50 = tratamento F50v e T59 = tratamento F59v. Letras iguais nas colunas indicam que as médias e erro padrão não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

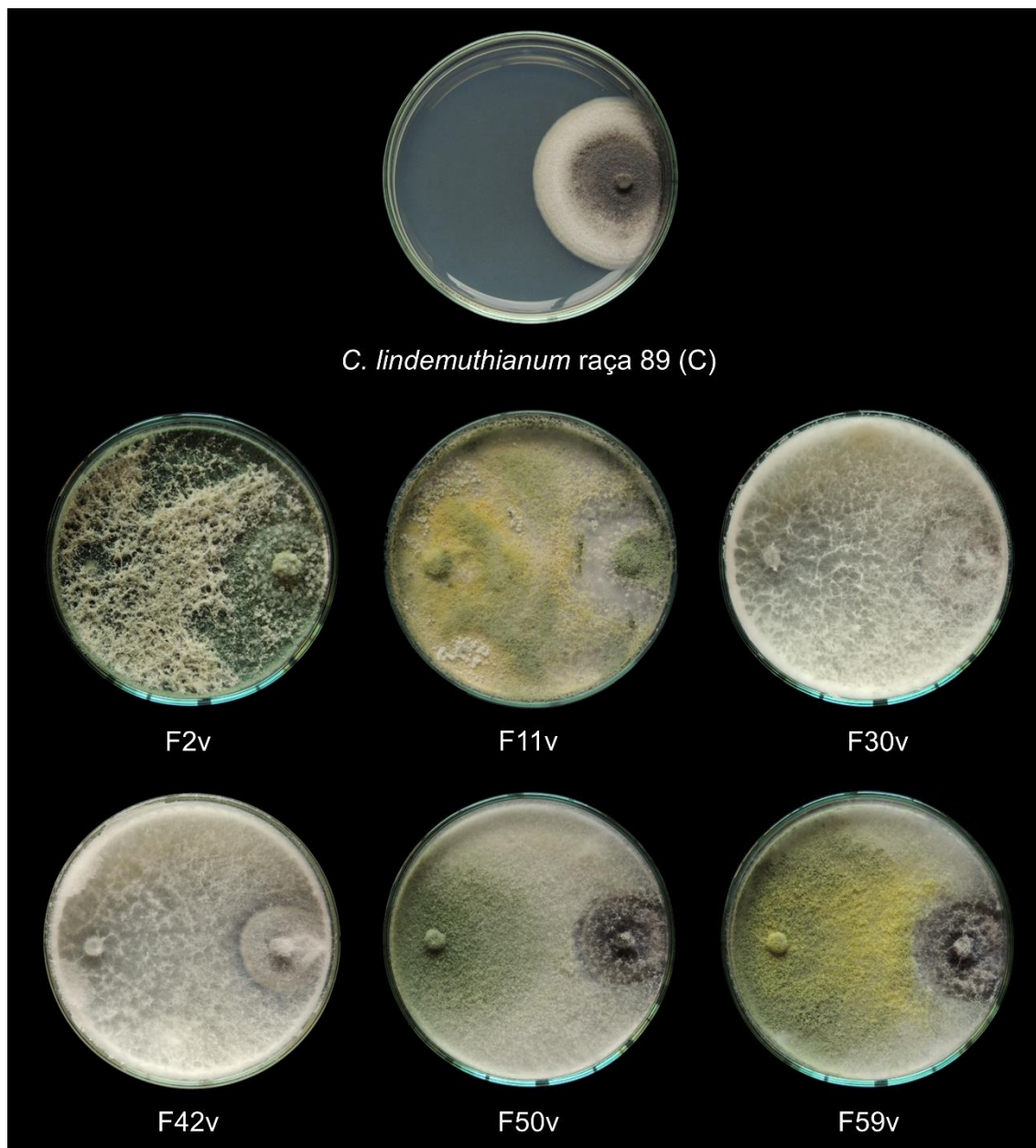


Figura 6. Teste de cultura pareada entre *Trichoderma* spp. e *C. lindemuthianum*. Todos os isolados demonstraram habilidade de micotrofia e cresceram sobre a colônia do fitopatôgeno. O controle é indicado por “C”.

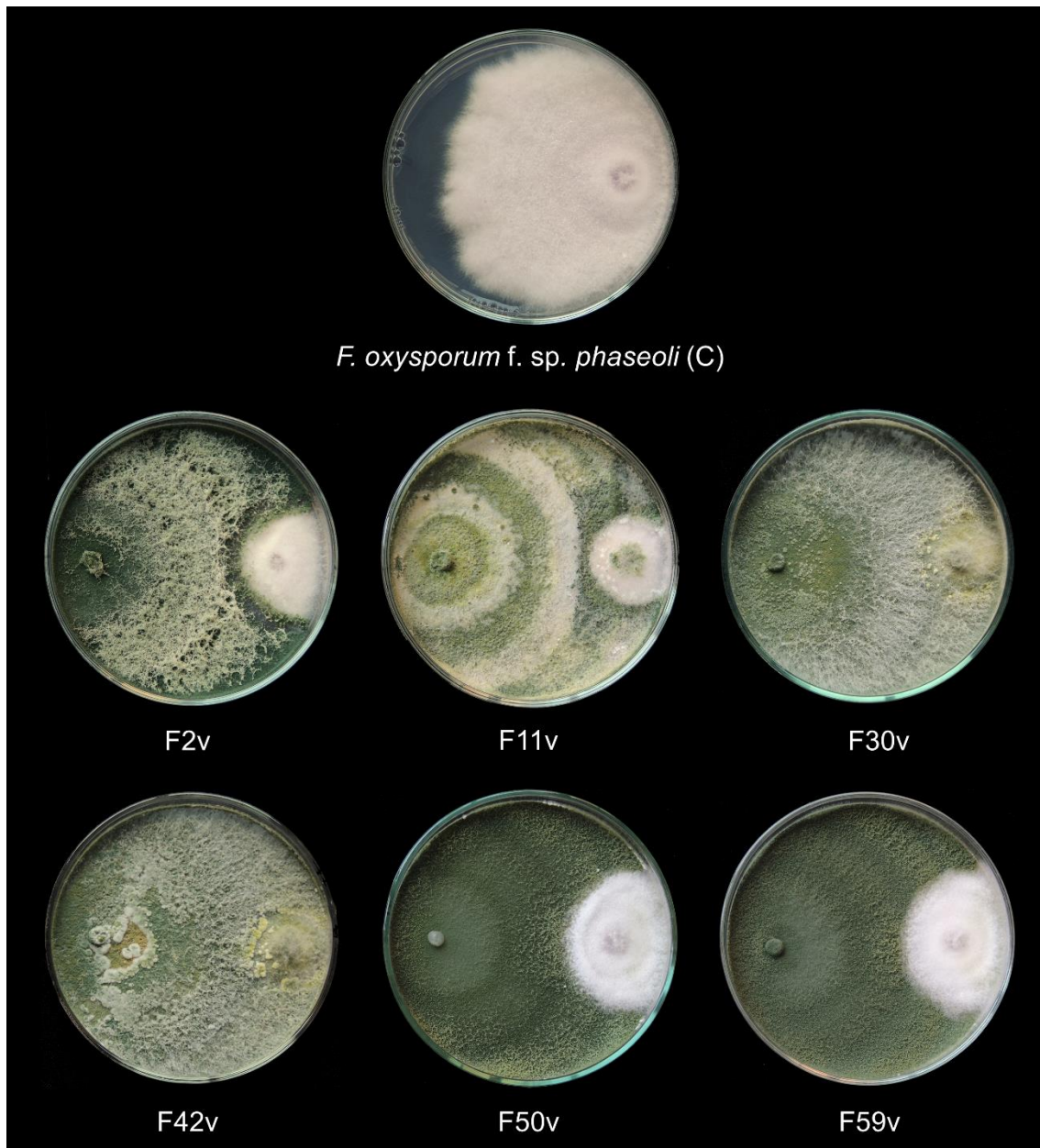


Figura 7. Teste de cultura pareada entre *Trichoderma* e *F. oxysporum f. sp. phaseoli*. Somente os isolados F30v e F42v cresceram sobre a colônia do fitopatógeno. O controle é indicado por “C”.

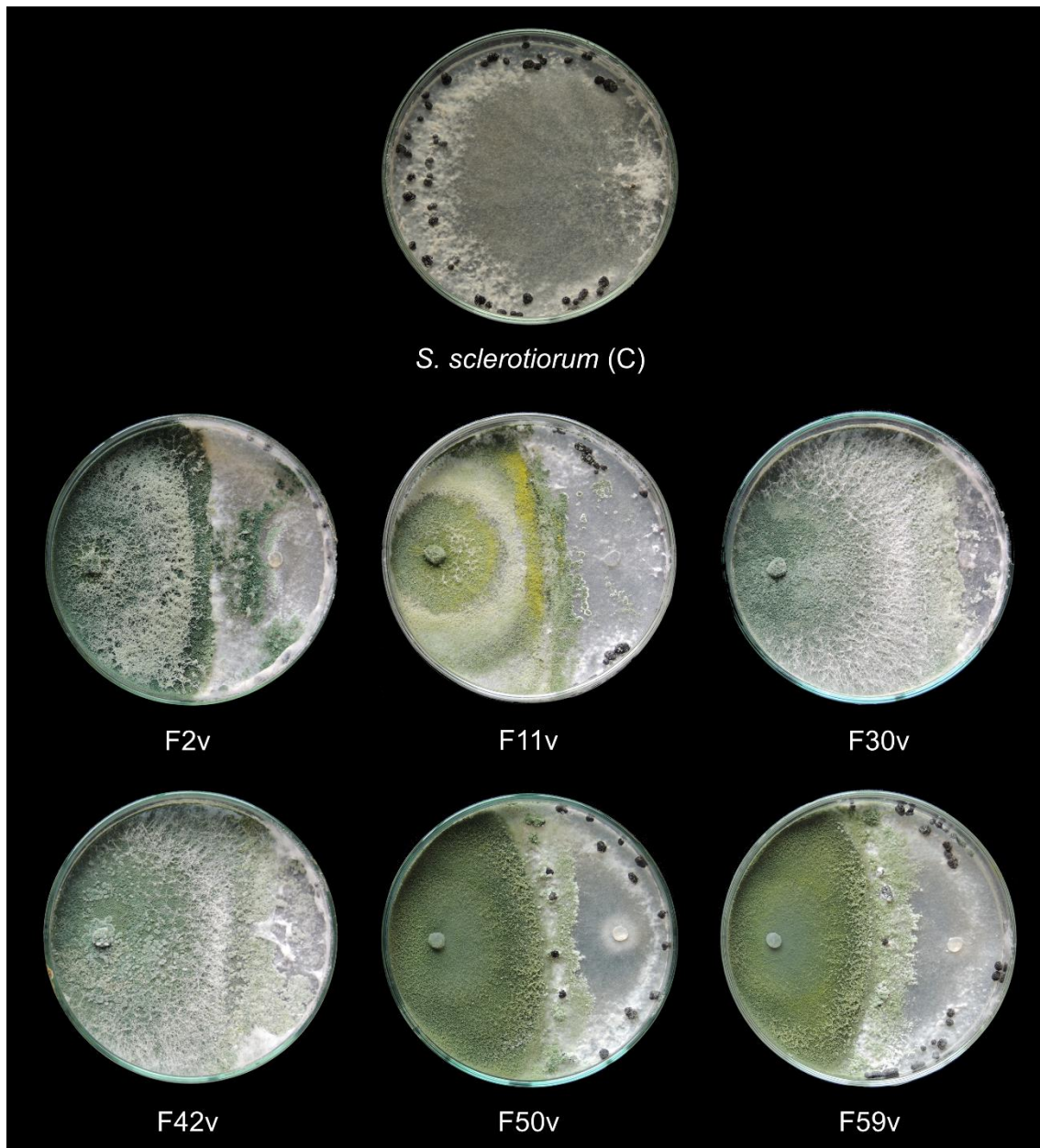
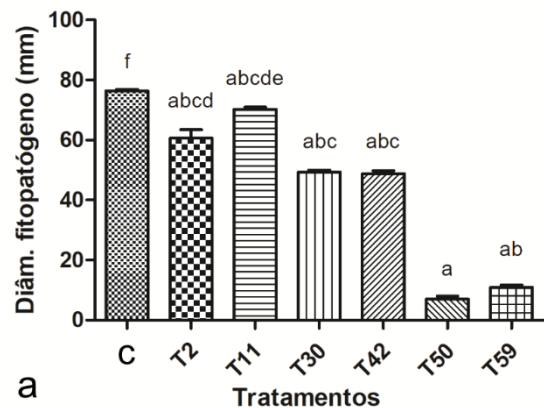
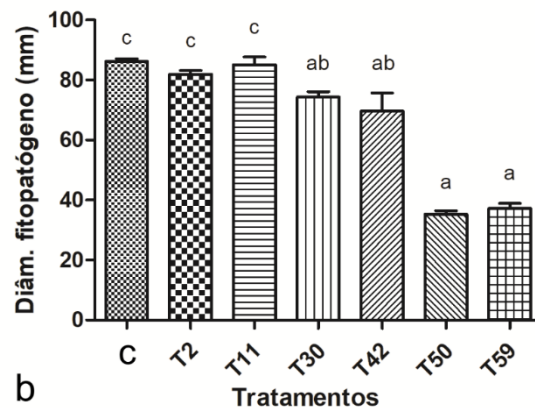


Figura 8. Teste de cultura pareada entre *Trichoderma* e *S. sclerotiorum*. Nenhum isolado cresceu totalmente sobre a colônia do fitopatógeno, embora seja possível notar várias partes cobertas pelo *Trichoderma*. O controle é indicado por “C”.

*Trichoderma* -> *C. lindemuthianum* raça 89



*Trichoderma* -> *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*



*Trichoderma* -> *S. sclerotiorum*

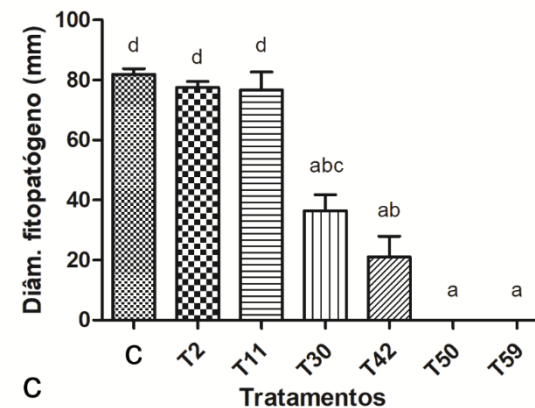


Figura 9. Inibição de fitopatógenos por metabólitos de *Trichoderma* spp. (a) *Colletotrichum lindemuthianum* raça 89 (teste em meio BDA, incubado a 22 °C e avaliado após 10 dias); (b) *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (teste em meio BDA, incubado a 25 °C e avaliado após 7 dias); (c) *Sclerotinia sclerotiorum* (teste em meio BDA, incubado a 25 °C e avaliado após 3 dias). C = tratamento controle; T2 = tratamento F2v; T11 = tratamento F11v; T30 = tratamento F30v; T42 = tratamento F42v; T50 = tratamento F50v e T59 = tratamento F59v. Letras iguais nas colunas indicam que as médias e erro padrão não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

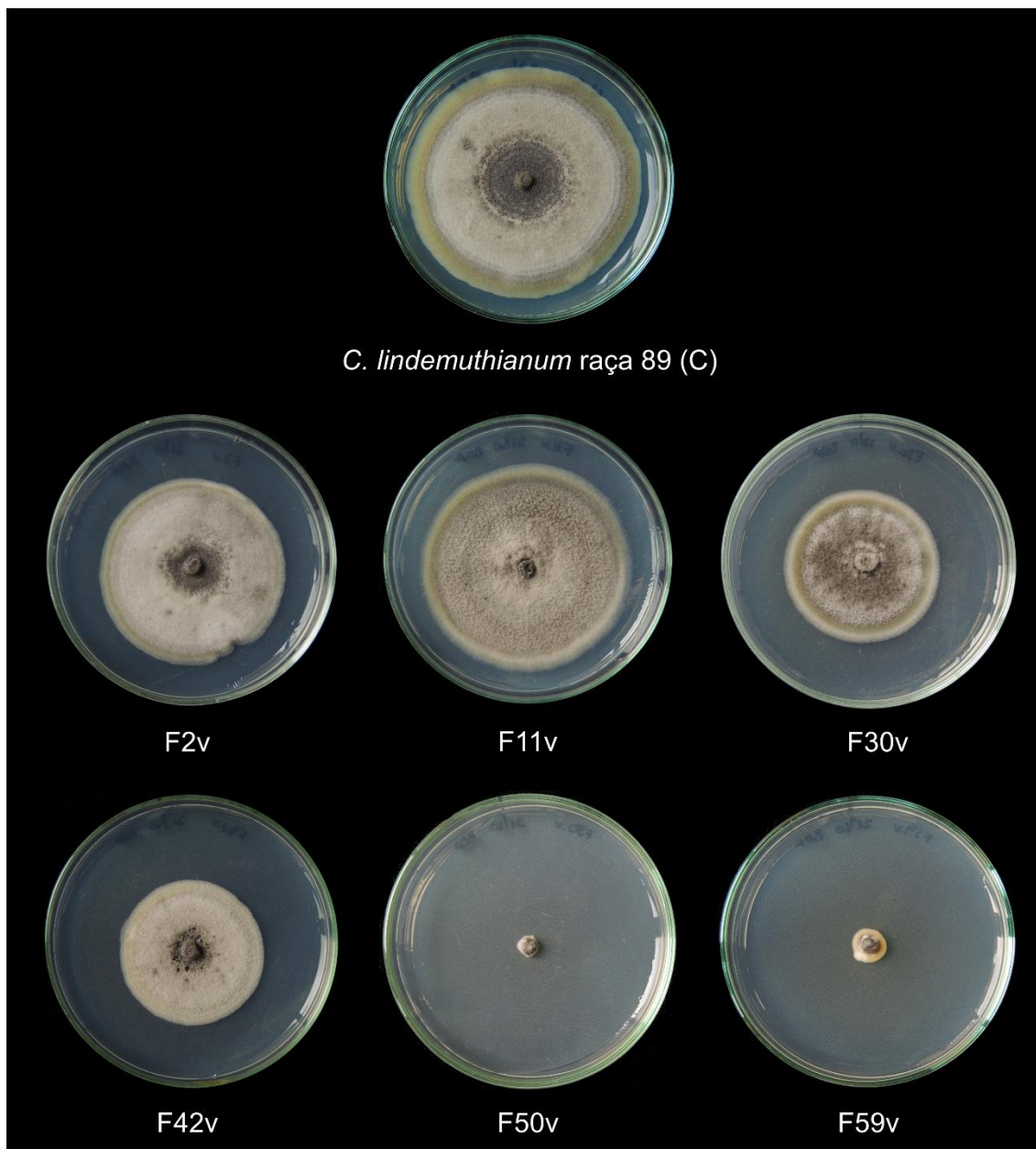


Figura 10. Inibição de *C. lindemuthianum* por metabólitos secretados por *Trichoderma* spp. Todos os isolados foram eficientes na inibição do crescimento do fitopatógeno, com destaque para F50v e F59v. O controle é indicado por “C”.

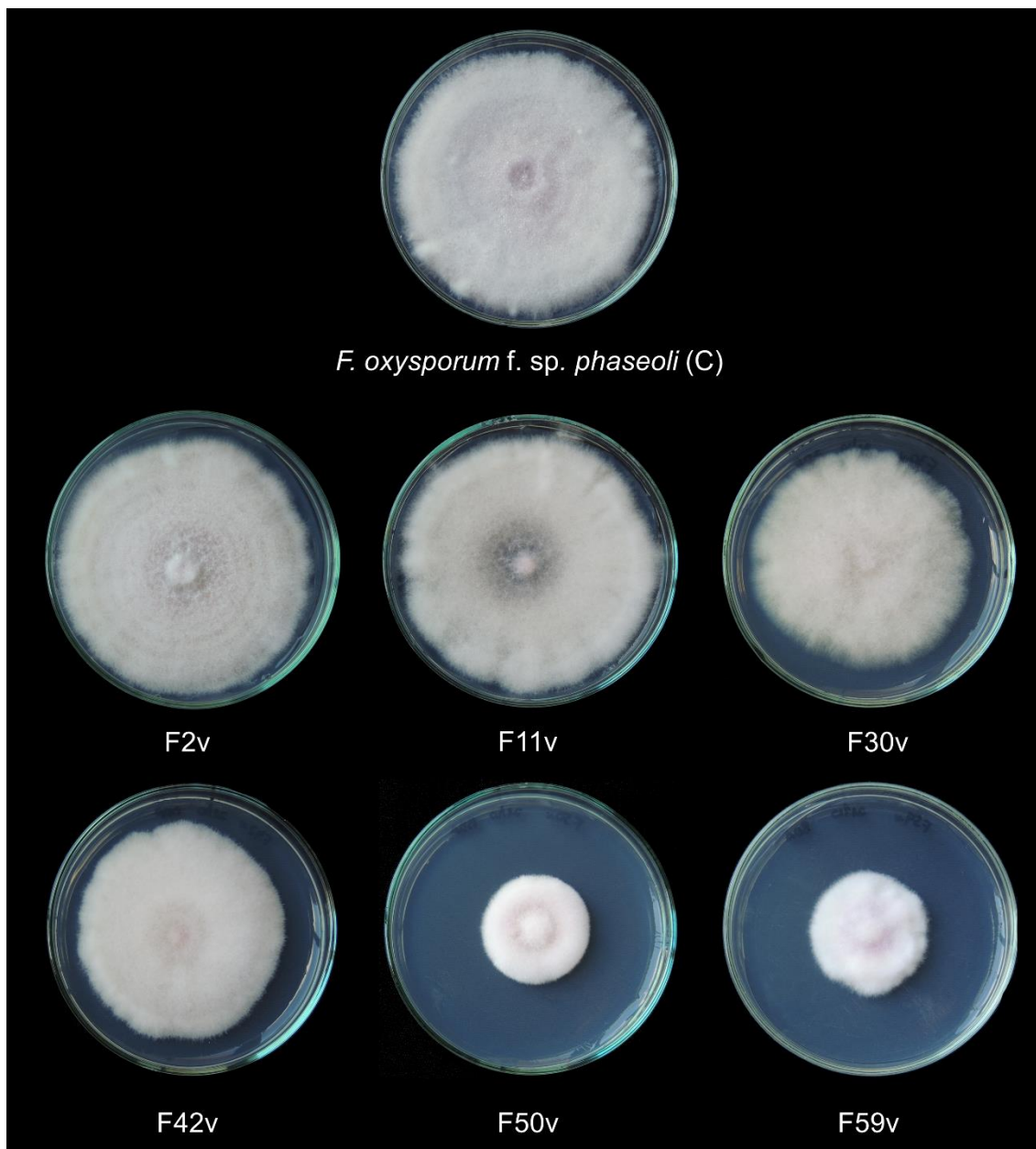


Figura 11. Inibição de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* por metabólitos secretados por *Trichoderma* spp. Os tratamentos com os isolados F2v e F11v não diferiram do controle. Os isolados F50v e F59v foram os mais eficientes. O controle é indicado por “C”.

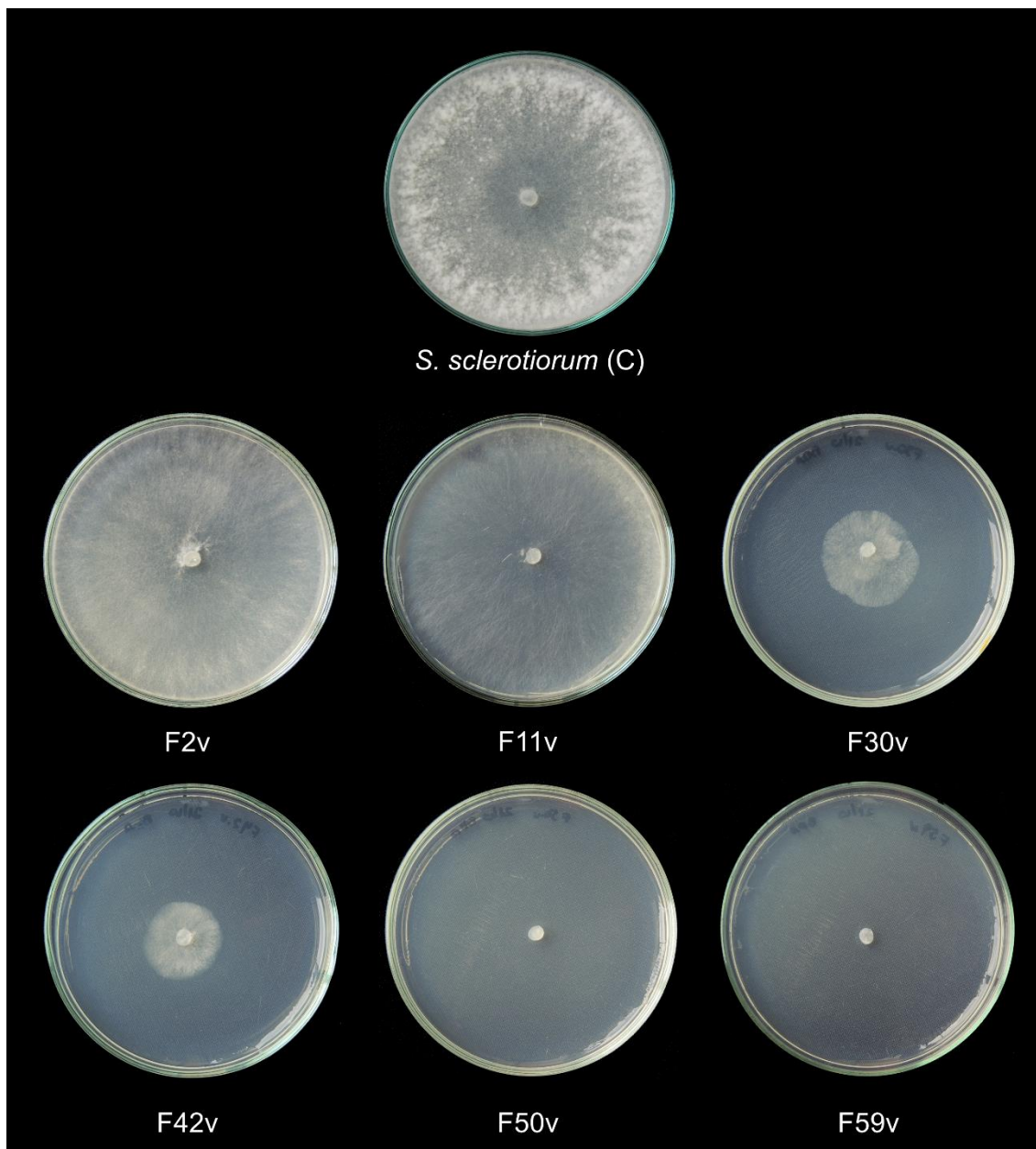


Figura 12. Inibição de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos secretados por *Trichoderma* spp. Os tratamentos com os isolados F2v e F11v não diferiram do controle. Os isolados F50v e F59v foram os mais eficazes, seguidos por F30v e F42v. O controle é indicado por “C”.

### 3.5. Promoção de crescimento

Os isolados selecionados foram analisados quanto a capacidade de promoção de crescimento de plantas de feijoeiro. A análise da massa seca total dos feijoeiros tratados revelou que o maior ganho de massa foi obtido nas plantas dos tratamentos com os isolados F42v e

F50v (figuras 14a e 14b), que não diferiram estatisticamente entre si. A análise das plantas dos demais tratamentos (F2v, F11v, F30v e F59v) não apontou diferenças significativas em comparação com as plantas do tratamento controle (figura 13a). Em relação ao sistema radicular, as plantas do tratamento com o isolado F42v apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. Os demais tratamentos não tiveram diferenças relevantes (figura 13b e figura 14c).

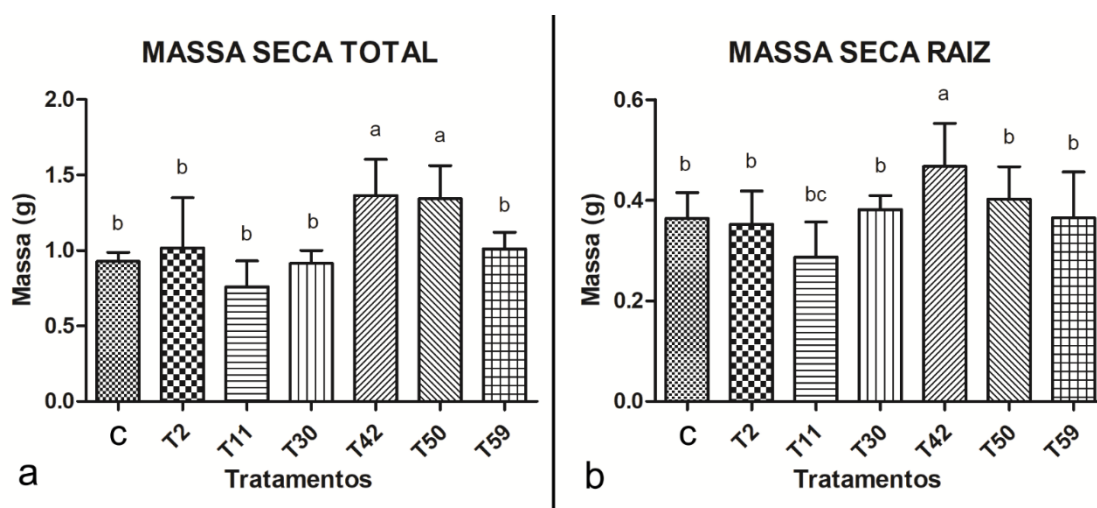


Figura 13. Promoção de crescimento do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) por *Trichoderma* spp. (a) massa seca total das plantas. Os tratamentos T42 e T50 diferiram estatisticamente do controle. (b) massa seca do sistema radicular das plantas. O tratamento T42 foi estatisticamente diferente do controle. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas. C = tratamento controle; T2 = tratamento F2v; T11 = tratamento F11v; T30 = tratamento F30v; T42 = tratamento F42v; T50 = tratamento F50v e T59 = tratamento F59v. Letras iguais nas colunas indicam que as médias e erro padrão não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

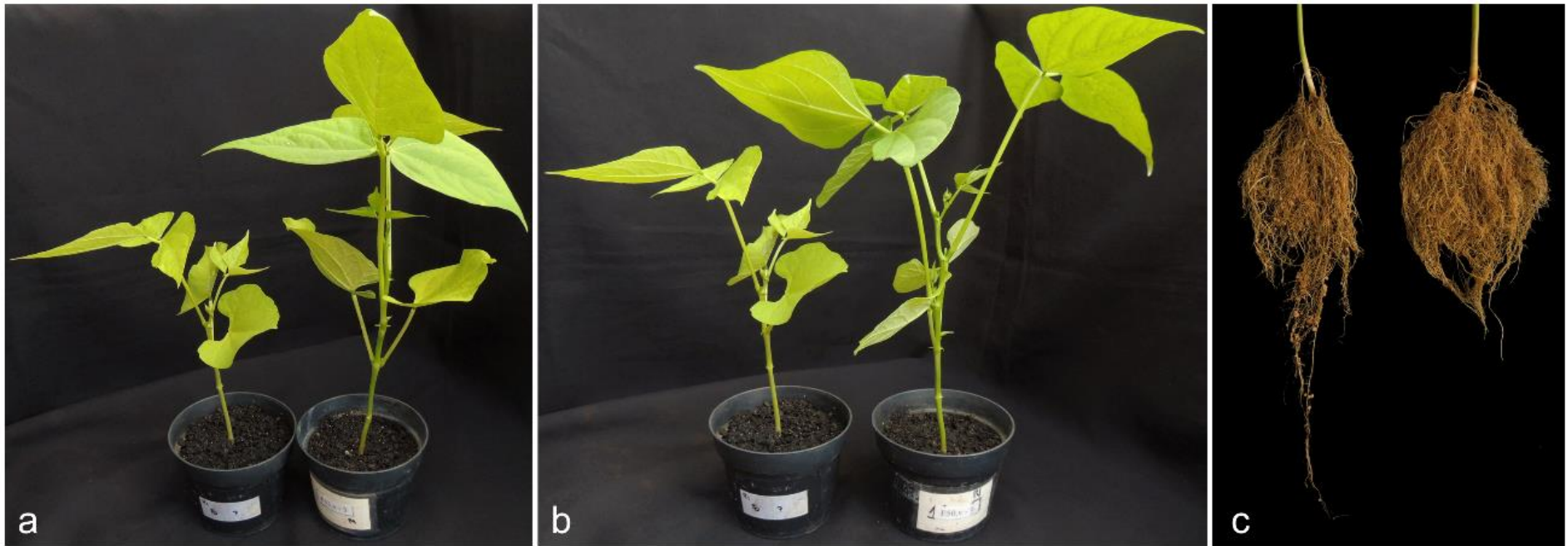


Figura 14. Promoção de crescimento do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) por *Trichoderma* spp. (A) feijoeiro sem tratamento, controle (esquerda), e feijoeiro tratado com F42v (direita). (B) feijoeiro sem tratamento, controle (esquerda), e feijoeiro tratado com F50v (direita). Os tratamentos com F42v e F50v foram significativos para o parâmetro massa seca total. (C) sistemas radiculares de um feijoeiro sem tratamento, controle (esquerda) e de um feijoeiro do tratamento com F42v (direita). O tratamento com F42v foi significativo para o parâmetro massa seca do sistema radicular.

## 4. DISCUSSÃO

Este estudo descreve a presença de dsRNA em isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de amostras de solos de plantações de feijoeiro, no estado de Minas Gerais, bem como a capacidade de alguns isolados de promoverem o crescimento do feijoeiro e de inibição de 3 fitopatógenos que acometem esta cultura. Com base na análise filogenética da sequência de nucleotídeos dos marcadores *act*, *tefl-α* e ITS, estes isolados foram posicionados em três clados diferentes.

### 4.1. Identificação molecular e análise filogenética

Os 59 isolados de *Trichoderma* spp. tiveram a região ITS sequenciada. Embora tenham sido realizadas análises com outros marcadores apenas para os portadores de dsRNA (*T. arundinaceum*, *T. asperelloides* e *T. koningiopsis*) a análise da região ITS fornece um vislumbre da diversidade deste gênero nos solos amostrados. *Trichoderma koningiopsis*, a espécie mais abundante dentre os solos amostrados, foi isolada pela primeira vez a partir de um galho (hospedeiro não informado) em Cuba e pode assumir um estilo de vida endofítico, comumente em cacauzeiros e outras espécies do gênero *Theobroma* ou pode sobreviver como saprófita na serrapilheira ou no solo. É uma espécie mesófila e pode ser encontrada nas zonas tropicais e temperadas (SAMUELS *et al.*, 2006). O segundo grupo mais numeroso abrange isolados relacionados a *T. harzianum*. Esta espécie foi inicialmente isolada de uma amostra de solo no Reino Unido. É muito abundante no solo e detritos vegetais e pode também ser encontrada como endofítica. Assim como *T. koningiopsis*, *T. harzianum* é mesófilo, mas está bem distribuído ao longo dos continentes nas zonas tropicais e temperadas, exceto em áreas polares (RIFAI, 1969 *apud* CHAVERRI *et al.*, 2015). A terceira espécie mais abundante, *T. arundinaceum* teve sua linhagem tipo isolada de uma amostra de solo iraniano. Esta espécie foi descrita como cosmopolita, habitando as zonas tropicais e temperadas; não foram relatados isolados endofíticos (DEGENKOLB *et al.*, 2008). Por fim, *T. asperelloides*, primariamente isolado em solo vietnamita. É uma espécie saprófita de ampla distribuição mundial sobretudo em regiões tropicais, ocorre predominantemente no solo, embora seja capaz de colonizar tecidos vivos em arroz (endofítico oportunista) (SAMUELS *et al.*, 2010; LEON *et al.*, 2018). Isolados

pertencentes às espécies *T. asperellum*, *T. erinaceum*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis* e *T. tomentosum* foram anteriormente obtidos a partir de amostras de solo de plantações de feijão comum em ambiente de Cerrado coletados na mesma profundidade que este estudo em Goiás, Brasil (LOPES *et al.*, 2012). Além destes, isolados relacionados às mesmas espécies e a *T. brevicompactum*, *T. longibrachiatum* e *T. spirale* (com base no marcador ITS) foram obtidos de amostras do solo e do rizoplano de outras culturas importantes (milho, berinjela, quiabo, tomate, abóbora, mandioca e repolho) no Distrito Federal, Brasil (MARQUES *et al.*, 2016). Recentemente, outros 54 isolados identificados como *T. afroharzianum*, *T. asperelloides*, *T. asperellum*, *T. erinaceum*, *T. hamatum*, *T. koningiopsis*, *T. lentiforme*, *T. longibrachiatum*, além de duas espécies novas, *T. azevedoi* e *T. peberdyi* foram obtidos a partir de amostras de solo de culturas de alho e cebola originadas de 8 pontos de coleta nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, Brasil (INGLIS *et al.*, 2020). Um padrão de distribuição semelhante dessas espécies pode ser observado fora dos solos cultiváveis brasileiros. Na China, um grande levantamento de diversidade de *Trichoderma* identificou 50 espécies diferentes em mais de 5500 amostras de solo de ecossistemas florestais, de agricultura, de pastagem e de áreas úmidas/alagáveis em 28 províncias. A amostragem reconheceu a predominância das espécies *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. virens*, *T. hamatum*, *T. longibrachiatum*, *T. koningiopsis* e *T. brevicompactum*, respectivamente, nos ambientes analisados (DOU *et al.*, 2019).

Apesar da ampla distribuição de *Trichoderma* em uma grande variedade de solos agricultáveis, existem diferenças no padrão de distribuição de forma que nem todas as espécies são encontradas em todos os lugares. De modo geral, a comunidade de *Trichoderma* é estável e parece ser pouco afetada pela influência de fatores edáficos (OKOTH *et al.*, 2009; MUNIAPPAN & MUTHUKUMAR, 2014). Contudo, deve-se ressaltar que as condições do ambiente interferem diretamente na abundância de *Trichoderma*, dado que espécies diferentes se comportam de maneiras distintas em relação as condições do solo, como capacidade de campo, textura, pH e disponibilidade de macro e micronutrientes (OKOTH *et al.*, 2009; MUNIAPPAN & MUTHUKUMAR, 2014). Aparentemente, a diversidade de *Trichoderma* nos solos não responde a um fator principal único, mas sim, a um conjunto deles. Conforme apontado em estudos realizados em diferentes locais do planeta, existe uma microbiota comum, ou *core*, que é constituída por algumas espécies dominantes como *T. asperelloides*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. citrinoviride*, *T. gamsii*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. koningiopsis*, *T. longibrachiatum*, *T. spirale*, *T. virens* e *T. viride* (DANIELSON & DAVEY,

1973; KULLING *et al.*, 2000; WUCZKOWSKY *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2013; DU PLESSIS *et al.*, 2018). Estas espécies são dotadas de alta capacidade competitiva (ampla diversidade metabólica, rápido crescimento e alta produção de esporos) que lhes confere grande vantagem na colonização de ambientes diversificados (WOO *et al.*, 2006). Assim, a diferença na composição de espécies de *Trichoderma* além das espécies do *core* pode estar correlacionada principalmente à influência da vegetação (espécie, estágio de desenvolvimento) e a própria localização geográfica (BERG & SMALLA, 2009; GREEN & BOHANNAN, 2006). Duas observações a respeito dos padrões de distribuição deste gênero podem fornecer suporte a essa hipótese. A primeira é uma comparação dos dados de diversidade de espécies de *Trichoderma* em solos da rizosfera e rizoplano das espécies endêmicas *Rhododendron ferrugineum* e *Rhododendron hirsutum* (Áustria), *Aeonium cuneatum* e *Aeonium urbicum* (Tenerife, Ilhas Canárias), *Diospyros gracilipes* e *Diospyros gracilipes* (Madagascar) e *Hebe salicifolia* e *Hebe strictissima* (Nova Zelândia) com os isolados provenientes de solos de plantio de milho (*Zea mays*) (espécie cultivada globalmente) dos mesmos locais de coleta, onde é possível denotar uma diferença clara entre o conjunto de espécies associado a cada planta, o qual contém espécies comuns entre hospedeiros diferentes (*core*) e espécies não compartilhadas (ZACHOW *et al.*, 2016). Este fenômeno pode ser uma consequência da própria relação entre hospedeiro e fungo. Já se sabe há muito tempo que as plantas são capazes de estabelecer interações com a microbiota presente no solo através de seu sistema radicular. Os mecanismos moleculares que controlam o processo de reconhecimento e de associação entre *Trichoderma* e seus hospedeiros promovem uma conexão, no mínimo, complexa. A espécie *T. virens*, por exemplo, é capaz de se associar as raízes do milho em caráter benéfico. A linhagem Gv29-8 de *T. virens* possui um gene responsável por codificar uma invertase ( $\beta$ -frutofuranosidase) que lhe permite utilizar como fonte de carbono a sacarose, um dissacarídeo importante fornecido pelo hospedeiro presente também em seus exsudatos radiculares (VARGAS *et al.*, 2009). Curiosamente, em solos amostrados em dois pontos na floresta do Parque Nacional do Rio Danúbio, na Áustria, a maior diversidade de *Trichoderma* foi observada em horizontes com baixa densidade de raízes e/ou baixo teor de carbono, o que sugere que espécies que compõem nichos ecológicos independentes da rizosfera como *T. asperellum* podem obter o carbono necessário para seu desenvolvimento através de fontes alternativas, como a serrapilheira (FRIEDL & DRUZHININA, 2012). A segunda observação decorre de variações da ocorrência de *Trichoderma* dentro de áreas continentais extensas. Na China, por exemplo, uma amostragem de solos cultiváveis e substratos orgânicos em quatro províncias diferentes (Hebei

ao Norte, Zhejiang a Sudeste, Tibet a Oeste e Yunnan a Sudoeste) revelou dissimilaridade na distribuição deste fungo, onde as espécies *T. atroviride*, *T. citrinoviride*, *T. velutinum* e uma espécie não identificada foram predominantes nas amostras da região Norte e as espécies *T. cerinum*, *T. koningii*, *T. sinensis*, *T. virens*, *T. viride* e uma segunda espécie não identificada foram predominantes nas amostras da região Sul. Além disso, um gradiente Norte-Sul foi evidenciado para *T. harzianum* (ZHANG *et al.*, 2005). Estes “arranjos” espaciais das espécies podem estar relacionados a condições climáticas como temperatura e umidade médias favoráveis e/ou simplesmente pela própria distribuição física em resposta aos eventos de dispersão (DANIELSON & DAVEY, 1973; GREEN & BOHANNAN, 2006).

As linhagens obtidas neste estudo foram agrupadas nos clados Brevicompectum, Harzianum e Viride. Essa classificação, ainda que de modo grosseiro, pode ser facilmente obtida por meio da análise filogenética das sequências ITS1-5.8S-ITS2 contidas no marcador molecular ITS. Apesar de servir como base sobre a qual se desenvolveram os chamados *barcodes* (“códigos de barra”) em *Trichoderma* (DRUZHININA *et al.*, 2005), este marcador não possui resolução filogenética suficiente para delimitar espécies muito próximas. Para superar esta limitação, os pesquisadores introduziram novos marcadores moleculares contemplando íntrons e partes dos éxons de genes como *act* (actina), *cal* (calmodulina) (SAMUELS *et al.*, 2006), *ThEn-42* (endoquitinase) (LIECKFELDT *et al.*, 2000), *RPB2* (subunidade  $\beta$  da RNA polimerase II) (CHAVERRI *et al.*, 2003) e o mais poderoso deles, o *tefl- $\alpha$*  (fator de alongação da tradução 1 $\alpha$ ), capaz de mostrar a melhor resolução filogenética (KULLNIG-GRADINGER *et al.*, 2002; JAKLITSCH *et al.*, 2006). A análise desses *loci* oferece várias vantagens que posicionam a filogenia molecular um passo à frente da classificação baseada em caracteres morfológicos anteriormente utilizada. Um deles é a supressão de equívocos na classificação de espécies com grande similaridade morfológica, como *T. petersenii* e *T. rogersonii*, que se distinguem apenas pela taxa de crescimento no meio SNA (*T. rogersonii* cresce mais devagar do que *T. petersenii*) e pelos conídios encurtados de *T. petersenii* em relação a *T. rogersonii* (SAMUELS *et al.*, 2006) ou *T. asperellum* e *T. asperelloides*, que são morfológicamente indistinguíveis (SAMUELS *et al.*, 2010).

As espécies de maior abundância obtidas aqui representam os clados Viride, Harzianum e Brevicompectum, dos quais fazem parte muitas espécies cosmopolitas presentes em vários continentes (as espécies do *core*). Para nossa surpresa, a espécie *T. arundinaceum* (clado Brevicompectum) encontrada no solo das fazendas Mato Dentro e São Miguel em Presidente Bernardes/MG não foi reportada em nenhum outro estudo de diversidade de *Trichoderma* em

solos agricultáveis brasileiros, chineses ou europeus, embora tenha sido isolada em território norte-americano (Estados Unidos da América) e africano (Namíbia), além da sua descrição original no oriente médio (Irã) (DEGENKOLB *et al.*, 2008).

A topologia das árvores filogenéticas dos seis isolados apresentadas aqui está de acordo com o observado em outros trabalhos com *Trichoderma* isoladas na China e Europa (CHEN & ZHUANG, 2017; JAKLITSCH & VOGLMAYR, 2015). A reconstrução filogenética foi reativamente bem suportada, mesmo utilizando 3 dos 6 marcadores disponíveis (ACT, TEF1- $\alpha$  e ITS). Entretanto, deve ser enfatizado que quanto maior o número de *loci* incluído na análise, maior será a resolução da filogenia.

#### 4.2. dsRNA em *Trichoderma*

Entre os 59 isolados de *Trichoderma* spp. coletados, seis (10%) apresentaram perfis de ácidos nucleicos condizentes com a presença de micovírus e em quatro destes foi confirmada a presença de dsRNA. Este valor é superior ao reportado anteriormente em outros estudos. Para efeito de comparação, a taxa de ocorrência de dsRNA em *Trichoderma* variou entre 2,77% (2 em 72 isolados) em linhagens obtidas a partir de solo na China (YOU *et al.*, 2019), 1,28% (2 em 156 isolados) em linhagens obtidas a partir de solo e substrato de cultivo de cogumelos na Tailândia (JOM-IN & AKARAPISAN, 2009) e 0,66% (1 em 150 isolados) em linhagens obtidas em florestas e pastagens na China (LIU *et al.*, 2019b). Por outro lado, esta taxa atingiu 10,15% (32 em 315 isolados) em linhagens obtidas a partir de substrato de cultivo de cogumelos na Coreia do Sul (YUN *et al.*, 2016). Em relação a outras espécies, foram relatadas taxas de ocorrência de dsRNA de 2,29% (19 em 827 isolados) para *Fusarium graminearum* (CHU *et al.*, 2004) e 71,5% (143 em 200 isolados) para *Botrytis cinerea* (HOWITT *et al.*, 1995).

Os resultados revelaram 3 perfis diferentes de dsRNA nos isolados (F2v = 4 segmentos; F42v = 7 segmentos; F50v e F59v = 3 segmentos). Esta variação no padrão dsRNA parece ser extremamente comum em fungos filamentosos e não se limita apenas aos micovírus descritos em *Trichoderma*. Até o momento, existem 10 publicações relatando a incidência de dsRNA em fungos do gênero *Trichoderma*, sendo a primeira delas datada de 11 anos atrás (JOM-IN & AKARAPISAN, 2009). Dentro do conjunto de espécies de fungos utilizados como ferramentas de controle biológico, a presença de dsRNA diversificado também foi descrita para as espécies

*Metarhizium anisopliae* (entomopatogênico), variando de 1 a 8 fragmentos em 3 perfis diferentes (0,7 a 4,1 kb) (BOGO *et al.*, 1996); *Beauveria bassiana* (entomopatogênico), variando de 1 a 3 fragmentos em 2 perfis diferentes (1,8 a 2,3 kb) (MELZER & BIDOCHKA, 1998); *Cordyceps fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) (entomopatogênico), com 3 fragmentos e 2 perfis diferentes (0,5 a 4,5 kb) (AZEVEDO *et al.*, 2000); e *Purpureocillium lilacinum* (entomopatogênico e nematófago), variando de 1 a 3 fragmentos em 9 perfis diferentes (1,6 a 6,0 kb) (HERRERO, 2016).

O dsRNA também foi observado em espécies fitopatogênicas importantes como *F. graminearum* (CHU *et al.*, 2002; CHU *et al.*, 2004), *F. oxysporum* (KILIC & GRIFFIN, 1998), *Colletotrichum gloeosporioides* (FIGUEIRÊDO *et al.*, 2012), *C. lindemuthianum* (RAWLINSON *et al.*, 1975), *B. cinerea* (KANO *et al.*, 1980 *apud* HOWITT *et al.*, 1995), *S. sclerotiorum* (BOLAND, 1992), *Magnaporthe grisea* (CHUN & LEE, 1997), *Cryphonectria parasitica* (DAY *et al.*, 1977) e indiretamente em *Phakopsora pachyrhizi* (LINK *et al.*, 2014), entre outros. Do mesmo modo, dsRNA de origem viral foi descoberto em fungos de interesse industrial como *Aspergillus foetidus* e *Aspergillus niger* (BANKS *et al.*, 1970), *Penicillium chrysogenum* (BUCK *et al.*, 1971), a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BERRY & BEVAN, 1972) e em muitos outros.

O isolado F2v identificado como *T. asperelloides* carrega segmentos de dsRNA com aproximadamente 2,5, 2,9, 3,2 e 3,9 kb. Até o momento, não existem outras descrições de dsRNA para esta espécie na literatura. Contudo, em uma espécie estritamente relacionada foi identificado um dsRNA de natureza viral. A linhagem JLM45-3 de *T. asperellum* foi isolada em uma amostra de solo chinês da província de Guizhou e possui um único segmento de dsRNA duas vezes maior do que o maior dos segmentos encontrado em F2v, designado como *T. asperellum* dsRNA Virus 1 (TaRV1, família não classificada) (ZHANG *et al.*, 2018). Um perfil similar ao observado em F2v foi descrito na linhagem ATCC 9480 de *P. chrysogenum*. Cada um dos 4 segmentos do *Penicillium chrysogenum* virus (PcV, *Chrysoviridae*), dsRNA4 e dsRNA3 (~2,9 kb), dsRNA2 (~3,2 kb) e dsRNA1 (~3,5 kb) possui uma única ORF que codifica proteínas hipotéticas de 95 e 101 kDa; a proteína do capsídeo (CP) e a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (JIANG & GHABRIAL, 2004).

Em relação ao isolado F42v, *T. koningiopsis*, foi confirmada a presença de cerca de 7 segmentos de dsRNA (~0,8, 0,9, 1,0, 1,3, 1,8, 1,9 e 2,1 kb, figura 3). A existência de micovírus de dsRNA foi anteriormente reportada em isolados relacionados (identificados apenas com o

marcador ITS), entretanto, o número e o tamanho dos segmentos observados são distintos. Dois isolados, NFCF132 e NFCF134, originados de fazendas de cultivo de cogumelos comestíveis sul coreanas (Gyonggi-do), são portadores de dsRNA viral. O primeiro abriga três segmentos de aproximadamente 1,8, 2,0 e 2,3 kb enquanto o segundo carrega um único segmento de aproximadamente 10 kb (YUN *et al.*, 2016). Estes micovírus foram parcialmente caracterizados, mas os detalhes do genoma e sua classificação não estão disponíveis. Outros dois dsRNAs virais foram observados na linhagem Mg10 proveniente de uma amostra de solo de Rotorua, Nova Zelândia. Os dsRNAs de aproximadamente 3,5 kb (dsRNA-S) e 5,0 kb (dsRNA-L) são, na verdade, dois micovírus diferentes (a caracterização completa do segmento menor não está disponível). O dsRNA-L possui duas ORFs não sobrepostas: a ORF1 codifica a CP e a ORF2 codifica a RdRp. O micovírus foi denominado *Trichoderma koningiopsis* totivirus 1 (TkTV1, *Totiviridae*). Surpreendentemente, o TkTV1 também foi encontrado na linhagem Mg06 de *Clonostachys rosea* (Hypocreales) isolada da mesma amostra de solo, fornecendo indício da ocorrência de transmissão horizontal interespecífica (KHALIFA & MACDIARMID, 2019).

Por fim, os isolados F50v e F59v identificados como *T. arundinaceum* compartilham do mesmo perfil de dsRNA que apresenta três segmentos em torno de 1,6, 1,8 e 2,0 kb. Tal como F2v, até o momento não existem outras descrições de dsRNA para esta espécie na literatura e nem para nenhuma outra espécie que compõe clado *Brevicompectum*, o qual faz parte. Apesar disso, dsRNAs com três segmentos e tamanhos próximos foram relatados em isolados relacionados (identificados apenas com o marcador ITS) a outras espécies deste gênero. As linhagens NFCF092 de *T. harzianum*, NFCF133 de *T. petersenii* e a já mencionada NFCF132 de *T. koningiopsis*, isoladas de fazendas de cultivo de shiitake na Coreia do Sul contém 3 segmentos de dsRNA (~1,8, 2,0 e 2,1 kb; caracterização inicial) (YUN *et al.*, 2016). Além destes, um perfil de dsRNA trisegmentado foi descrito na linhagem HZ-1 de *C. gloeosporioides*, isolada de uma fruta cítrica em Hanzhou, na China. Cada um dos três segmentos do *Colletotrichum gloeosporioides* chrysovirus 1 (CgCV1, *Chrysoviridae*), dsRNA3 (~2,6 kb), dsRNA2 (~2,8 kb) e dsRNA1 (~3,3 kb) possui uma única ORF que codifica uma protease hipotética de 92 kDa, a CP e a RdRp, respectivamente (ZHONG *et al.*, 2016). É importante salientar que embora F50v e F59v pertençam à mesma espécie e sejam da mesma região, são procedentes de pontos de coleta distintos. Isso sugere estabilidade deste padrão na população de dsRNA (YUN *et al.*, 2016).

Ao comparar os perfis da extração de ácidos nucleicos totais e da digestão com as nucleases, é possível perceber uma diferença no número de bandas dos isolados F2v, F50v e F59v. Essa diferença pode ser atribuída ao fato de que fragmentos de tamanho próximo podem migrar juntos (JIANG & GHABRIAL, 2004). Neste estudo, não foi possível a caracterização dos ácidos nucleicos extraídos dos isolados F11v e F30v. Ambos apresentaram bandas extras na extração de ácidos nucleicos totais, no entanto, a degradação dos ácidos nucleicos impossibilitou a conclusão da análise, sendo necessária a adoção de outro método que proporcione alto rendimento para realização dos estudos posteriores.

Ainda que atributos como o tamanho e o número de segmentos do genoma viral sejam características taxonômicas importantes (LWOFF & TOURNIER, 1966), por si só não são robustos o suficiente para constituir um critério de classificação preciso do vírus. A presença de múltiplos segmentos de dsRNA pode ser resultado de diversos fatores que podem gerar equívocos na análise, como por exemplo a própria segmentação do genoma (OSAKI *et al.*, 2002), a existência dos RNAs satélites e RNAs defectivos (BERRY & BEVAN, 1972; BRUENN & KANE, 1978) e a ocorrência de coinfeção (PREISIG *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2014). Diante disso, o próximo passo a ser dado é, inevitavelmente, o sequenciamento dos genomas virais, o que viabilizará a construção de sua história evolutiva por meio de uma abordagem filogenética utilizando a própria RdRp (e/ou a CP, se presente) como marcador molecular (KOONIN *et al.*, 1989). Assim como nos microrganismos superiores, a análise filogenética é uma ferramenta muito poderosa para a classificação dos dsRNAs, mesmo que eventualmente o resultado seja um táxon ainda não nomeado.

#### **4.3. Antagonismo *in vitro* e promoção de crescimento**

A habilidade de micotrofia é uma característica marcante em inúmeras espécies que fazem parte do gênero *Trichoderma*. A interação de caráter antagonista estabelecida entre *Trichoderma* e outras espécies de fungos pode ser dividida em dois grupos principais. O primeiro, micoparasitismo, é determinado por interações do tipo biotróficas onde um fungo irá obter nutrientes do micélio do outro sem provocar rapidamente sua morte. O segundo grupo, hiperparasitismo necrotrófico, é determinado por interações necrotróficas, onde um fungo provocará a morte do outro e utilizará os nutrientes providos pela biomassa sem vida (DRUZHININA *et al.*, 2011). Os microrganismos capazes de estabelecer as interações do tipo

hiperparasitismo necrotrófico são de especial interesse para a agricultura, visto que eles podem ser empregados como agentes de controle biológico contra os principais fungos fitopatogênicos que assolam plantios de diversas culturas importantes no mundo todo (revisado por GHAZANFAR *et al.*, 2018).

Os resultados apresentados mostraram que os isolados submetidos ao teste de cultura pareada apresentaram diferentes níveis de micotrofia, o que determina efetividade variável contra diferentes fungos fitopatogênicos. Quando testados contra *C. lindemuthianum* raça 89, todos os isolados foram capazes de crescer sobre a colônia do fitopatógeno, especialmente o isolado F2v (*T. asperelloides*), que se mostrou muito agressivo. Ainda não existem trabalhos relatando o comportamento micotrófico *in vitro* de *T. arundinaceum*, *T. asperelloides* e *T. koningiopsis* sobre *C. lindemuthianum*, todavia, esta habilidade foi reportada anteriormente em linhagens pertencentes às espécies *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. virens* e *T. viride*, isoladas a partir de solo rizosférico de mudas de feijoeiro com antracnose (PADDER & SHARMA, 2011). Esta capacidade também se estende a outras espécies do gênero *Colletotrichum*, conforme evidenciado para *T. viride*, isolado do filoplano de *Vigna unguiculata* (linhagem TH-31) contra *C. truncatum* (BANKOLE & ADEBANJO, 1996) e para *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* e *T. viride* contra *C. gloeosporioides* (VALENZUELA *et al.*, 2015).

Nos ensaios contra *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, somente os isolados F30v e F42v (*T. koningiopsis*) cresceram sobre o fitopatógeno, mas pequenas áreas de colonização foram observadas para o isolado F11v (relacionado a *T. harzianum*/*T. lixii*). O potencial de micotrofia da principal espécie do clado Harzianum já é conhecido: as linhagens CEN238, CEN239 e CEN241 de *T. harzianum*, por exemplo, apresentaram colonização total sobre *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e inibiram em quase 37% seu crescimento em relação ao controle *in vitro* (CARVALHO *et al.*, 2011). A capacidade de micotrofia *in vitro* de *T. arundinaceum*, *T. asperelloides* e *T. koningiopsis* sobre *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* não foi documentada em outros estudos, no entanto, sabe-se que pode ocorrer sobre diferentes *formae specialis* dentro do complexo *F. oxysporum*, como observado para *T. asperelloides* (isolado em amostra de solo de canavial) crescendo sobre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (RAMÍREZ-CARIÑO *et al.*, 2020) e *T. koningiopsis* (isolado em amostra de solo do vale de Annapolis, Canadá) crescendo sobre *F. oxysporum* f. sp. *cepae* (BUNBURY-BLANCHETTE & WALKER, 2019).

Por fim, quando confrontados a *S. sclerotiorum*, os isolados F30v e F42v (*T. koningiopsis*) cobriram aproximadamente 50% das colônias do fitopatógeno, enquanto os

demais isolados cresceram sobre as bordas e escleródios. Esses resultados vão ao encontro das observações anteriormente descritas para as linhagens T25 e T42 de *T. asperelloides* (isoladas de amostras de solo de plantações de milho no Paraná, Brasil), 11/06 de *T. koningiopsis*, 11/11, 360/01, 362/02, 364/01 e 468/02 de *T. asperellum*, 29/11 e 476/02 de *T. tomentosum*, 494/01 e ALL-42 de *T. harzianum* (isoladas de amostras de solo de plantações de feijão e outras culturas em Goiás, Brasil), as quais foram capazes de crescer sobre colônias de *S. sclerotiorum* em cultura pareada *in vitro* (SUMIDA *et al.*, 2018; LOPES *et al.*, 2012).

Nos ensaios de produção de metabólitos não voláteis, um perfil de resposta semelhante foi observado para *C. lindemuthianum*, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *S. sclerotiorum*, com as maiores taxas de inibição de crescimento dos fitopatógenos sendo obtidas nos tratamentos com os isolados F50v e F59v (*T. arundinaceum*) seguidos por F30v e F42v (*T. koningiopsis*). Os isolados F2v (*T. asperelloides*) e F11v (relacionado a *T. harzianum*/*T. lixii*) foram pouco eficientes. Estes resultados contrastam com o observado em outros estudos envolvendo a espécie *T. harzianum*, que é capaz de sintetizar uma ampla variedade de metabólitos secundários que possuem atividade antifúngica reconhecida, como por exemplo 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one e 6-n-pentenyl-2H-pyran-2-one, avaliados *in vitro* contra *Rhizoctonia solani* e *Phytophthora cinnamomi* (CLAYDON *et al.*, 1987) ou T22azaphilone, T39butenolide, Harzianolide e Harzianopyridone, avaliados *in vitro* contra *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium ultimum* e *R. solani* (VINALE *et al.*, 2006). Além disso, foram identificados *peptaibols* produzidos pela linhagem IIM-B4 de *T. lixii*, isolada como endofítica a partir de galhos e folhas de *Bacopa monnieri* (KATOCH *et al.*, 2019). Do mesmo modo, foi demonstrada a capacidade de produção de metabólitos secundários de interesse biotecnológico por uma linhagem endofítica (QA-3) de *T. koningiopsis*, isolada dos tecidos da planta medicinal *Artemisia argyi* na China. Foram identificados 7 policetídeos diferentes (5 deles descritos pela primeira vez) com capacidades variáveis de inibição *in vitro* contra 8 fungos fitopatogênicos incluindo *C. gloeosporioides*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* e *Penicillium digitatum* (SHI *et al.*, 2017). Em contrapartida, a produção de metabólitos secundários por isolados pertencentes ao clado *Brevicompectum* também desperta interesse, visto que os tricotecenos sintetizados por estas espécies possuem propriedades tóxicas. A espécie *T. arundinaceum* é produtora de Harzianum A, um tricoteceno com elevado potencial antifúngico (DEGENKOLB *et al.*, 2008; MALMIERCA *et al.*, 2012), o que pode estar correlacionado ao alto desempenho das linhagens desta espécie isoladas neste estudo contra aqueles fitopatógenos.

É interessante notar que quando sobrepostos, os resultados dos testes de cultura pareada e produção de metabólitos são, em parte, divergentes. Para *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, por exemplo, os maiores níveis de crescimento foram registrados nas colônias submetidas ao ensaio de produção de metabólitos, comparadas com as que passaram pelo ensaio de cultura pareada, enquanto que uma resposta oposta foi registrada para *S. sclerotiorum* nos mesmos testes. Isso sugere que, apesar da produção de substâncias com atividade inibidora de crescimento por *Trichoderma*, a competição entre os fungos envolvidos é um fator importante no controle biológico (SIVAN & CHET, 1989), ainda que o teste *in vitro* não leve em consideração as múltiplas variáveis ambientais que afetariam o resultado no solo. Nas condições avaliadas, *Trichoderma* spp. cresceu mais rápido do que *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, então, a competição por espaço e recursos pode explicar porque as colônias do fitopatógeno ficaram menores na presença do antagonista. Isso fica ainda mais evidente no ensaio com *S. sclerotiorum*, cujos resultados podem ser justificados pelo fato de *S. sclerotiorum* crescer tão rápido quanto as nossas linhagens de *Trichoderma*, o que garante o desenvolvimento da colônia na medida em que a concentração de metabólitos no meio aumenta.

Nos testes de avaliação do potencial de promoção de crescimento do feijoeiro, foram mensurados a massa seca do sistema radicular e total. No primeiro parâmetro avaliado, somente o tratamento com a linhagem F42v diferiu do tratamento controle, enquanto que no segundo parâmetro, os tratamentos com as linhagens F42v e F50v foram os mais eficientes. É bem conhecida a capacidade de *Trichoderma* spp. em promover o crescimento em diversas espécies de plantas. Em comparação com as espécies isoladas no presente estudo, no clado Viride, foram descritas duas linhagens de *T. asperelloides*, T1 e T2 (isoladas a partir de amostras de solo rizosférico florestal no Rio Grande do Sul, Brasil), capazes de incrementar a altura e diâmetro do coleto de mudas de *Jacaranda micranta*, *Corymbia citriodora* e *Bauhinia forficata*, embora a massa seca total e do sistema radicular, assim como observado para F2v neste estudo, não tenha diferido do tratamento controle (AMARAL *et al.*, 2017; STEFFEN *et al.*, 2019; PECCATTI *et al.*, 2020). Outra espécie relevante do clado Viride também é capaz de promover o crescimento vegetal: a linhagem Th003 de *T. koningiopsis* aumentou as massas do sistema radicular e de partes foliares de tomateiros (*Solanum lycopersicum*) (MORENO *et al.*, 2009), o que está de acordo com os resultados obtidos para o isolado F42v. Em relação a *T. harzianum*, diversos estudos apontam capacidade de promoção de crescimento em várias espécies de plantas incluindo culturas importantes como tomate, tabaco, pepino e pimenta, melhorando consideravelmente a taxa de germinação das sementes e a massa seca das plantas (WINDHAM,

ELAD & BAKER, 1985; INBAR *et al.*, 1994). Ainda não existem trabalhos evidenciando o potencial de promoção de crescimento por linhagens de *T. arundinaceum*. De posse destas informações, diversos estudos foram conduzidos visando a identificação de linhagens competentes para promoção de crescimento em *P. vulgaris*, demonstrando este potencial nas espécies *T. asperellum*, *T. brevicompactum*, *T. longibrachiatum*, *T. virens*, e a mais promissora delas, *T. harzianum*, sobre a qual se desenvolveram quase todas as pesquisas com este objetivo (HOYOS-CARVAJAL *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2011b; PEREIRA *et al.*, 2014; MAYO *et al.*, 2015).

Os fatores que determinam a capacidade de promoção de crescimento de *Trichoderma* incluem: i) a competência rizosférica (SIVAN & HARMAN, 1991); ii) solubilização de minerais (ALTOMARE *et al.*, 1999); iii) resistência a estresses ambientais (MASTOURI, BJÖRKMAN & HARMAN, 2010) e iv) síntese de fitormônios (CONTRERAS-CORNEJO *et al.*, 2009).

Embora os resultados dos ensaios para avaliar a capacidade de micotrofia, produção de metabólitos não voláteis e promoção de crescimento estejam de acordo com outros estudos envolvendo as mesmas espécies, é impossível estabelecer uma correlação destes dados com a presença de dsRNA nestes isolados sem a obtenção de linhagens curadas ou a transfecção dos micovírus para linhagens não infectadas. Os ensaios de inibição de fitopatógenos em trabalhos anteriores são muito heterogêneos e um padrão não pode ser estabelecido: por exemplo, a linhagem NFCF319 de *T. harzianum* hospedeira do *Trichoderma harzianum* betapartitivirus 1 (ThPV1) mostrou maior capacidade de inibição de crescimento (*in vitro*) de *R. solani* em comparação com as linhagens isogênicas curadas do vírus (CHUN *et al.*, 2018b) enquanto que a linhagem 525 de um isolado da mesma espécie, contendo o *Trichoderma harzianum* mycovirus 1 (ThMV1) não exibiu diferenças estatísticas no controle biológico *in vitro* contra *F. oxysporum* f. sp. *cucumebrium* (LIU *et al.*, 2019b). Além disso, estudos para avaliação de promoção de crescimento em linhagens portadoras de dsRNA são escassos e até o momento esta mesma linhagem (*T. harzianum* 525) foi a única a ser submetida a um ensaio do tipo, em mudas de pepino (LIU *et al.*, 2019b).

## 5. CONCLUSÕES

- A filogenia molecular por análise multilocus é superior em relação a utilização de marcadores como ITS e *act* individualmente;
- Os micovírus (dsRNA) são diversos e estão distribuídos entre os clados mais comuns do gênero *Trichoderma*;
- Mesmo portando dsRNA, a linhagem F42v de *T. koningiopsis* foi capaz de promover o crescimento do feijoeiro e demonstrou capacidade de controle biológico *in vitro*;
- A espécie *T. arundinaceum*, ainda não descrita em outros solos no Brasil, possui grande potencial de produção de metabólitos não voláteis;
- As espécies *T. asperelloides*, *T. koningiopsis* e *T. arundinaceum* possuem capacidade de micotrofia contra *C. lindemuthianum*;
- Existe variação nas capacidades de antagonismo e promoção de crescimento de plantas em *Trichoderma*, de acordo com as espécies e linhagens envolvidas.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABAWI, G. S.; PASTOR-CORRALES, M. A. Root Rots of Beans in Latin America and Africa: Diagnosis, Research Methodologies and Management Strategies. **Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia**. 114 p. (CIAT publication no. 35), 1990.
- ABREU, M. J.; SOUZA, E. A. Investigation of *Sclerotinia sclerotiorum* strains variability in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 6879-6896, 2015.
- ALTOMARE, C.; NORVELL, W. A.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G. E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2926-2933, 1999.
- AMARAL, P. P.; STEFFEN, G. P. K.; MALDANER, J.; MISSIO, E. L.; SALDANHA, C. W. Promotores de crescimento na propagação de caroba. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 90, p. 149-157, 2017.
- AZEVEDO, A. C. S.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; FARIA, M. R.; FUNGARO, M. H. P. Effects of double-stranded RNA on virulence of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the silverleaf whitefly, *Bemisia tabaci* strain B (Homoptera: Aleyrodidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 61-63, 2000.
- BANKOLE, S. A.; ADEBANJO, A. Biocontrol of brown blotch of cowpea caused by *Colletotrichum truncatum* with *Trichoderma viride*. **Crop Protection**, v. 15, n. 7, p. 633-636, 1996.
- BANKS, G. T.; BUCK, K. W.; CHAIN, E. B.; DARBYSHIRE, J. E.; HIMMELWEIT, F.; RATTI, G.; SHARPE, T. J.; PLANTEROSE, D. N. Antiviral activity of double stranded RNA from a virus isolated from *Aspergillus foetidus*. **Nature**, v. 227, n. 5257, p. 505-507, 1970.
- BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 68, n. 1, p. 1-13, 2009.
- BERRY, E. A.; BEVAN, E. A. A new species of double-stranded RNA from yeast. **Nature**, v. 239, n. 5370, p. 279-280, 1972.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; DE PAULA JÚNIOR, T. J.; CORREA, E. B.; MOURA, A. B.; LUCON, C.M. M.; COSTA, J. C. B.; Bezerra, J. L. Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2012. Disponível em <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/930378/1/Doc881.pdf>. Acesso em: 23 mai 2019.
- BITOCCHI, E.; RAU, D.; BELLUCCI, E.; RODRIGUEZ, M.; MURGIA, M. L.; GIOIA, T.; SANTO, D.; NANNI, L.; ATTENE, G.; PAPA, R. Beans (*Phaseolus* ssp.) as a model for understanding crop evolution. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 722, 2017.
- BOGO, M. R.; QUEIROZ, M. V.; SILVA, D. M.; GIMÉNEZ, M. P.; AZEVEDO, J. L.; SCHRANK, A. Double-stranded RNA and isometric virus-like particles in the

entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v. 100, n. 12, p. 1468-1472, 1996.

BOLAND, G. J. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 14, n. 1, p. 10-17, 1992.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 93-108, 1994.

BRUENN, J.; KANE, W. Relatedness of the double-stranded RNAs present in yeast virus-like particles. **Journal of Virology**, v. 26, n. 3, p. 762-772, 1978.

BUCK, K. W.; CHAIN, E. B.; HIMMELWEIT, F. Comparison of interferon induction in mice by purified *Penicillium chrysogenum* virus and derived double-stranded RNA. **Journal of General Virology**, v. 12, n. 2, p. 131-139, 1971.

BUNBURY-BLANCHETTE, A. L.; WALKER, A. K. *Trichoderma* species show biocontrol potential in dual culture and greenhouse bioassays against *Fusarium* basal rot of onion. **Biological Control**, v. 130, p. 127-135, 2019.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 553, 1999.

CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M. D.; LOBO JÚNIOR, M.; GERALDINE, A. M. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 8, p. 822-828, 2011b.

CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M. D.; LOBO JÚNIOR, M.; SILVA, M. C. Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 1, p. 28, 2011.

CASSAGO, A.; PANEPUCCI, R. A.; BAIÃO, A. M. T.; HENRIQUE-SILVA, F. Cellophane based mini-prep method for DNA extraction from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **BMC Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 14, 2002.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225-226, 1939.

CHAGAS, L. F. B.; JUNIOR, A. F. C.; DE CASTRO, H. G. Phosphate solubilization capacity and indole acetic acid production by *Trichoderma* strains for biomass increase on basil and mint plants. **Brazilian Journal of Agriculture**, v. 92, n. 2, p. 176-185, 2017.

CHAVERRI, P.; BRANCO-ROCHA, F.; JAKLITSCH, W.; GAZIS, R.; DEGENKOLB, T.; SAMUELS, G. J. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. **Mycologia**, v. 107, n. 3, p. 558-590, 2015.

CHAVERRI, P.; CASTLEBURY, L. A.; OVERTON, B. E.; SAMUELS, G. J. *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. **Mycologia**, v. 95, n. 6, p. 1100-1140, 2003.

CHEN, K.; ZHUANG, W. Y. Discovery from a large-scaled survey of *Trichoderma* in soil of China. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-37, 2017.

- CHU, Y. M.; JEON, J. J.; YEA, S. J.; KIM, Y. H.; YUN, S. H.; LEE, Y. W.; KIM, K. H. Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2529-2534, 2002.
- CHU, Y. M.; LIM, W. S.; YEA, S. J.; CHO, J. D.; LEE, Y. W.; KIM, K. H. Complexity of dsRNA mycovirus isolated from *Fusarium graminearum*. **Virus Genes**, v. 28, n. 1, p. 135-143, 2004.
- CHUN, J.; YANG, H. E.; KIM, D. H. Identification and molecular characterization of a novel partitivirus from *Trichoderma atroviride* NCF394. **Viruses**, v. 10, n. 11, p. 578, 2018a.
- CHUN, J.; YANG, H. E.; KIM, D. H. Identification of a novel partitivirus of *Trichoderma harzianum* NCF319 and evidence for the related antifungal activity. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1699, 2018b.
- CHUN, S. J.; LEE, Y. H. Inheritance of dsRNAs in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 148, n. 2, p. 159-162, 1997.
- CLAYDON, N.; ALLAN, M.; HANSON, J. R.; AVENT, A. G. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 88, n. 4, p. 503-513, 1987.
- COÊLHO, M.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; SOUSA, L. L. D.; NUNES, M. P. B. A.; AZEVEDO, R. F.; GALVÁN, M. Z. Characterization of race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* by sequencing ITS regions. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, n. 4, p. 429-438, 2016.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Safra Brasileira de Grãos 2019. **CONAB**. Disponível em <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 02 mai 2020.
- CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C.; LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 149, n. 3, p. 1579-1592, 2009.
- DANIELSON, R. M.; DAVEY, C. B. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 5, n. 5, p. 485-494, 1973.
- DAY, P. R.; DODDS, J. A.; ELLISTON, J. E.; JAYNES, R. A.; ANAGNOSTAKIS, S. L. Double-stranded RNA in *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, v. 67, n. 11, p. 1393-1396, 1977.
- DE MELLO, S. C. M.; REIS, A.; DA SILVA, J. B. T. Manual de curadores de germoplasma-micro-organismos: fungos filamentosos. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2011. Disponível em <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/933489/manual-de-curadores-de-germoplasma---micro-organismos-fungos-filamentosos>. Acesso em: 02 jun 2019.
- DEBOUCK, D. G.; TORO, O.; PAREDES, O. M.; JOHNSON, W. C.; GEPTS, P. Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) in northwestern South America. **Economic Botany**, v. 47, n. 4, p. 408-423, 1993.
- DEGENKOLB, T.; DIECKMANN, R.; NIELSEN, K. F.; GRÄFENHAN, T.; THEIS, C.; ZAFARI, D.; CHAVERRI, P.; ISMAIEL, A.; BRÜCKNER, H.; VON DÖHREN, H.;

- THRANE, U.; PETRINI, O.; SAMUELS, G. J. The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. **Mycological Progress**, v. 7, n. 3, p. 177-219, 2008.
- DELGADO-SALINAS, A.; BIBLER, R.; LAVIN, M. Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): a recent diversification in an ancient landscape. **Systematic Botany**, v. 31, n. 4, p. 779-791, 2006.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: III. Hyphal interaction. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n. 3, p. 363, 1971.
- DOU, K.; GAO, J.; ZHANG, C.; YANG, H.; JIANG, X.; LI, J.; LI, Y.; WANG, W.; XIAN, H.; LI, S.; LIU, Y.; HU, J.; CHEN, J. *Trichoderma* biodiversity in major ecological systems of China. **Journal of Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 668-675, 2019.
- DRUZHININA, I. S.; KOPCHINSKIY, A. G.; KOMOŃ, M.; BISSETT, J.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C. P. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 10, p. 813, 2005.
- DRUZHININA, I. S.; KOPCHINSKIY, A. G.; KOMOŃ, M.; BISSETT, J.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C. P. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 10, p. 813-828, 2005.
- DRUZHININA, I. S.; 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. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749-759, 2011.
- DU PLESSIS, I. L.; DRUZHININA, I. S.; ATANASOVA, L.; YARDEN, O.; JACOBS, K. The diversity of *Trichoderma* species from soil in South Africa, with five new additions. **Mycologia**, v. 110, n. 3, p. 559-583, 2018.
- ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. **Phytoparasitica**, v. 9, n. 1, p. 59, 1981.
- ELLIS, J. J. Preserving fungus strains in sterile water. **Mycologia**, v. 71, n. 5, p. 1072, 1979.
- FAO STATISTICS. 2019 World Crop Production Statistics. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Acesso em: 02 mai 2020.
- FERNANDEZ, M. R. Manual para laboratório de fitopatologia. **Embrapa Trigo-Documentos (INFOTECA-E)**, 1993. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/815639/manual-para-laboratorio-de-fitopatologia>. Acesso em: 28 jan 2020.
- FERRAZ, L. C. L.; CAFÉ FILHO, A. C.; NASSER, L. C. B.; AZEVEDO, J. Effects of soil moisture, organic matter and grass mulching on the carpogenic germination of sclerotia and infection of bean by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, v. 48, n. 1, p. 77-82, 1999.
- FIGUEIRÊDO, L. C. D.; FIGUEIRÊDO, G. S. D.; GIANCOLI, Á. C.; TANAKA, F. A.; DA SILVA, L. A.; KITAJIMA, E. W.; FILHO, S. A.; AZEVEDO, J. L. Detection of isometric, dsRNA-containing viral particles in *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from cashew tree. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 2, p. 142-145, 2012.

- FINK, G. R.; STYLES, C. A. Curing of a killer factor in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 69, n. 10, p. 2846-2849, 1972.
- FRIEDL, M. A.; DRUZHININA, I. S. Taxon-specific metagenomics of *Trichoderma* reveals a narrow community of opportunistic species that regulate each other's development. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 69, 2012.
- GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v. 2, n. 2, p. 113, 1993.
- GEPTS, P.; OSBORN, T. C.; RASHKA, K.; BLISS, F. A. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. **Economic Botany**, v. 40, n. 4, p. 451-468, 1986.
- GHAZANFAR, M. U.; RAZA, M.; RAZA, W.; QAMAR, M. I. *Trichoderma* as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture: a review. **Plant Protection**, v. 2, n. 3, p. 109-135, 2018.
- GRAHAM, P. H.; RANALLI, P. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Field Crops Research**, v. 53, n. 1-3, p. 131-146, 1997.
- GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R. J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1968-1977, 2007.
- GREEN, J.; BOHANNAN, B. J. Spatial scaling of microbial biodiversity. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 21, n. 9, p. 501-507, 2006.
- HALVORSON, J. M.; LAMPPA, R. S.; MARKELL, S. G.; PASCHE, J. S. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* races infecting dry edible bean in North Dakota. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 38, n. 1, p. 64-69, 2016.
- HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.
- HERRERO, N. A novel monopartite dsRNA virus isolated from the entomopathogenic and nematophagous fungus *Purpureocillium lilacinum*. **Archives of Virology**, v. 161, n. 12, p. 3375-3384, 2016.
- HERRERO, N.; ZABALGOGEAZCOA, I. Mycoviruses infecting the endophytic and entomopathogenic fungus *Tolypocladium cylindrosporum*. **Virus Research**, v. 160, n. 1-2, p. 409-413, 2011.
- HOLLINGS, M. Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. **Nature**, v. 196, n. 4858, p. 962-965, 1962.
- HOPPER, J. E.; BOSTIAN, K. A.; ROWE, L. B.; TIPPER, D. J. Translation of the L-species dsRNA genome of the killer-associated virus-like particles of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 24, p. 9010-9017, 1977.

- HOWITT, R. L.; BEEVER, R. E.; PEARSON, M. N.; FORSTER, R. L. Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Botrytis cinerea*. **Mycological Research**, v. 99, n. 12, p. 1472-1478, 1995.
- HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**, v. 51, n. 3, p. 409-416, 2009.
- HUANG, A. S.; BALTIMORE, D. Defective viral particles and viral disease processes. **Nature**, v. 226, n. 5243, p. 325-327, 1970.
- HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754, 2001.
- INBAR, J.; ABRAMSKY, M.; COHEN, D.; CHET, I. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 100, n. 5, p. 337-346, 1994.
- INGLIS, P. W.; MELLO, S. C.; MARTINS, I.; SILVA, J. B.; MACÊDO, K.; SIFUENTES, D. N.; VALADARES-INGLIS, M. C. *Trichoderma* from Brazilian garlic and onion crop soils and description of two new species: *Trichoderma azevedoi* and *Trichoderma peberdyi*. **Plos One**, v. 15, n. 3, p. e0228485, 2020.
- JAKLITSCH, W. M.; SAMUELS, G. J.; DODD, S. L.; LU, B. S.; DRUZHININA, I. S. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. **Studies in Mycology**, v. 56, p. 135-177, 2006.
- JAKLITSCH, W. M.; VOGLMAYR, H. Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. **Studies in Mycology**, v. 80, p. 1-87, 2015.
- JIANG, D.; GHABRIAL, S. A. Molecular characterization of *Penicillium chrysogenum* virus: reconsideration of the taxonomy of the genus Chrysovirus. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 7, p. 2111-2121, 2004.
- JOM-IN, S.; AKARAPISAN, A. Characterization of double-stranded RNA in *Trichoderma* spp. isolates in Chiang Mai province. **Journal of Agricultural Technology**, v. 5, n. 2, p. 261-270, 2009.
- KANEMATSU, S.; ARAKAWA, M.; OIKAWA, Y.; ONOUE, M.; OSAKI, H.; NAKAMURA, H.; IKEDA, K.; KUGA-UETAKE, Y.; NITTA, H.; SASAKI, A.; SUZAKI, K.; YOSHIDA, K.; MATSUMOTO, N. A reovirus causes hypovirulence of *Rosellinia necatrix*. **Phytopathology**, v. 94, n. 6, p. 561-568, 2004.
- KANHAYUWA, L.; KOTTA-LOIZOU, I.; ÖZKAN, S.; GUNNING, A. P.; COUTTS, R. H. A novel mycovirus from *Aspergillus fumigatus* contains four unique dsRNAs as its genome and is infectious as dsRNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 29, p. 9100-9105, 2015.
- KAPLAN, L. Archeology and domestication in American *Phaseolus* (beans). **Economic Botany**, v. 19, n. 4, p. 358-368, 1965.
- KATOCH, M.; SINGH, D.; KAPOOR, K. K.; VISHWAKARMA, R. A. *Trichoderma lixii* (IIIM-B4), an endophyte of *Bacopa monnieri* L. producing peptaibols. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2019.
- KHALIFA, M. E.; MACDIARMID, R. M. A novel totivirus naturally occurring in two different fungal genera. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2318, 2019.

- KILIC, O.; GRIFFIN, G. J. Effect of dsRNA-containing and dsRNA-free hypovirulent isolates of *Fusarium oxysporum* on severity of *Fusarium* seedling disease of soybean in naturally infested soil. **Plant and Soil**, v. 201, n. 1, p. 125-135, 1998.
- KING, A. M.; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B. (Eds.). **Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. United Kingdom: Elsevier, 2011.
- KOONIN, E. V.; GORBALENYA, A. E.; CHUMAKOV, K. M. Tentative identification of RNA-dependent RNA polymerases of dsRNA viruses and their relationship to positive strand RNA viral polymerases. **FEBS Letters**, v. 252, n. 1-2, p. 42-46, 1989.
- KULLNIG, C.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C. P. Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. **Mycological Research**, v. 104, n. 9, p. 1117-1125, 2000.
- KULLNIG-GRADINGER, C. M.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C. P. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. **Mycological Research**, v. 106, n. 7, p. 757, 2002.
- LEACHÉ, A. D.; REEDER, T. W. Molecular systematics of the eastern fence lizard (*Sceloporus undulatus*): a comparison of parsimony, likelihood, and Bayesian approaches. **Systematic Biology**, v. 51, n. 1, p. 44, 2002.
- LEE, S. H.; YUN, S. H.; CHUN, J.; KIM, D. H. Characterization of a novel dsRNA mycovirus of *Trichoderma atroviride* NCF028. **Archives of Virology**, v. 162, n. 4, p. 1073-1077, 2017.
- LEON, V. C.; RAJA, M.; PANDIAN, R. T. P.; KUMAR, A.; SHARMA, P. Opportunistic endophytism of *Trichoderma* species in rice Pusa Basmati-1 (PB1). **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 56, n. 2, p. 121, 2018.
- LIECKFELDT, E.; CAVIGNAC, Y.; FEKETE, C.; BÖRNER, T. Endochitinase gene-based phylogenetic analysis of *Trichoderma*. **Microbiological Research**, v. 155, n. 1, p. 7-15, 2000.
- LIMÓN, M. C.; PINTOR-TORO, J. A.; BENÍTEZ, T. Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. **Phytopathology**, v. 89, n. 3, p. 254, 1999.
- LINK, T. I.; LANG, P.; SCHEFFLER, B. E.; DUKE, M. V.; GRAHAM, M. A.; COOPER, B.; TUCKER, M. L.; VAN DE MORTEL, M.; VOEGELE, R. T.; MENDGEN, K.; BAUM, T. J.; WHITHAM, S. A. The haustorial transcriptomes of *Uromyces appendiculatus* and *Phakopsora pachyrhizi* and their candidate effector families. **Molecular Plant Pathology**, v. 15, n. 4, p. 379-393, 2014.
- LIU, C.; LI, M.; REDDA, E. T.; MEI, J.; ZHANG, J.; ELENA, S. F.; WU, B.; JIANG, X. Complete nucleotide sequence of a novel mycovirus from *Trichoderma harzianum* in China. **Archives of Virology**, v. 164, n. 4, p. 1213-1216, 2019a.
- LIU, C.; LI, M.; REDDA, E. T.; MEI, J.; ZHANG, J.; WU, B.; JIANG, X. A novel double-stranded RNA mycovirus isolated from *Trichoderma harzianum*. **Virology Journal**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2019b.
- LOPES, F. A. C.; STEINDORFF, A. S.; GERALDINE, A. M.; BRANDÃO, R. S.; MONTEIRO, V. N.; JÚNIOR, M. L.; COELHO, A. S. G.; ULHOA, C. J.; SILVA, R. N. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops

in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology**, v. 116, n. 7, p. 815-824, 2012.

LWOFF, A.; TOURNIER, P. The classification of viruses. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 45-74, 1966.

MADDISON, D.; MADDISON, W. Mesquite 3.61.; 2019. **Mesquite: A Modular System for Evolutionary Analysis**. Disponível em: <http://www.mesquiteproject.org/>. Acesso em: 26 abr 2020.

MALMIERCA, M. G.; CARDOZA, R. E.; ALEXANDER, N. J.; MCCORMICK, S. P.; HERMOSA, R.; MONTE, E.; GUTIÉRREZ, S. Involvement of *Trichoderma* trichothecenes in the biocontrol activity and induction of plant defense-related genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 14, p. 4856-4868, 2012.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Registro Nacional De Cultivares – RNC. MAPA. Disponível em [http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares\\_registradas.php](http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php). Acesso em: 03 mai 2020.

MARQUES, E.; MARTINS, I.; CUNHA, M. D. O. C.; LIMA, M. A.; SILVA, J. B. T. D.; SILVA, J. P. D.; INGLIS, P. W.; MELLO, S. C. M. New isolates of *Trichoderma* antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biota Neotropica**, v. 16, n. 3, p. e20160218, 2016.

MASTOURI, F.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G. E. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. **Phytopathology**, v. 100, n. 11, p. 1213-1221, 2010.

MAYO, S.; GUTIERREZ, S.; MALMIERCA, M. G.; LORENZANA, A.; CAMPELO, M. P.; HERMOSA, R.; CASQUERO, P. A. Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* spp. in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 685, 2015.

MELZER, M. J.; BIDOCHKA, M. J. Diversity of double-stranded RNA viruses within populations of entomopathogenic fungi and potential implications for fungal growth and virulence. **Mycologia**, v. 90, n. 4, p. 586-594, 1998.

MORENO, C. A.; CASTILLO, F.; GONZÁLEZ, A.; BERNAL, D.; JAIMES, Y.; CHAPARRO, M.; GONZÁLES, C.; RODRIGUEZ, F.; RESTREPO, S.; COTES, A. M. Biological and molecular characterization of the response of tomato plants treated with *Trichoderma koningiopsis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 74, n. 2, p. 111-120, 2009.

MOSSOP, D. W.; FRANCKI, R. I. B. Survival of a satellite RNA *in vivo* and its dependence on cucumber mosaic virus for replication. **Virology**, v. 86, n. 2, p. 562-566, 1978.

MUNIAPPAN, V.; MUTHUKUMAR, T. Influence of crop species and edaphic factors on the distribution and abundance of *Trichoderma* in Alfisol soils of southern India. **Acta Botanica Croatica**, v. 73, n. 1, p. 37-50, 2014.

NOGUEIRA, G. B.; DOS SANTOS, L. V.; DE QUEIROZ, C. B.; CORRÊA, T. L. R.; MENICUCCI, R. P.; BAZZOLLI, D. M. S.; DE ARAÚJO, E. F.; DE QUEIROZ, M. V. The histidine kinase *slnC11* of *Colletotrichum lindemuthianum* as a pathogenicity factor against *Phaseolus vulgaris* L. **Microbiological Research**, v. 219, p. 110-122, 2019.

- NYLANDER, J. A. A. MrModeltest 2. Program distributed by the author. Uppsala Univ. **Evolutionary Biology Centre**, 2004.
- OKOTH, S. A.; OKOTH, P.; MUYA, E. Influence of soil chemical and physical properties on occurrence of *Trichoderma* spp. In Embu, Kenya. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 11, n. 2, p. 303-312, 2009.
- OSAKI, H.; WEI, C. Z.; ARAKAWA, M.; IWANAMI, T.; NOMURA, K.; MATSUMOTO, N.; OHTSU, Y. Nucleotide sequences of double-stranded RNA segments from a hypovirulent strain of the white root rot fungus *Rosellinia necatrix*: possibility of the first member of the Reoviridae from fungus. **Virus Genes**, v. 25, n. 1, p. 101-107, 2002.
- PADDER, B. A.; SHARMA, P. N. *In vitro* and *in vivo* antagonism of biocontrol agents against *Colletotrichum lindemuthianum* causing bean anthracnose. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 44, n. 10, p. 961-969, 2011.
- PASTOR-CORRALES, M. A.; TU, J.C. Anthracnose. In: **Bean Production Problems in Tropics**, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, 1989. p. 77-104.
- PECCATTI, A.; ROVEDDER, A. P. M.; STEFFEN, G. P. K.; MALDANER, J.; CAMARGO, B.; DALCUL, L. P.; CAPITANI, L. C.; HUMMEL, R. B.; NEEUENSCHWANDER, F. Biological inputs in promoting the growth of *Bauhinia forficata* Link. seedlings. **Ciência Florestal**, v. 30, n. 2, p. 367, 2020
- Pereira, J. L.; Queiroz, R. M. L.; Charneau, S. O.; Felix, C. R.; Ricart, C. A. O.; da Silva, F. L.; STEINDORFF, A. S.; ULHOA, C. J.; NORONHA, E. F. Analysis of *Phaseolus vulgaris* response to its association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the presence or absence of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. **Plos One**, v. 9, n. 5, p. e98234, 2014.
- PREISIG, O.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Coinfection of a fungal pathogen by two distinct double-stranded RNA viruses. **Virology**, v. 252, n. 2, p. 399-406, 1998.
- RAMALHO, M. A. P.; ABREU, Â. F. B.; CARNEIRO, J. E. S.; MELO, L. C.; JÚNIOR, T. J. P.; PEREIRA, H. S.; PELOSO, M. J. D.; FILHO, I. A. P.; MARSTINS, M.; GUÍDICE, M. P. D.; VIEIRA, R. F. BRSMG Uai: common bean cultivar with carioca grain type and upright plant architecture. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 261-264, 2016.
- RAMBAUT, A. FigTree 1.4.4.; 2018. **Molecular Evolution, Phylogenetics and Epidemiology**. Disponível em: [tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree](http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree). Acesso em: 25 abr 2020.
- RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J.; XIE, D.; BAELE, G.; SUCHARD, M. A. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic Biology**, v. 67, n. 5, p. 901, 2018.
- RAMÍREZ-CARIÑO, H. F.; GUADARRAMA-MENDOZA, P. C.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, V.; CUERVO-PARRA, J. A.; RAMÍREZ-REYES, T.; DUNLAP, C. A.; VALADEZ-BLANCO, R. Biocontrol of *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* by *Trichoderma asperelloides* and *Bacillus paralicheniformis* in tomato plants. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 1-15, 2020.
- RANA, A.; SAHGAL, M.; JOHRI, B. N. *Fusarium oxysporum*: genomics, diversity and plant–host interaction. In: **Developments in Fungal Biology and Applied Mycology**. Springer, Singapore, 2017. p. 159-199.

- RANNALA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. **Journal of Molecular Evolution**, v. 43, n. 3, p. 304, 1996.
- RASBAND, W. ImageJ 1.53a, 2015. **National Institutes of Health**. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/>. Acesso em: 06 mai 2020.
- RAWLINSON, C. J.; CARPENTER, J. M.; MUTHYALU, G. Double-stranded RNA virus in *Colletotrichum lindemuthianum*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 65, n. 2, p. 305-IN7, 1975.
- ROMO, M.; LEUCHTMANN, A.; GARCÍA, B.; ZABALGOGEAZCOA, I. A totivirus infecting the mutualistic fungal endophyte *Epichloë festucae*. **Virus Research**, v. 124, n. 1-2, p. 38-43, 2007.
- ROTT, M. E.; JELKMANN, W. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 4, p. 411, 2001.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd edn. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, NY, 1,626 pp.; 1989.
- SAMUELS, G. J.; DODD, S. L.; LU, B. S.; PETRINI, O.; SCHROERS, H. J.; DRUZHININA, I. S. The *Trichoderma koningii* aggregate species. **Studies in Mycology**, v. 56, p. 67, 2006.
- SAMUELS, G. J.; ISMAIEL, A.; BON, M. C.; DE RESPINIS, S.; PETRINI, O. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. **Mycologia**, v. 102, n. 4, p. 944-966, 2010.
- SHI, X. S.; WANG, D. J.; LI, X. M.; LI, H. L.; MENG, L. H.; LI, X.; PI, Y.; ZHOU, X. W.; WANG, B. G. Antimicrobial polyketides from *Trichoderma koningiopsis* QA-3, an endophytic fungus obtained from the medicinal plant *Artemisia argyi*. **RSC Advances**, v. 7, n. 81, p. 51335-51342, 2017.
- SIMMONDS, P.; ADAMS, M. J.; BENKO, M.; BREITBART, M.; BRISTER, J. R.; CARSTENS, E. B.; DAVISON, A. J.; DEWART, E.; GORBALENYA, A. E.; HARRACH, B.; HULL, R.; KING, A. M. Q.; KOONIN, E.V.; KRUPOVIC, M.; KUHN, J.H.; LEFKOWITZ, E. J.; NIBERT, M. L.; ORTON, R.; ROOSSINCK, M. J.; SABANADZOVIC, S.; SULLIVAN, M. B.; SUTTLE, C. A.; TESH, R. B.; VAN DER VLUGT, R. A.; VARSANI, A.; ZERBINI, FM. Consensus statement: virus taxonomy in the age of metagenomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 161-168, 2017.
- SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H. F. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. **Crop Science**, v. 50, n. 6, p. 2199-2223, 2010.
- SIVAN, A.; CHET, I. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. **Phytopathology**, v. 79, n. 2, p. 198-203, 1989.
- SIVAN, A.; HARMAN, G. E. Improved rhizosphere competence in a protoplast fusion progeny of *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, v. 137, n. 1, p. 23-29, 1991.
- SMITH, A.; BELTRÁN, C. A.; KUSUNOKI, M.; COTES, A. M.; MOTOHASHI, K.; KONDO, T.; DEGUCHI, M. Diversity of soil-dwelling *Trichoderma* in Colombia and their potential as biocontrol agents against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Journal of General Plant Pathology**, v. 79, n. 1, p. 74-85, 2013.

- SOMERS, J. M. Isolation of suppressive sensitive mutants from killer and neutral strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 74, n. 4, p. 571-579, 1973.
- SPECHT, C. A.; DIRUSSO, C. C.; NOVOTNY, C. P.; ULLRICH, R. C. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. **Analytical Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 158, 1982.
- STEFFEN, G. P. K.; MALDANER, J.; STEFFEN, R. B.; SALDANHA, C. W.; PECCATTI, A. *Trichoderma asperelloides* promove crescimento inicial em mudas de *Corymbia citriodora*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, p. 1699, 2019.
- SUMIDA, C. H.; DANIEL, J. F.; ARAUJOD, A. P. C.; PEITL, D. C.; ABREU, L. M.; DEKKER, R. F.; CANTERI, M. G. *Trichoderma asperelloides* antagonism to nine *Sclerotinia sclerotiorum* strains and biological control of white mold disease in soybean plants. **Biocontrol Science and Technology**, v. 28, n. 2, p. 142-156, 2018.
- SWOFFORD, D.L. PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods), Version 4.0b10. **Sinauer Associates**, Sunderland, MA, 2002.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725, 2013.
- TANSENGCO, M.; TEJANO, J.; CORONADO, F.; GACHO, C.; BARCELO, J. Heavy metal tolerance and removal capacity of *Trichoderma* species isolated from mine tailings in Itogon, Benguet. **Environment and Natural Resources Journal**, v. 16, n. 1, p. 39-57, 2018.
- TIPPER, D. J.; BOSTIAN, K. A. Double-stranded ribonucleic acid killer systems in yeasts. **Microbiological Reviews**, v. 48, n. 2, p. 125, 1984.
- TOLEDO-SOUZA, E. D. D.; SILVEIRA, P. M. D.; CAFÉ-FILHO, A. C.; LOBO JUNIOR, M. *Fusarium* wilt incidence and common bean yield according to the preceding crop and the soil tillage system. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 8, p. 1031-1037, 2012.
- TU, J. C. The role of white mold-infected white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds in the dissemination of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Journal of Phytopathology**, v. 121, n. 1, p. 40-50, 1988.
- VALENZUELA, N. L.; ANGEL, D. N.; ORTIZ, D. T.; ROSAS, R. A.; GARCÍA, C. F. O.; SANTOS, M. O. Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit. **Biological Control**, v. 91, p. 88-93, 2015.
- VARGAS, W. A.; MANDAWA, J. C.; KENERLEY, C. M. Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. **Plant Physiology**, v. 151, n. 2, p. 792-808, 2009.
- VILCHES, S.; CASTILLO, A. A double-stranded RNA mycovirus in *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 155, n. 1, p. 125, 1997.
- VINALE, F.; MARRA, R.; SCALA, F.; GHISALBERTI, E. L.; LORITO, M.; SIVASITHAMPARAM, K. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 143-148, 2006.
- WANG, L.; JIANG, J.; WANG, Y.; HONG, N.; ZHANG, F.; XU, W.; WANG, G. Hypovirulence of the phytopathogenic fungus *Botryosphaeria dothidea*: association with a

- coinfecting chrysovirus and a partitivirus. **Journal of Virology**, v. 88, n. 13, p. 7517-7527, 2014.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. J. W. T.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, v. 18, n. 1, p. 315, 1990.
- WINDHAM, M. T.; ELAD, Y.; BAKER, R. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 76, n. 5, p. 518-521, 1986.
- WOO, S. L.; SCALA, F.; RUOCCO, M.; LORITO, M. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp.; phytopathogenic fungi, and plants. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 181-185, 2006.
- WUCZKOWSKI, M.; DRUZHININA, I.; GHERBAWY, Y.; KLUG, B.; PRILLINGER, H.; KUBICEK, C. P. Species pattern and genetic diversity of *Trichoderma* in a mid-European, primeval floodplain-forest. **Microbiological Research**, v. 158, n. 2, p. 125-133, 2003.
- YOU, J.; ZHOU, K.; LIU, X.; WU, M.; YANG, L.; ZHANG, J.; CHEN, W.; LI, G. Defective RNA of a novel mycovirus with high transmissibility detrimental to biocontrol properties of *Trichoderma* spp. **Microorganisms**, v. 7, n. 11, p. 507, 2019.
- YUN, S. H.; LEE, S. H.; SO, K. K.; KIM, J. M.; KIM, D. H. Incidence of diverse dsRNA mycoviruses in *Trichoderma* spp. causing green mold disease of shiitake *Lentinula edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 19, 2016.
- ZACHOW, C.; BERG, C.; MÜLLER, H.; MONK, J.; BERG, G. Endemic plants harbour specific *Trichoderma* communities with an exceptional potential for biocontrol of phytopathogens. **Journal of Biotechnology**, v. 235, p. 162-170, 2016.
- ZHANG, C. L.; DRUZHININA, I. S.; KUBICEK, C. P.; XU, T. *Trichoderma* biodiversity in China: evidence for a North to South distribution of species in East Asia. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 2, p. 251-257, 2005.
- ZHANG, T.; ZENG, X.; CAI, X.; LIU, H.; ZENG, Z. Molecular characterization of a novel double-stranded RNA mycovirus of *Trichoderma asperellum* strain JLM45-3. **Archives of Virology**, v. 163, n. 12, p. 3433-3437, 2018.
- ZHONG, J.; PANG, X. D.; ZHU, H. J.; GAO, B. D.; HUANG, W. K.; ZHOU, Q. Molecular characterization of a trisegmented mycovirus from the plant pathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Viruses**, v. 8, n. 10, p. 268, 2016.
- ZHOU, T.; BOLAND, G. J. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Sclerotinia homoeocarpa*. **Phytopathology**, v. 87, n. 2, p. 147-153, 1997.

APÊNDICE A - Espécies do gênero *Trichoderma* e seus respectivos códigos de acesso às sequências depositadas na base de dados do GenBank usados neste estudo

Espécie	Linhagem	Origem	Acesso GenBank		
			ITS	ACT	TEF1- $\alpha$
<i>Trichoderma aeroaquaticum</i> (T)	NBRC 108034	Tailândia	AB646522		AB646530
<i>Trichoderma aggregatum</i> (T)	HMAS 248863	China	KY687946		KY688062
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (T)	DAOM 222156	Canadá	AF456924		AF348098
<i>Trichoderma alni</i> (T)	CBS 120633	Reino Unido	EU518651		EU498312
<i>Trichoderma alpinum</i> (T)	HMAS 248821	China	KY687906		KY688012
<i>Trichoderma amazonicum</i> (T)	IB 50 / CBS 126898	Peru	HM142358	KC561140	HM142376
<i>Trichoderma appalachiense</i> (T)	G.J.S. 97-243 / CBS 133558	Estados Unidos da América	DQ315419		DQ307503
<i>Trichoderma arundinaceum</i> (T)	G.J.S. 05-180 / CBS 119575	Irã	EU330928		EU338275
<i>Trichoderma asperelloides</i>	G.J.S. 04-116 / CBS 125399	Vietnã	GU198301	GU248410	GU248412
<i>Trichoderma asperellum</i> (T)	CBS 433.97	Estados Unidos da América	AY380912	DQ111974	AY376058
<i>Trichoderma atrobrunneum</i> (T)	G.J.S. 92-110 / CBS 548.92	França	AF443924	FJ442528	AF443942

<i>Trichoderma atroviride</i>	CBS 142.95	Eslovênia	AY380906	DQ111971	AY376051
<i>Trichoderma auranteffusum</i> (T)	CBS 119284	Áustria	FJ860728		FJ860613
<i>Trichoderma austrokingii</i> (T)	G.J.S. 99-146 / CBS 119092	Austrália	DQ323423	DQ367716	DQ307561
<i>Trichoderma bannaense</i> (T)	HMAS 248840	China	KY687923		KY688037
<i>Trichoderma brasiliensis</i>	VIC 44363 / 17F	Brasil			
<i>Trichoderma breve</i> (T)	HMAS 248844	China	KY687927		KY688045
<i>Trichoderma brevicompactum</i> (T)	MA 3296 / DAOM 231232 / CBS 109720	Estados Unidos da América	AY324173 AY324183		AY324176
<i>Trichoderma brunneoviride</i> (T)	CBS 121130	Alemanha	EU518659		EU498316
<i>Trichoderma caerulescens</i> (T)	CBS 130011	Espanha	JN715589		JN715621
<i>Trichoderma caribbaeum</i> var. <i>caribbaeum</i> (T)	G.J.S. 97-3 / CBS 119093	Guadalupe	DQ313131	DQ328607	DQ284977
<i>Trichoderma catoptron</i> (T)	G.J.S. 02-76 / CBS 114232	Sri Lanka	AY737766	FJ442584	AY737726
<i>Trichoderma ceraceum</i> (T)	G.J.S. 95-159 / CBS 114245	Estados Unidos da América	EU330953		AY937437
<i>Trichoderma cerinum</i> (T)	DAOM 230012	Nepal	AF149869		AY937443
<i>Trichoderma cinnamomeum</i>	GJS 97-237	Estados Unidos da América	AY737759	FJ442582	AY737732
<i>Trichoderma compactum</i> (T)	YMF 1.01693	China	AY941822		AY941824
<i>Trichoderma composticola</i>	CBS 439.95	Reino Unido	DQ315439		AY937413

<i>Trichoderma concentricum</i> (T)	HMAS 248833	China	KY687915		KY688027
<i>Trichoderma dacrymycellum</i>	WU 29044	Alemanha	FJ860749		FJ860633
<i>Trichoderma dingleyae</i> (T)	G.J.S. 02-50 / CBS 119056	Nova Zelândia	DQ333548	DQ367718	DQ284978
<i>Trichoderma dorotheae</i> (T)	G.J.S. 99-202 / CBS 119089	Nova Zelândia	DQ313144	DQ323454	DQ307536
<i>Trichoderma eiji</i> (T)	CBS 133190	Japão	JX238476	JX238488	JX684011
<i>Trichoderma epimyces</i> (T)	CBS 120534	Áustria	EU518663		EU498320
<i>Trichoderma erinaceum</i> (T)	DAOM 230019	Tailândia	DQ083009	DQ111969	AY750880
<i>Trichoderma evansii</i> (T)	DIS 341hi / CBS 123079	Equador	EU883568	EU883564	EU883566
<i>Trichoderma flaviconidium</i>	G.J.S. 99-49 / CBS 130688	Costa Rica	DQ023301	DQ111960	DQ020001
<i>Trichoderma gamsii</i>	G.J.S. 05-111 / CBS 120072	Itália	DQ841730		DQ841722
<i>Trichoderma guizhouense</i> (T)	HGUP0038	China	JN191311		JN215484
<i>Trichoderma hamatum</i> (T)	DAOM 167057 / CBS 102160	Canadá	Z48816	DQ111962	AY750893
<i>Trichoderma harzianum</i> (T)	CBS 226.95	Reino Unido	AY605713	FJ442567	AY605833
<i>Trichoderma hengshanicum</i> (T)	HMAS 248852	China	KY687935		KY688054
<i>Trichoderma hirsutum</i> (T)	HMAS 248834	China	KY687916		KY688029
<i>Trichoderma hispanicum</i> (T)	CBS 130540	Espanha	JN715595		JN715659
<i>Trichoderma ingratum</i> (T)	HMAS 248822	China	KY687917		KY688018
<i>Trichoderma inhamatum</i> (T)	CBS 273.78	Colômbia	FJ442680	FJ442561	AF348099

<i>Trichoderma intricatum</i> (T)	G.J.S. 97-88 / CBS 119059	Tailândia	AY380913	AY376684	AY376060
<i>Trichoderma junci</i> (T)	CBS 120926	Dinamarca	FJ860761		FJ860641
<i>Trichoderma koningii</i> (T)	G.J.S. 89-122 / CBS 989.97	Estados Unidos da América	AY380902	AY376678	AY376045
<i>Trichoderma koningiopsis</i> (T)	G.J.S. 93-20 / CBS 119075	Cuba	DQ313140	DQ381954	DQ284966
<i>Trichoderma liberatum</i> (T)	HMAS 248831	China	KY687913		KY688025
<i>Trichoderma lieckfeldtiae</i> (T)	G.J.S. 00-14 / CBS 123049	Colômbia	DQ109528	DQ111958	EU856326
<i>Trichoderma linzhiense</i> (T)	HMAS 248846	China	KY687929		KY688047
<i>Trichoderma lixii</i> (T)	G.J.S. 97-96 / CBS 110080 / ATCC MYA-2478	Tailândia	AF443920	FJ442533	AF443938
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (T)	CBS 816.68 / DAOM 167674 / ATCC 18648	Estados Unidos da América	Z31019	JX238491	AY865640
<i>Trichoderma margaretense</i> (T)	CBS 120540	Áustria	FJ860741		FJ860625
<i>Trichoderma martiale</i> (T)	G.J.S. 04-40 / CBS 123052	Brasil	DQ315454		DQ307534
<i>Trichoderma neokoningii</i> (T)	G.J.S. 04-216 / CBS 120070	Peru	DQ841734		DQ841718
<i>Trichoderma neorufoides</i> (T)	CBS 119506	Áustria	FJ860788		FJ860657
<i>Trichoderma neorufum</i> (T)	G.J.S. 96-135 / CBS 111144	Estados Unidos da América	AF487653		AF487670
<i>Trichoderma neosinense</i> (T)	G.J.S. 94-11 / CBS 134884	China	DQ315422		DQ307508

<i>Trichoderma nothescens</i> (T)	G.J.S. 99-142 / CBS 134882	Austrália	DQ315427		DQ307512
<i>Trichoderma ochroleucum</i>	CBS 119502	Reino Unido	FJ860793		FJ860659
<i>Trichoderma olivascens</i>	CBS 119322	Reino Unido	DQ677650		DQ672609
<i>Trichoderma ovalisporum</i> (T)	DIS 70a / CBS 113299 / DAOM 232077	Equador	AY380897	AY376671	AY376037
<i>Trichoderma paraviridescens</i> (T)	CBS 119321	Áustria	DQ677651		DQ672610
<i>Trichoderma parepimyces</i> (T)	CBS 122769	Áustria	FJ860800		FJ860664
<i>Trichoderma paucisporum</i> (T)	G.J.S. 01-13 / CBS 118645	Equador	DQ109526	DQ111956	DQ109540
<i>Trichoderma petersenii</i> (T)	G.J.S. 04-355 / CBS 119051	Estados Unidos da América	DQ323441	DQ333570	DQ284980
<i>Trichoderma pezizoides</i>	G.J.S. 01-257	Tailândia	DQ000632		AY937438
<i>Trichoderma pleuroti / pleurotum</i> (T)	CBS 124387	Coreia do Sul	HM142363	JN133599	HM142382
<i>Trichoderma pleurotica</i> (T)	CBS 124383	Coreia do Sul	HM142362	JN133598	HM142381
<i>Trichoderma polypori</i> (T)	HMAS 248855	China	KY687938		KY688058
<i>Trichoderma protrudens</i> (T)	DIS 119f / CBS 121320	Índia	EU330946	JN133600	EU338289
<i>Trichoderma pseudodensum</i> (T)	HMAS 248828	China	KY687910		KY688023
<i>Trichoderma pseudogelatinosum</i> (T)	CNU N309	Coreia do Sul	HM769754		HM920202
<i>Trichoderma pubescens</i> (T)	DAOM 166162 / ATCC 28036	Estados Unidos da América	EU280121	DQ111961	AY750887

<i>Trichoderma rodmanii</i> (T)	G.J.S. 91-88 / CBS 120895	Estados Unidos da América	EU330948		EU338286
<i>Trichoderma rogersonii</i> (T)	G.J.S. 04-158 / CBS 119233	Estados Unidos da América	DQ323434	DQ333567	DQ307563
<i>Trichoderma samuelsii</i> (T)	CBS 130537	Itália	JN715596		JN715651
<i>Trichoderma scalesiae</i> (T)	G.J.S. 03-74 / CBS 120069	Equador	DQ841742		DQ841726
<i>Trichoderma simmonsii</i> (T)	G.J.S. 91-138 / CBS 130431	Estados Unidos da América	AF443917	FJ442526	AF443935
<i>Trichoderma simplex</i> (T)	HMAS 248842	China	KY687925		KY688041
<i>Trichoderma solum</i> (T)	HMAS 248848	China	KY687931		KY688050
<i>Trichoderma stilbohypoxyli</i> (T)	G.J.S. 96-30 / CBS 992.97 / DAOM 231834	Porto Rico	DQ109533	DQ111967	DQ109546
<i>Trichoderma stramineum</i> (T)	G.J.S. 02-84 / CBS 114248	Sri Lanka	AY737765	FJ442583	AY737746
<i>Trichoderma strigosellum</i> (T)	CBS 102817	Colômbia	JX416529		JQ425705
<i>Trichoderma strigosum</i> (T)	CBS 348.93 / DAOM 166121	Estados Unidos da América	DQ083027	EU856277	AY937442
<i>Trichoderma subeffusum</i> (T)	CBS 120929	Áustria	FJ860852		FJ860707
<i>Trichoderma taiwanense</i> (T)	G.J.S. 95-93 / CBS 119058	China	DQ313141	DQ323455	DQ284973
<i>Trichoderma tawa</i> (T)	G.J.S. 97-174 / CBS 114233	Nova Zelândia	AY737756	FJ442570	FJ463313

<i>Trichoderma theobromicola</i> (T)	DIS 85f / CBS 119120 / Peru ATCC MYA-3640		DQ109525	DQ111955	DQ109539
<i>Trichoderma tomentosum</i> (T)	DAOM 178713A	Canadá	EU330958	JN133612	AY750882
<i>Trichoderma trixiae</i> (T)	CBS 134702	Alemanha	DQ677647		DQ672606
<i>Trichoderma turrialbense</i> (T)	CBS 112445	Costa Rica	EU330945	JN133613	EU338284
<i>Trichoderma valdunense</i> (T)	CBS 120923	Áustria	FJ860863		FJ860717
<i>Trichoderma velutinum</i> (T)	DAOM 230013	Nepal	AF149873	JN133614	AY937415
<i>Trichoderma vinosum</i> (T)	G.J.S. 99-158 / CBS 119087	Nova Zelândia	AY380904	AY376680	AY376047
<i>Trichoderma viridarium</i>	G.J.S. 89-142 / CBS 120065	Estados Unidos	DQ109532	DQ111965	AY376049
<i>Trichoderma viride</i> (T)	G.J.S. 04-372 / CBS 119325	República Tcheca	DQ677655		DQ672615
<i>Trichoderma viridescens</i> / <i>E. viridescens</i> (T)	CBS 433.34	Reino Unido	AF456922		AF456905
<i>Trichoderma yunnanense</i> (T)	YMF 1.01694	China	AY941823		AY941825
<i>Trichoderma zayuense</i> (T)	HMAS 248835	China	KY687918		KY688031

Observação:

(T): indica uma cultura tipo;

ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA;

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre Culture Collection, Utrecht, the Netherlands;

DAOM: Agriculture and Agri-Food Canada National Mycological Culture Collection, Ottawa, Ontario, Canada;

DIS: CABI-Bioscience Culture Collection, Ascot, United Kingdom;

G.J.S: Gary J. Samuels collection, Culture Collection of the United States Department of Agriculture, Systematic Botany and Mycology Lab, Beltsville, Maryland, USA;

HMAS: Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China;

IB: indica o local da coleta, Tahuamanu Province, Iberia, Madre de Dios, Peru;

MA: Austrian Center of Biological Resources and Applied Mycology, Vienna, Austria;

NBRC: Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation, Kisarazu, Chiba, Japan;

VIC: Herbário do Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil;

YMF: Key Laboratory of Industrial Microbiology and Fermentation Technology of Yunnan, Kunming, Yunnan, China.