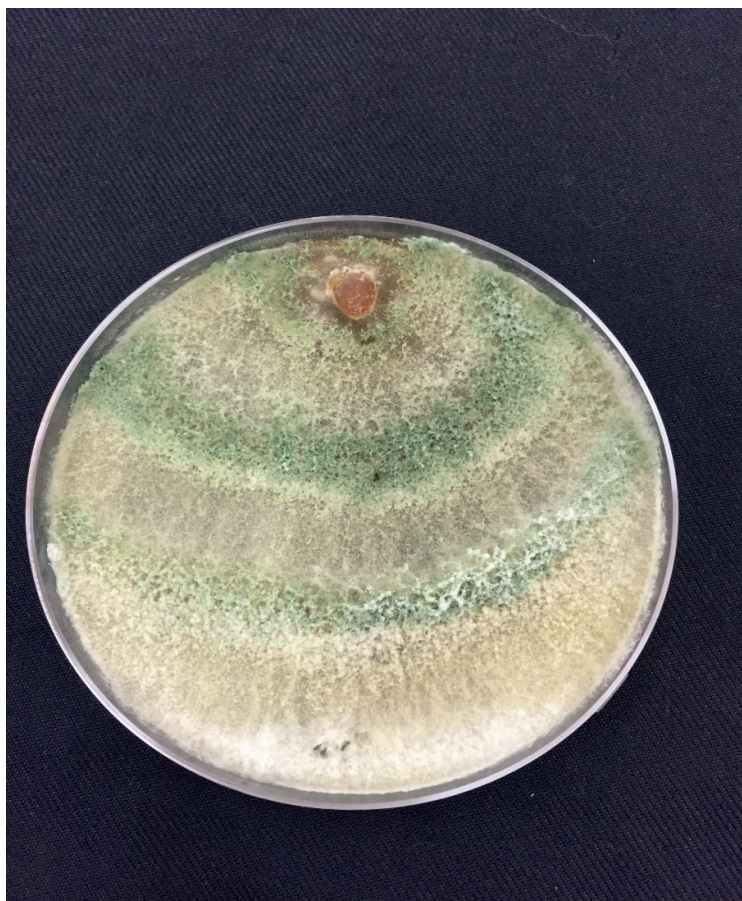


Isolamento e identificação de linhagens de *Trichoderma* em amostras de solos de cultivos de alho e cebola

Foto: Maria Cleria Valadares-Ingliš



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 330

Isolamento e identificação de linhagens de *Trichoderma* em amostras de solos de cultivos de alho e cebola

Maria Cleria Valadares-Ingliš
Peter Ward Ingliš
João Batista Tavares da Silva
Irene Martins
Sueli Correa Marques de Mello

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2017

Isolamento e identificação de linhagens de *Trichoderma* em amostras de solos de cultivos de alho e cebola

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Endereço: Parque Estação Biológica – PqEB – Av. W5 Norte
Caixa Postal 02372 – Brasília, DF – Brasil – CEP: 70770-917
Fone: (61) 3448-4700 / Fax: (61) 3340-3624
Home page: <http://www.cenargen.embrapa.br/>
E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: Marília Lobo Burle

Secretária Executiva: Ana Flávia do N.Dias

Membros:

Antonietta Nassif Salomão
Diva Maria Alencar Dusi
Francisco Guilherme V. Schmith
João Batista Teixeira
João Batista Tavares da Silva
Maria Cléria Valadares Inglis
Tânia da Silveira Agostini Costa

Suplente

Bianca Damiani Marques Silva

Revisão de texto: Hugo Xavier Fagundes

Normalização bibliográfica: Ana Flávia do N.Dias

Editoração eletrônica e tratamento das imagens: Hugo Xavier Fagundes

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Isolamento e identificação de linhagens de *Trichoderma* em amostras de solos de cultivos de alho e cebola. / Maria Cléria Valadares-Inglis [et al.] ... – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2017.

25 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 330).

1. *Sclerotium cepivorum*. 2. Podridão-branca. 3. Controle biológico. I. Valadares-Inglis, Maria Cléria. II. Inglis, Peter Ward. III. Silva, João Batista Tavares da. IV. Martins, Irene. V. Mello, Sueli Correa Marques de. V. Série.

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e Métodos	17
Resultados e Discussão	16
Conclusões	23
Agradecimentos	23
Referências	24

Isolamento e identificação de linhagens de *Trichoderma* em amostras de solos de cultivos de alho e cebola

Maria Cleria Valadares-Inglis¹

Peter Ward Inglis²

João Batista Tavares da Silva³

Irene Martins⁴

Sueli Correa Marques de Mello⁵

Resumo

As culturas de alho e cebola são amplamente afetadas pela ocorrência do fungo *Sclerotium cepivorum*. A podridão-branca causada pelo *S. cepivorum* é uma das doenças mais destrutivas das aliáceas, ocorrendo em todo o mundo, principalmente nas regiões de climas mais frios. O controle da doença é extremamente difícil, sendo impossível a erradicação nas áreas de ocorrência. Uma das melhores alternativas de manejo neste caso é o uso do controle biológico, principalmente com o fungo *Trichoderma*, tanto na forma isolada quanto em conjunto com fungicidas químicos. A busca por linhagens de *Trichoderma*, isoladas de solos das regiões de cultivo onde ocorre a doença, pode resultar na obtenção de antagonistas mais efetivos para o controle do patógeno específico. Neste sentido, amostras de solo coletadas nas áreas de

cultivo de alho e cebola, nos estados de Santa Catarina, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo, foram utilizadas para isolamento de linhagens de *Trichoderma*, visando à seleção de agentes candidatos para o controle da podridão branca. A identificação molecular e a análise filogenética, de 46 linhagens, foram realizadas usando sequências das regiões ITS e TEF, conhecidas como códigos de barras de DNA fúngicos. Seis espécies de *Trichoderma* foram identificadas: *T. asperellum*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. longibrachiatum* e *T. tomentosum*. A variabilidade genética foi analisada por AFLP, utilizando 06 primers seletivos. Observou-se variabilidade entre as linhagens da mesma espécie procedentes de diferentes regiões e, também, de uma mesma região de cultivo. Todas as linhagens foram incorporadas à Coleção de Agentes de Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e estão sendo avaliadas quanto ao potencial de controlar a podridão-branca.

Palavra-chave: *Sclerotium cepivorum*, podridão-branca, controle biológico, fungo.

¹ Bióloga, doutora, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

² Biólogo, doutor, consultor da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

³ Biólogo, doutor, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

⁴ Bióloga, mestre, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

⁵ Agrônoma, doutora, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

Isolation and identification of *Trichoderma* strains in samples of garlic and onion crop soils

Abstract

Garlic and onion crops can be severely affected by the fungus *Sclerotium cepivorum*. White rot caused by *S. cepivorum* is one of the most destructive diseases of alliaceous plants, occurring all over the world. The control of this disease is extremely difficult and its eradication in areas of occurrence is impossible. One of the best alternatives for the control of this pathogen is biological control, particularly with species of the fungus *Trichoderma*, both solely and in conjunction with chemical fungicides. The isolation and use of *Trichoderma* strains from cultivated soils of the regions where the disease occurs can result in isolation of more effective strains for specific pathogen control. In this way, soil samples from areas planted with garlic and onion were used to isolate *Trichoderma* strains, important for selection as white rot control agents. Molecular identification and phylogenetic analysis of 46 isolates were performed using sequences from the ITS and TEF regions, accepted as fungal DNA barcodes. Six species of *Trichoderma* were identified: *T. asperellum*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. longibrachiatum* e *T. tomentosum*. The genetic variability of the strains was analysed by AFLP, using six selective primer combinations.

Variability was observed between strains of the same species isolated from different regions as well as from the same region. All identified strains were deposited in the Collection of Biological Control Agents of Phytopathogens and Weeds, Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, and are being evaluated for their potential for white rot control.

Key words: *Sclerotium cepivorum*, white rot, biological control, fungus.

Introdução

Uma das mais importantes doenças que ocorre em espécies de *Allium*, conhecida como podridão branca, é causada pelo fungo *Sclerotium cepivorum*, cujo ataque resulta em perdas econômicas em todo o mundo. No Brasil, os estados do Paraná, Minas Gerais, São Paulo e Goiás são responsáveis por aproximadamente 64% das áreas de produção de espécies de *Allium* (OLIVEIRA et al., 2014). Apesar do aumento da produção de *Allium* no Brasil verificado ao longo dos anos, esta produção é insuficiente para atender à demanda interna, principalmente devido à baixa produtividade (RESENDE et al., 2013). A diversidade das espécies e cultivares disponíveis, capazes de favorecer o aumento da área de cultivo de alho e cebola ainda não permitem o aumento da produção, principalmente devido à ocorrência do mofo branco e à ausência de cultivares resistentes a esta doença. A falta de métodos convencionais eficientes para o controle do mofo branco tem direcionado os trabalhos de busca por métodos de controle biológico. De acordo com Clarkson et al. (2002) é necessário o desenvolvimento de programas de seleção de linhagens de agentes de controle biológico com maior atividade contra o patógeno-alvo e adaptadas às condições ambientais específicas das regiões onde serão utilizadas.

O fungo *Trichoderma* tem sido utilizado no controle biológico de várias doenças de plantas, devido a sua plasticidade ecológica e rizocompetência, potencial de produção de um arsenal de metabólitos antimicrobianos, como as enzimas que degradam paredes celulares dos patógenos e outros compostos com propriedades antibióticas, facilidade de cultivo e eficiência contra diversos patógenos, como por exemplo, *Botrytis*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Verticillium* etc (HARMAN et al., 2004; VERMA et al., 2007; QUIROZ-SARMIENTO et al., 2008; DRUZHININA et al., 2011). Espécies de *Trichoderma* são habitantes naturais do solo, podendo também ser encontrados colonizando raízes de plantas externa e internamente, com as quais estabelecem relações simbióticas e endofíticas. Além de apresentarem propriedades antifúngicas de forma direta, esses fungos

promovem o crescimento de plantas e são considerados indutores de resistência contra agentes fitopatogênicos (CASTILO et al., 2011; BAE et al., 2016; GARNICA-VERGARA, et al., 2016). A diversidade de populações de *Trichoderma* varia de acordo com a região, tipos de solo e seu uso, (AL-SADI et al., 2015).

A combinação de agentes de biocontrole para obtenção de efeitos sinérgicos ou aditivos tem sido avaliada em campo.

Testes realizados para o controle da podridão branca revelaram que a integração de quatro linhagens de *Trichoderma* (*T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. oblongisporum* e *T. viride*), em associação com fungicidas químicos pode ser uma estratégia efetiva na supressão de *S. cepivorum* (DILBO et al., 2015). Adicionalmente, vêm sendo conduzidos estudos no sentido de selecionar linhagens de *Trichoderma* capazes de colonizar os esclerócios, estruturas de resistência do patógeno. Bontempo (2016) avaliou 44 isolados de *Trichoderma*, dos quais três isolados reduziram a germinação de esclerócios em mais de 80% e colonizaram mais de 70% dessas estruturas de resistência in vitro.

A identificação de espécies de *Trichoderma* com o uso de oligonucleotídeos espécie-específicos de uma biblioteca de código de barras (barcode) vem sendo utilizada, facilitando a identificação mais precisa de isolados ao nível molecular. Análise de 30 espécies de *Trichoderma* isoladas de regiões tropicais do continente americano mostrou grande diversidade deste agente de biocontrole (HOYOS-CARVAJAL & BISSET, 2011). Estudos de espécies de *Trichoderma* são baseados na análise de múltiplos genes, incluindo 28S rDNA, 18S rDNA, pequeno rDNA mitocondrial, endoquitinase 42 (ech42) e *tef1* (translation elongation fator) (SAMUELS et al., 2002).

Entretanto, variações intraespecíficas em *Trichoderma* são frequentemente observadas, a exemplo de *T. harzianum*, requerendo o uso de outras ferramentas moleculares para separação e identificação de linhagens. A técnica de AFLP (amplified fragment length

polymorphisms), que constitui um método de genotipagem, baseia-se na amplificação por PCR de fragmentos anônimos do DNA genômico digerido por enzimas de restrição. Baseada na combinação de seis pares de primers para a amplificação de DNA genômico, esta técnica vem sendo utilizada para identificar diferentes espécies e linhagens de *Trichoderma* proximamente relacionadas (BUHARIWALLA et al., 2005).

Devido ao grande potencial de isolados de *Trichoderma* no controle de *S. cepivorum* e à plasticidade de isolados de regiões geográficas específicas, o presente trabalho teve por objetivo isolar e identificar linhagens de *Trichoderma* de solo de regiões de cultivo de alho e cebola, no Brasil.

Material e Métodos

Autorização de coleta de material

As amostras utilizadas foram coletadas em áreas de produção de alho e cebola (propriedades privadas, IBAMA processo 02001.006479/2010-93, autorização no 02/2008) e depositadas na Coleção de Agentes de Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Todo o acervo da Coleção está cadastrado no Sistema de Informação da Embrapa (Alelomicro), com os dados de origem.

Isolamento de linhagens

Amostras de solo, procedentes das regiões de cultivo de alho e cebola, nos estados de Santa Catarina, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo foram utilizadas para isolamento de *Trichoderma*. A partir de cada amostra, 10g de solo foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de água destilada e esterilizada. Após agitação a 180 rpm por 40 min, diluições apropriadas foram inoculadas em placas contendo meio semi-seletivo de Martin (18 g de ágar, 10 g de dextrose + 1,0 g K₂HPO₄ + 0,5 g de MgSO₄.7H₂O + 0,5 g de peptona + 0,03 g de rosa de bengala + 0,25 g de cloranfenicol + 1000 mL de água destilada) e incubadas a 28°C por sete dias. As colônias com morfologia típica de *Trichoderma* foram transferidas para

meio BDA (batata 200g; dextrose 20g; açúcar 19 g; 0,25 g cloranfenicol; 1000 mL de água destilada). Linhagens puras foram cultivadas em meio BDA para uso em análise molecular. As linhagens utilizadas para identificação são as constantes da Tabela 1.

Tabela 1: Linhagens de *Trichoderma* isoladas de solo de áreas de cultivo de alho e cebola

Linhagem	Código coleção Embrapa	Origem Geográfica	Solo da cultura
<i>T. koningiopsis</i>	CEN1386	Curitiba/SC	Alho
<i>T. tomentosum</i>	CEN1387	Curitiba/SC	Alho
<i>T. tomentosum</i>	CEN1388	Curitiba/SC	Alho
<i>T. tomentosum</i>	CEN1389	Curitiba/SC	Alho
<i>T. tomentosum</i>	CEN1390	Curitiba/SC	Alho
<i>T. tomentosum</i>	CEN1391	Rio Paranaíba/MG	Alho
<i>T. tomentosum</i>	CEN1392	Rio Paranaíba/MG	Alho
<i>T. tomentosum</i>	CEN1393	Rio Paranaíba/MG	Alho
<i>T. hamatum</i>	CEN1394	Rio Paranaíba/MG	Alho
<i>T. hamatum</i>	CEN1395	Rio Paranaíba/MG	Alho
<i>T. asperellum</i>	CEN1396	Rio Paranaíba/MG	Alho
<i>T. asperellum</i>	CEN1397	Rio Paranaíba/MG	Alho
<i>T. tomentosum</i>	CEN1398	Bueno Brandão/MG	Alho
<i>T. longibrachiatum</i>	CEN1399	São Marcos/RS	Alho
<i>T. longibrachiatum</i>	CEN1400	São Marcos/RS	Alho
<i>T. longibrachiatum</i>	CEN1401	São Marcos/RS	Alho
<i>T. longibrachiatum</i>	CEN1402	São Marcos/RS	Alho
<i>T. harzianum</i>	CEN1403	São Marcos/RS	Alho
<i>T. longibrachiatum</i>	CEN1404	São Marcos/RS	Alho
<i>T. koningiopsis</i>	CEN1405	São Marcos/RS	Alho
<i>T. koningiopsis</i>	CEN1406	São Marcos/RS	Alho
<i>T. koningiopsis</i>	CEN1407	São Marcos/RS	Alho
<i>T. asperellum</i>	CEN1408	Monte Alto/SP	Cebola
<i>T. asperellum</i>	CEN1409	Monte Alto/SP	Cebola
<i>T. harzianum</i>	CEN1410	Monte Alto/SP	Cebola
<i>T. asperellum</i>	CEN1411	Monte Alto/SP	Cebola
<i>T. harzianum</i>	CEN1412	Monte Alto/SP	Cebola
<i>T. asperellum</i>	CEN1413	Monte Alto/SP	Cebola
<i>T. harzianum</i>	CEN1414	Monte Alto/SP	Cebola
<i>T. harzianum</i>	CEN1415	São José do Rio Pardo/SP	Cebola
<i>T. harzianum</i>	CEN1416	São José do Rio Pardo/SP	Cebola
<i>T. harzianum</i>	CEN1417	São José do Rio Pardo/SP	Cebola
<i>T. asperellum</i>	CEN1418	São José do Rio Pardo/SP	Cebola
<i>T. asperellum</i>	CEN1419	São José do Rio	Cebola

<i>T. koningiopsis</i>	CEN1420	Pardo/SP São José do Rio Pardo/SP	Cebola
<i>T. koningiopsis</i>	CEN1421	São José do Rio Pardo/SP	Cebola
<i>T. harzianum</i>	CEN1422	Rio Paranaíba/MG	Cebola
<i>T. harzianum</i>	CEN1423	Rio Paranaíba/MG	Cebola

Cultivo e isolamento de DNA

Colônias das linhagens de *Trichoderma* foram cultivadas em meio BDA por cinco dias. O micélio, coletado por raspagem, foi liofilizado e amostras do material foram conservadas a -80°C, para uso posterior. A extração de DNA foi feita de acordo com Inglis et al. (2016). As regiões ITS e TEF 1 foram amplificadas e sequenciadas segundo Rehner et al. (2011). As sequências obtidas foram editadas e os contigs montados usando o programa Chromas Pro (v. 1.5; Technelysium Pty Ltd). As sequências foram alinhadas junto com outras sequências padrões obtidas do banco de dados GenBank, através do programa MAFFT (KATO et al. 2017). A análise filogenética foi feita usando as técnicas de inferência Bayesiana e máxima verossimilhança (ML) usando os programas MrBayes (v. 2.2.6) e RAxML (v. raxmlGUI 1.5b1), respectivamente.

AFLP - amplification fragment length polymorfism (VOS et al., 1995) foi realizado com o uso de um conjunto de 06 primers seletivos (Tabela 2), tendo sido combinados os primers 11x5; 11x6; 14x2; 14x3; 14x5; 14x6, para amplificação de fragmentos do DNA genômico digerido com as enzimas EcoRI e MseI e ligação de adaptadores. Os produtos de PCR foram detectados usando eletroforese capilar em uma ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), devido ao uso de primers seletivos de EcoRI marcados com uma fluorocromo (11 ou 14; Tabela 2). Grandes quantidades de fragmentos foram gerados e os dados processados pelo Peakscanner 2 e analisados em RawGeno, com o mínimo de definição de 500 rfu e a matriz binária analisada utilizando MrBayes.

Foi utilizado o protocolo de reação de um passo com digestão e ligação de adaptador, sendo as reações realizadas em volumes de 20 µl. Uma

única reação compreendia o tampão de ligase 1X (Promega), NaCl 50 mM, 0,05 μg / μl de albumina de soro bovino, uma unidade de T4 DNA ligase (Promega), 5 pmol do adaptador EcoRI, 50 pmol do adaptador MseI, 5 unidades EcoRI (EcoRI-HF High fidelidade, NEB), 5 unidades de MseI e 50 ng de DNA genômico. As reações foram mantidas durante duas horas a 37°C numa máquina de PCR, depois mantidas a 17°C durante uma hora e depois a 4°C durante pelo menos uma hora, mas não mais de três horas. As amostras foram então diluídas cinco vezes pela adição de 80 μl de H₂O e armazenadas a -80°C.

PCR pré-seletivo

O PCR pré-seletivo usou os primers EcoRI + A (5'-GACTGCGTACCAATTCA) e MseI + C (5'-GATGAGTCCTGAGTAAC). A reação de PCR foi conduzida utilizando 20 μl em tampão de PCR 1X com 2 mM de Mg²⁺ + contendo 1 M de betaína, 0,25 mM de dNTP, 0,5 μM de cada primer, 1 U Taq polimerase e 2 μl do DNA diluído, contendo o adaptador ligado. As reações de PCR compreendiam 72°C inicial por 2 min para permitir o preenchimento das extremidades do adaptador, seguidos de 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 1 min e 72°C por 2 min. A taxa de rampa foi limitada a 1°C por segundo. As reações foram mantidas a 72°C por 2 min e 60°C por 30 min. Cinco μl de produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5%, produzindo um rastro fraco para as reações bem sucedidas. O DNA pré-selecionado foi então diluído cinco vezes pela adição de 80 μl de H₂O e armazenado a -20°C.

PCR seletivo

O PCR seletivo reduz ainda mais a complexidade genômica das reações de PCR pré-selecionadas, para produzir perfis de AFLP resolvíveis, utilizando os primers de PCR compreendendo as sequências de adaptador core EcoRI e MSPseI mais duas ou três bases seletivas, respectivamente. Os iniciadores seletivos EcoRI foram sintetizados com marcas de fluorocromo para detecção automática de fluorescência dos perfis de AFLP. Estes primers seletivos MseSPI não marcados, estão

listados na Tabela 2.

Uma única reação de PCR seletiva de 10 μ l em tampão de PCR 1X com 2 mM de Mg²⁺ continha 0,15 μ M do primer iniciador de MH-XXX e do primer EcoRI-XXX marcado com fluorocromo, 0,2mM de dNTP, 0,5U de Taq e 2 μ l de DNA pré-selecionado diluído. O ciclo de PCR compreendeu 94°C inicial por 2 minutos, seguido de 10 ciclos de 94°C por 30 segundos, 66°C por 30 segundos e 72°C por 1 min. A temperatura de anelamento foi reduzida em 1°C por ciclo (touchdown). Em seguida, seguiram-se 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos por e 72°C por 1 min. As reações foram então mantidas a 72°C durante 3 min e 60°C durante 30 min.

Os perfis de MSAPFLP fluorescentes foram detectados em ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As amostras foram preparadas misturando-se 1 μ l de produto de PCR com 9,5 μ l de formamida HiDi (Applied Biosystems) e 0,5 μ l de uma escada de peso molecular, marcada com o fluorocromo ROX (BRONDANI & GRATTAPAGLIA, 2001). A seguir foram desnaturadas a 95°C durante 5 min e refrigeradas em gelo, antes da injeção no ABI 3730. Os dados brutos de AFLP foram inicialmente inspecionados usando o programa Genographer (v. 2.1.4; Travis W. Banks e James J. Benham; <http://sourceforge.net/projects/genographer>) que exhibe uma imagem pseudogel permitindo a detecção de amostras falhadas, que podem ser repetidas. Este programa foi utilizado para uma avaliação inicial das combinações dos conjuntos de primers EcoRI + 2 e MspI + 3, realizada com duas amostras de teste de DNA pré-selecionado para encontrar combinações de iniciadores produzindo múltiplas "bandas" AFLP fortes e bem separadas. Dos primers EcoRI + 2 selecionados para *Trichoderma*, apenas os iniciadores + AC e + AA produziram número adequado de produtos AFLP para análise. Em contraste, os primers + TG, + TC, + TT, + AT, + TA e + AG produziram relativamente poucos produtos AFLP. Seis combinações de primers foram selecionadas para análise.

Análise dos Dados

Os arquivos de dados brutos foram importados para o programa analisador de eletroferograma PeakScanner (v. 2; Applied Biosystems), que foi usado para detectar picos fluorescentes ao longo dos perfis AFLP e calcular seu tamanho em comparação com a escada padrão ROX, com a linha de base de fluorescência definida como 50 rfu. A tabela de dados de área de pico foi então importada para o programa de biblioteca R CRAN, RawGeno (ARRIGO et al., 2012), sendo o pico rigoroso, usando um limite mínimo de 500 rfu, utilizado para selecionar os principais produtos de PCR. Os picos de baixa qualidade ou parcialmente sobrepostos foram filtrados, reduzindo assim o risco de tamanho-homoplasia nos dados. Os perfis de AFLP filtrados de cada combinação de primers foram convertidos em matrizes binárias que representam presença ou ausência de pico e combinadas, produzindo um total de 364 caracteres AFLP na população de amostras. Os dados foram então analisados em MrBayes (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003; v. 3.2.6) usando o modelo de Sítios de Restrição (binário) do caráter evolucionário. Três cadeias de MCMC aquecidas e uma de frio foram corridas em paralelo por cinco milhões de gerações, com amostragem de árvores a cada 1000 gerações, o que foi suficiente para permitir que o desvio padrão das frequências de divisão caísse para 0,004339. Os primeiros 25% das árvores foram descartados como “burn-in” antes do cálculo do filograma de consenso.

Tabela 2: Primers e adaptadores utilizados em AFLP

Número do primer	Nome do primer	Sequência do primer
Adaptador	EcoRI-Adapter1	5'-CTCGTAGACTGCGTACC
Adaptador	EcoRI-Adapter2	5'-AATTGGTACGCAGTCTAC
Adaptador	MseI_Adap1	5'-GACGATGAGTCCTGAG
Adaptador	MseI_Adap2	5'-TACTCAGGACTCAT
Primer Preseletiva	EcoRI+A	5'-GACTGCGTACCAATTCA
Primer Preseletiva	MseI+C	5'- GATGAGTCCTGAGTAAC
11	EcoRI+AC FAM*	5'FAM+GACTGCGTACCAATTCAC
14	EcoRI+AA VIC*	5'VIC+GACTGCGTACCAATTCAA
2	MseI+CTT	5'-GATGAGTCCTGAGTAACCT
3	MseI+CAT	5'- GATGAGTCCTGAGTAACAT
5	MseI+CAG	5'- GATGAGTCCTGAGTAACAG
6	MseI+CAA	5'- GATGAGTCCTGAGTAACAA

Resultados e Discussão: Isolamento de linhagens de *Trichoderma*

Foram obtidas 46 linhagens de *Trichoderma*, sendo 22 isoladas de cultivo de alho e 24 de cultivo de cebola. Em termos quantitativos por área foram isolados 05 linhagens de amostras de Curitiba/SC, 11 linhagens de Rio Paranaíba/MG; 01 linhagem de Bueno Brandão/MG; 09 linhagens de São Marcos/RS; 07 linhagens de Monte Alto/SP; 09 de São José do Rio Pardo/SP; 03 linhagens de Itobi/SP e 01 linhagem de Sacramento/MG.

Identificação molecular de linhagens

A análise das sequências ITS, utilizando o programa de barcode com Blast comparativo das sequências depositadas no TrichOKey (DRUZHININA et al., 2005) não apresentou uma boa resolução com uma grande parte das linhagens identificadas como *Trichoderma* sp., ou mesmo identificação inespecífica. O uso das sequências TEF isoladamente para a identificação também não apresentou resolução adequada. No entanto, análise conjunta das sequências de ITS e TEF permitiram a identificação apropriada. De acordo com Chaverri et al. (2016), as limitações do uso de regiões ITS para delimitar espécies de *Trichoderma*, mais especificamente no complexo de *T. harzianum*, requer o uso de marcador TEF1, para a correta identificação do complexo.

Assim, a análise molecular utilizando ambos os marcadores mostrou a ocorrência de seis espécies, *T. asperellum*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. longibrachiatum* e *T. tomentosum* conforme pode ser observado na árvore bayesiana utilizando ambos os marcadores ITS e TEF (Figura 1). Essas análises mostraram que seis linhagens pertencem à espécie *T. koningiopsis*, dez a *T. tomentosum*, duas a *T. hamatum*, onze a *T. harzianum*, cinco a *T. longibrachiatum* e doze a *T. asperellum*. Ao se examinar a distribuição geográfica das espécies obtidas das amostras de solo coletadas nas áreas cultivadas com alho e cebola, verificou-se a ocorrência de *T. hamatum* no estado de Minas Gerais e de *T. asperellum* em Minas Gerais e São Paulo. Entretanto, nenhuma destas duas espécies foi recuperada das amostras

procedentes dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Figura 2). Por outro lado, a espécie *T. longibrachiatum* foi isolada somente de amostras coletadas no Rio Grande do Sul, estado onde não se observou a ocorrência de *T. tomentosum*. Diversidade de espécies pode ocorrer em uma única região, a exemplo de Rio Paranaíba/MG, onde três diferentes espécies foram obtidas nas amostras de solo de cultivo de cebola; em São Marcos/RS, também, foi constatada a ocorrência de três espécies, nas amostras de área cultivada com alho.

A diversidade de espécies de *Trichoderma* varia em diferentes regiões conforme relatado por vários autores. Por exemplo, estudos moleculares de isolados coletados de solo de culturas de grão de bico, ervilha e lentilha, na Índia, mostraram a ocorrência de trinta isolados de *T. viride*, que apresentam grande diversidade, com a formação de oito grupos distintos dentro da espécie (SHAHID et al., 2014). López-Quintero et al. (2013) estudando a diversidade de espécies de *Trichoderma* na região da Amazônia Colombiana, mostraram que três espécies compreendem 68% dos isolados estudados, tendo o complexo *T. harzianum* representado 38%, seguido da espécie *T. spirale* com 17% e *T. koningiopsis* com 13%, enquanto que somente quatro prováveis novas espécies foram sugeridas. Por fim, Gherbawy et al. (2014) isolaram *Trichoderma* de amostras de solo coletadas em diversas áreas de cultivo na Arábia Saudita, obtendo setenta e oito isolados identificados como *T. harzianum* e somente dois identificados como *T. longibrachiatum*, porém, verificando alto grau de variabilidade no complexo de espécies de *T. harzianum*.

AFLP para identificação de linhagens de *Trichoderma*

Os resultados apresentados na árvore Bayesiana mostram que amostras de uma mesma região apresentam diferentes espécies e variações intraespecíficas. Al-Sadi et al. (2015) analisaram amostras de isolados de *Trichoderma* utilizando AFLP, mostrando baixa ou moderada diversidade genética entre populações. No presente trabalho, a análise de AFLP das linhagens teve o intuito de identificar a diversidade de linhagens de uma mesma espécie. Observou-se

que linhagens de *T. asperellum*, coletadas de uma mesma localidade podem apresentar ou não variações genéticas. Como por exemplo, as linhagens CEN1396 e CEN1397, isoladas do Rio Paranaíba/MG, apresentam alto grau de homologia, enquanto que as linhagens CEN1413 e CEN1411, isoladas de Monte Alto/MG, apresentam grande diversidade (Figura 3). As linhagens de *T. koningiopsis* isoladas de uma mesma localidade apresentam homologia, tanto as isoladas de São Marcos/SP (CEN 1405 e CEN1406), quanto as de São José do Rio Pardo/SP (CEN1420 e CEN1421). Linhagens de *T. longibrachiatum* somente foram isoladas em São Marcos/RS e os resultados de AFLP mostraram diversidade entre as linhagens, com exceção das CEN1400 e CEN1401 que não diferiram entre si. O mesmo se observa nas linhagens de *T. tomentosum* que apresentam diversidade entre as amostras isoladas de uma mesma região, tendo sido observada homologia entre as linhagens CEN1390, isolada de Curitiba/SC, e CEN1398, isolada de amostras coletadas em Bueno Brandão/MG. Estes estudos são fundamentais para a correta identificação de linhagens de *Trichoderma* dentro de uma mesma espécie. Schmidt et al. (2004) mostraram que marcadores AFLP permitiram separar claramente as espécies de *Aspergillus niger* e *A. carbonarius* isoladas de amostras de café. Keto-Timmonen et al. (2006) mostraram que o padrão de bandas de AFLP permite genotipagem de amostras de espécies de *Candida* com grande confiabilidade, podendo inclusive ser utilizado em estudos epidemiológicos. Esses marcadores vêm, também, sendo aplicados para genotipagem de fungos micorrízicos, mostrando ser possível identificar diferenças entre isolados em diferentes níveis como indivíduos, populações, espécies e gênero (HOLLICK et al., 2004). A análise de AFLP de linhagens de *Trichoderma* isoladas de solo de cultivo de alho e cebola, neste trabalho, revelou os mesmos padrões de espécies obtidas pelas análises de ITS e TEF, confirmando a identidade e diversidade das espécies identificadas.

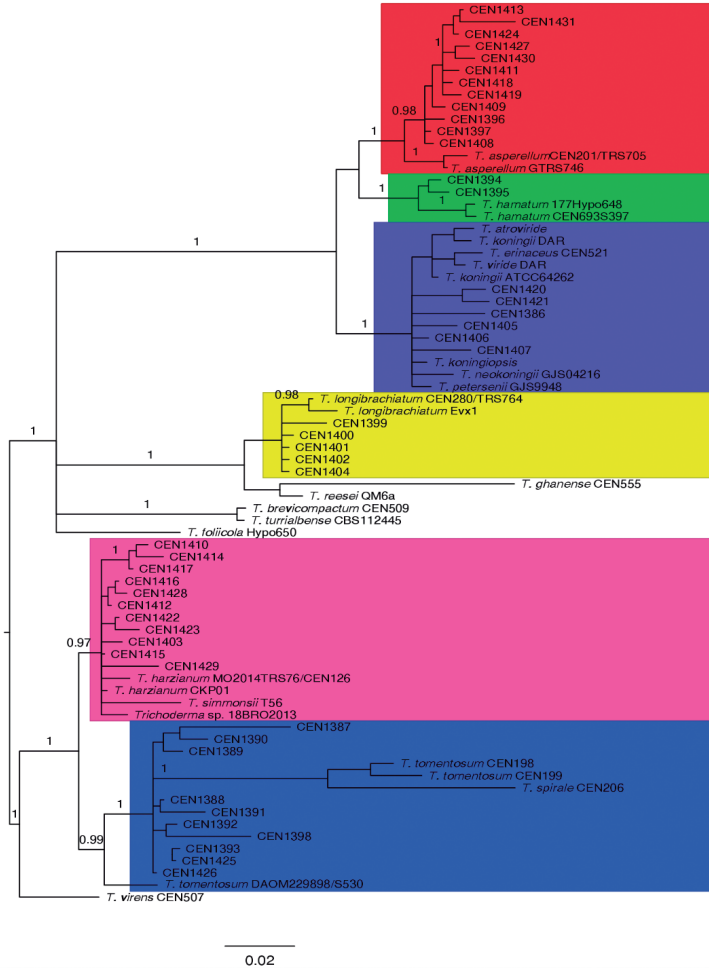


Figura 1. Árvore Bayesiana (ITS + TEF) apresentando as seis espécies de *Trichoderma* identificadas.

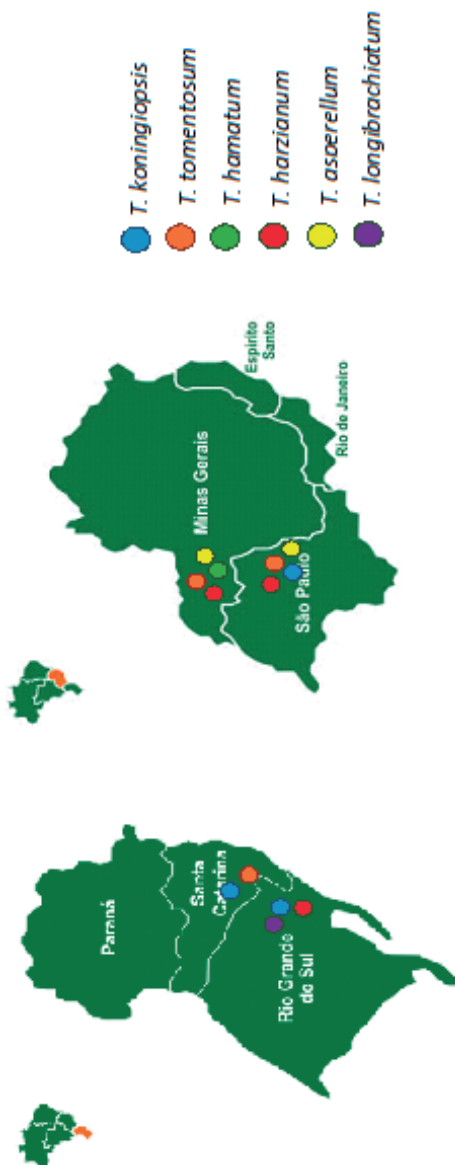


Figura 2. Distribuição de espécies de *Trichoderma* isoladas de solos de regiões de cultivo de alho e cebola.

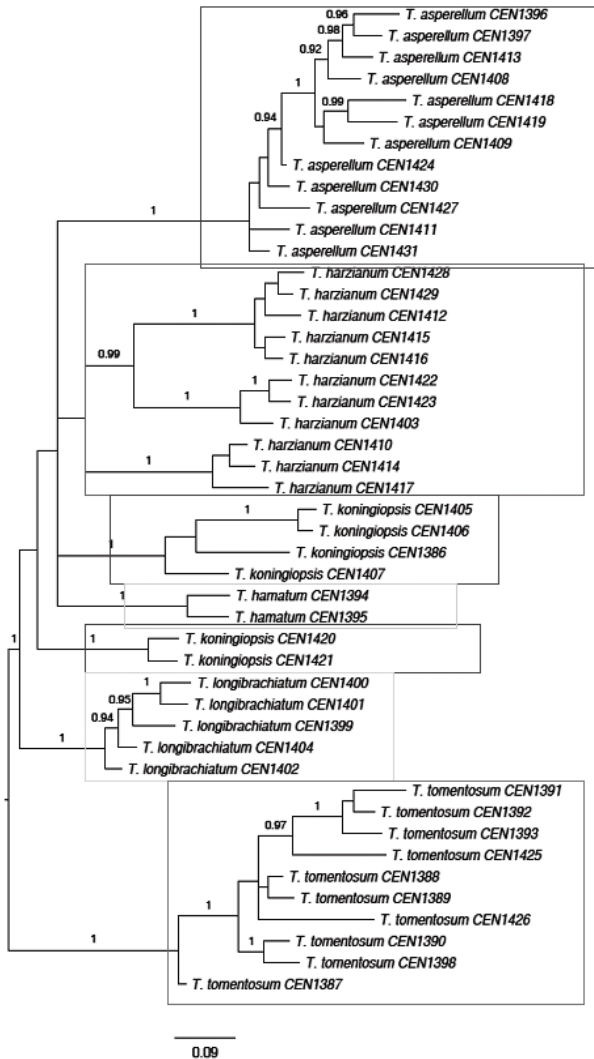


Figura 3. Análise de AFLP das linhagens de *Trichoderma* mostrando a diversidade de linhagens dentro da mesma espécie.

Conclusões

Utilizando-se sequências ITS e TEF combinadas, foi possível identificar seis espécies de um total de quarenta e seis linhagens coletadas em cultivos de alho e cebola. Análise de AFLP confirmou os agrupamentos das espécies, mostrando diversidade entre linhagens dentro da mesma espécie, tanto oriundas de uma mesma área quanto de diferentes áreas. As diferentes espécies parecem estar diferencialmente distribuídas nas áreas de coleta, tendo sido observado que as cinco linhagens de *T. longibrachiatum* ocorrem somente no estado do Rio Grande do Sul.

Agradecimentos

À FAPDF pelo apoio financeiro e ao Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela disponibilização da infraestrutura para as análises moleculares.

Referências

AL-SADI, A.; AL-OWEISI, F.A.; EDWARDS, S.G.; AL-NADABI, H.; AL-FAHDI, A.M. Genetic analysis reveals diversity and genetic relationship among *Trichoderma* isolates from potting media, cultivated soil and uncultivated soil. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 147-158, 2015.

ARRIGO, N.; HOLDEREGGER, R.; ALVAREZ, N. Automated Scoring of AFLPs Using RawGeno v 2.0, a Free R CRAN Library. **Methods in Molecular Biology**, v. 888, p. 155–175, 2012.

BAE, S. J.; MOHANTA, T. K.; CHUNG, J. Y.; RYU, M.; PARK, G.; SHIM, S.; HONG, S. B.; SEO, H.; BAE, D. W.; BAE, I.; KIM, J. J.; BAE, H. *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. **Biological Control**, v. 92, p. 128-138, 2016.

BONTEMPO, A. F. **Seleção “in vitro” de isolados de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. em baixa temperatura de crescimento para o controle de *Sclerotium cepivorum***. 2016. 22 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Produção Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Rio Paranaíba. 2016. Disponível em: < <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/7805> >.

BRONDANI, R. P.; GRATTAPAGLIA, D. Cost-effective method to synthesize a fluorescent internal DNA standard for automated fragment sizing. **Biotechniques**, v. 31, p. 793–795, 2001.

BUHARIWALLA, H. K.; SRILAKHMI, P.; KANNAN, S.; KANCHI, R. S.; CHANDRA, S.; SATYAPRASAD, K.; WALLIYAR, F.; THAKUR, R. P.; CROUCH, J. H. AFLP analysis of *Trichoderma* spp. from India compared with sequence and morphological-based diagnostics. **Journal of Phytopathology**, v. 153, p. 389-400, 2005.

CASTILLO, F. D.; PADILLA, A. M. B.; MORALES, G. G.; SILLER, M. C.; HERRERA, R. R.; GONZALES, C. N. A.; REYES, F. C. In vitro antagonistic action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. **American Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 6, n. 3, p. 410-417, 2011.

CHAVERRI, P.; BRANCO-ROCHA, F.; JAKLITSCH, W.; GAZIS,

R.; DEGENKILB, T.; SAMUELS, G. J. Systematics of *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, v. 107, n. 3, p. 558-590, 2016.

CLARKSON, J. P.; PAYNE, T.; MEAD, A.; WHIPPS, J. M. Selection of fungal biological control of *Sclerotium cepivorum* for control of white rot by sclerotial degradation in a UK soil. *Plant Pathology*, v. 51, p. 735-745, 2002.

DILBO, C., ALEMU, M., LENCHO, A., HUNDUMA, R. Integrated management of garlic White rot (*Sclerotium cepivorum* Berk) using some fungicides and antifungal *Trichoderma* species. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, v. 6, p. 1, p. 251, 2015.

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*, 42: 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. 16, p. 749–759, 2011.

GARNICA-VERGARA, A.; BARRERA-ORTIZ, S.; MUÑOZ-PARRA. E.; RAYA-GONZÁLEZ, J.; MÉNDEZ-BRAVO, A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; RUIZ-HERRERA, L. F., LÓPEZ-BUCIO, J. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulate *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *New Phytologist*, v. 209, p. 1496-1512, 2016.

GHERBAWY, Y. A.; HUSSEIN, N. A.; AL-QURASHI, A. A. Molecular characterization of *Trichoderma* populations isolated from soil of Taif City, Saudi Arabia. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 3, n.9, p. 1059-1071, 2014.

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

HOLLICK, P. S.; TAYLOR, R. J.; MCCOMB, J. A.; DIXON, K. W.; KRAUSS, S. L. Optimisation of DNA extraction for AFLP analysis of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids Caladeniinae and Drakaeinae. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.22, n. 3, p. 307-308, 2004.

HOYOS-CARVAJAL, L.; BISSETT, J. Biodiversity of *Trichoderma* in neotropics. In: GRILLO, O.; VENORA, G. **The Dynamical Processes of Biodiversity**: case studies of evolution and spatial distribution. London: Intech, 2011. p. 303–320.

INGLIS, P. W.; PAPPAS, M. de C. R.; GRATTAPAGLIA, D. **Protocolo de extração de DNA e RNA de alta qualidade para espécies ricas em compostos secundários**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2016. 5 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 204)

KATOH, K., ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, set. 6. doi: 10.1093/bib/bbx108. 2017.

KETO-TIMMONEN, R.; HEIKINHEIMO, A.; EEROLA, E.; KORKEALA, H. Identification of *Clostridium* species and DNA fingerprinting of *Clostridium perfringens* by amplified fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 4057-4065, 2006.

LÓPEZ-QUINTERO, C. A.; ATANASOVA, L.; FRANCO-MOLANO, A. E.; GAMS, W.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; THEELEN, B.; MÜLLER, W. H.; BOEKHOUT, T.; DRUZHININA, I. DNA barcoding survey of *Trichoderma* diversity in soil and litter of the Colombian lowland Amazonian rainforest reveals *Trichoderma strigosellum* sp. nov. and other species. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 104, n. 5, p. 657-674, 2013.

OLIVEIRA, M. L.; DE MARCHI, B. R.; MITUTI, T., PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R. Identification and sequence analysis of five allelixiviruses species infecting garlic crops in Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 6, p. 483-489, 2014.

QUIROZ-SARMIENTO, F. V.; FERRERA-CERRATO, R. Antagonismo in vitro de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. **Revista Mexicana de Micología**, v. 26, p. 27-34, 2008.

REHNER, S. A.; MINNIS, A. M.; SUNG, G. H.; LUANGSA-ARDD, J. J.; DEVOTTO, L.; HUMBER, R. A. Phylogeny and systematics of anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, v. 103, n. 5, p. 1055-1073, 2011.

RESENDE, J. T. V.; MORALES, R. G. F.; ZANIN, D. S.; RESENDE, F. V.; PAULA, J. T.; DIAS, D. M.; GALVÃO, A. G. Caracterização morfológica, produtividade e rendimento comercial de cultivares de alho. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 157-162, 2013.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 12, p. 1572-1574, 2003.

SAMUELS, G. J.; DODD, S. L.; GAMS, W.; CASTLEBURY, L. A.; PETRINI, O. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, v. 94, p. 146–170, 2002.

SCHMIDT, H.; TANIWAKI, M. H.; VOGEL, R. F.; NIESSEN, L. Utilization of AFLP markers for PCR-based identification of *Aspergillus carbonarius* and indication of its presence in green coffee samples. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 899-909, 2004.

SHAHID, M.; SINGH, A.; SRIVASTAVA, M.; SRIVASTAVA, D. K. Molecular characterization of *Trichoderma viride* isolated from rhizospheric soils of Uttar Pradesh based on rDNA markers and analysis of PCR-ISSR profiles. **Molecular Biomarkers & Diagnosis**, v. 5, n. 2, p. 169, 2014.

VERMA, M.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y.; VALÉRO, J. R. (2007) Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 1-20, 2007.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VANDELEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP-A new technique for DNA-fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.



***Recursos Genéticos e
Biotecnologia***

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

