

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA – NÍVEL MESTRADO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma spp.* UTILIZANDO
MARCADORES DO TIPO RAPD E DNA BARCODE

PATRICIA RIBEIRO DOS SANTOS

Goiânia
- Janeiro de 2010 -

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA – NÍVEL MESTRADO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma spp.* UTILIZANDO
MARCADORES DO TIPO RAPD E DNA BARCODE

ORIENTADOR: Prof^o. Cirano José Ulhoa

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em biologia da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em biologia – área de concentração em biologia celular e molecular

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)**GPT/BC/UFG**

Santos, Patricia Ribeiro dos.

S237i Identificação de isolados de *Trichoderma spp.* utilizando marcadores do tipo RAPD e DNA Barcode [manuscrito] / Patricia Ribeiro dos Santos. - 2010.

69 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa; Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, 2010.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, tabelas e abreviaturas.

1. Controle Biológico 2. *Trichoderma ssp* 3. Marcadores moleculares 4. DNA Barcode I. Título.

CDU: 632.937

“A sorte do gênio é 99% de trabalho e 1% de sorte.”

Albert Einstein

“A adversidade desperta em nós capacidades que, em circunstâncias favoráveis, teriam ficado adormecidas.”

Horácio

Dedico este trabalho aos meus pais, principalmente minha mãe, cuja força e coragem me inspiram e cujo apoio sempre foi incondicional. A meu querido irmão, Júnior e a todos aqueles que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos de minha vida. Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre colocou em minha vida pessoas maravilhosas.

Ao Prof^o. Cirano José Ulhoa pela confiança, pelos ensinamentos e pelas oportunidades. Por me ensinar que a humildade é sempre o melhor caminho.

Aos meus pais Maria e William, sem o qual nada disso seria possível.

A minha querida família, meu irmão Júnior, minha cunhada Tatiana e minha querida sobrinha Sophia, pelos momentos de diversão, pelo amor e pela confiança. Aos meus queridos Avós Antônio e Antônia pelo carinho e pelos momentos de sabedoria. A minha amada tia Sueli, que me dá forças e que sempre esteve ao meu lado.

À Prof^a. Maria Helena Fungaro pela acolhida em seu laboratório, pela oportunidade e pelos ensinamentos.

Ao Dr. Murilo da EMBRAPA – Arroz e Feijão por ceder amostras dos isolados utilizados neste trabalho.

Às queridas colegas Daniele Sartori, Lara Ferracin, Juliana (Universidade Estadual de Londrina) e Carla de Freitas Munhoz (Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ / USP), por tornar minha estadia no Laboratório Genoma agradável e proveitosa.

À Prof^a. Silvana Petrofeza pelo empréstimo de materiais essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Prof^o. Alexandre Siqueira pela colaboração e pelos ensinamentos.

Àos meus queridos amigos Fabyano Alvares, Amanda Rafaela, Amanda Araújo, Rachel Freitas e Vanessa Leitão, conhecer vocês foi um dos melhores acontecimentos nesses dois anos de curso e convívio. Minha amizade por vocês é eterna.

Aos meus queridos colegas Saulo Siqueira, Marcelo Ramada, Rogério, Andrei, Suelen pelos momentos de descontração e diversão no laboratório de enzimologia.

Aos Professores Roberto e Valdirene pelo auxílio.

À minha querida amiga Marcela Suriani (The Best), que me apoiou, me ajudou e por sua amizade, pois nada nesse mundo é por acaso.

Ao Prof^o. Luís Artur Mendes Bataus por tirar minhas dúvidas e por me aceitar como “anexo” em seu laboratório.

Às minhas queridas amigas Emília e Flávia por estarem a tanto tempo tornando a minha vida melhor e mais feliz.

Às agências de fomento, FUNAPE – UFG, FAPEGO, FINEP/CNPq e PROCAD/CAPES, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

A todos os amigos que fiz durante o curso e a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho e que embora não mencionados estiveram presentes comigo durante todo o percurso.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. CONTROLE BIOLÓGICO.....	13
1.2. O GÊNERO <i>Trichoderma</i>	15
1.3. SISTEMÁTICA MOLECULAR.....	20
1.3.1. MARCADORES MOLECULARES.....	20
1.3.2. DNA RIBOSSOMAL.....	22
1.3.3. DNA BARCODE.....	23
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. OBJETIVO GERAL.....	26
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. MANUTENÇÃO E CULTIVO DE ISOLADOS DE <i>Trichoderma spp</i>	27
3.2. EXTRAÇÃO DE DNA E RAPD-PCR.....	27
3.3. ANÁLISE DOS DADOS DE RAPD-PCR.....	28
3.4. AMPLIFICAÇÃO DO rDNA.....	35
3.5. ANÁLISE DOS DADOS DO rDNA.....	36
3.6. IDENTIFICAÇÕES.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1. RAPD-PCR.....	38
4.2. AMPLIFICAÇÃO, ANÁLISE FILOGENÉTICA DO DNA RIBOSSÔMICO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS UTILIZANDO DNA BARCODE.....	48
5. CONCLUSÕES.....	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de isolados e suas respectivas cidades de coleta utilizados neste trabalho.....	29
Tabela 2. Lista de 99 isolados, cidades e regiões de cultivo utilizados na análise prévia feita em Londrina – PR.....	39
Tabela 3. AMOVA realizada com 99 isolados de <i>Trichoderma</i> spp. utilizando áreas cultivadas dentro da localidade como fonte de variação. Em vermelho a porcentagem da variação observada.....	43
Tabela 4. AMOVA realizada com 99 isolados de <i>Trichoderma</i> spp. utilizando a localização (cidades) da área cultivada como fonte de variação. Em vermelho a porcentagem da variação observada.....	44
Tabela 5. Isolados identificados utilizando a ferramenta online <i>TrichOKey</i> , disponível em www.isth.info .	49
Tabela 6. Isolados utilizados para a análise filogenética e identificação utilizando o BLAST. Além do menor E-value, foi considerado a porcentagem de identidade entre as sequências e a existência de espécies diferentes daquelas cujo valor E-value foi menor. Isolados foram selecionados de acordo com o alinhamento.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Características culturais de isolados de diferentes espécies de <i>Trichoderma</i>	17
Figura 2.	Representação esquemática da região ITS1 e 2.....	22
Figura 3.	Representação esquemática contendo a sequência de passos para identificação molecular de espécies de <i>Hypocrea/Trichoderma</i> , disponíveis no portal www.isth.info	25
Figura 4.	Primers utilizados para amplificação da região ITS1 e 2.....	35
Figura 5.	Alinhamento de 88 espécies de <i>Trichoderma/Hypocrea</i> utilizados para a construção do oligonucleotídeo barcode.....	37
Figura 6.	Dendograma mostrando as relações genéticas entre 99 isolados de <i>Trichoderma spp.</i> baseado no perfil de bandas polimórficas geradas a partir da amplificação dos primers decaméricos OPX1, OPX3 e OPX13.....	42
Figura 7.	Teste de atribuição, realizado pelo o <i>software Structure 2.2</i>	45
Figura 8.	Dendograma mostrando as relações genéticas entre 247 isolados de <i>Trichoderma spp.</i> baseado no perfil de bandas polimórficas geradas a partir da amplificação dos primers decaméricos OPX1, OPX3 e OPX13.....	47
Figura 9.	Árvore gerada a partir de 198 isolados de <i>Trichoderma spp.</i> utilizando o método de Neighbor-Joining.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AMOVA – Analysis of Molecular Variation

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

bp – Pares de bases

BSR – Biological Species Recognition

DNA – Ácido desoxiribonucleico

DICE – Coeficiente de similaridade

E-value - Expect value

GCPSR – Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition

ITS – Internal Transcribed Spacer Region

MSR – Morphological Species Concept

PCR – Polymerase Chain Reaction

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA

rDNA – DNA ribossomal

RNA – Ácido ribonucleico

rRNA – RNA ribossomal

UPGMA – Unweighted Pair-Group Method With Arithmetical Averages

RESUMO

Controle biológico é um processo natural, que regula o número de indivíduos existentes em uma população, pela ação de outro indivíduo chamado de “inimigo natural” ou agente de controle biológico (parasitóides, predadores e patógenos), causando mortalidade biótica. Fungos que atuam como antagonistas de fungos fitopatogênicos têm sido usados para controlar a doença, sendo que 90% dessas aplicações tem sido feitas utilizando-se linhagens de fungos do gênero *Trichoderma*. O gênero *Trichoderma* (Ascomycetes), ordem Hypocreales, pertencente à classe dos hifomicetos e reúne espécies que se encontram entre os fungos de solo mais comumente encontrados na natureza. Vários são os problemas relacionados à nomenclatura de indivíduos desses gêneros. Ferramentas moleculares, como marcadores e DNA Barcode tem sido usadas na identificação não só de *Trichoderma* mas também de outros fungos. Esse trabalho teve como objetivo identificar isolados de *Trichoderma* spp. Utilizando somente ferramentas moleculares. A análise utilizando marcadores RAPD possibilitaram uma observação de alto grau de variabilidade genética existente entre esses indivíduos, mas se mostrou problemática quando o número amostral foi aumentado. A identificação de indivíduos utilizando DNA Barcode só foi possível para poucos indivíduos o que demonstra a necessidade de que as sequências obtidas sejam de alta qualidade. A análise filogenética se mostrou extremamente difícil, devido à demanda de tempo necessária para a realização das análises. Entretanto através da análise de Neighbor-joining foi possível observar que quando se utiliza bancos de dados como o BLAST a taxa de erro na identificação dessas espécies é grande devido ao depósito de sequências de isolados incorretamente identificados.

ABSTRACT

Biological control is a natural process that regulates the number of individuals existing in a population, by the action of another individual called "natural enemies or biological control agent (parasitoids, predators and pathogens), causing biotic mortality. Fungi that act as antagonists of phytopathogenic fungi have been used to control the disease, and 90% of these applications have been made using strains of fungi of the genus *Trichoderma*. The genus *Trichoderma* (*Ascomycetes*) *Hypocreales*, belonging to the class and brings Hifomicetos species that are among the soil fungi most commonly found in nature. There are several problems related to the nomenclature of individuals of this gender. Molecular tools such as markers and DNA Barcode has been used in identification of *Trichoderma* but also another fungi. The objective of this work was to identify isolates of *Trichoderma spp.* using only molecular tools. Analysis using markers make possible the observation of the high degree of genetic variability between these individuals, but proved problematic when the sample size was increased. The identification of individuals using DNA Barcode was possible only for a few individuals who show the need for the high quality sequences obtained by sequencing. The phylogenetic analysis was extremely difficult because is time consuming and required much time to perform the analysis. However by Neighbor-joining analysis was observed that when using databases such as BLAST error rate in identifying these species is high due to deposition of sequences of isolates incorrectly identified.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONTROLE BIOLÓGICO

Através da evolução agrícola, microorganismos fitopatogênicos e insetos têm travado batalhas com agricultores e agrônomos. Apesar de a interação entre esses organismos e as plantas, ser um fenômeno natural, o cultivo de grandes extensões de terra, faz a população desses indivíduos crescer vertiginosamente, afetando diretamente a produção agrícola. O avanço tecnológico proporcionou a descoberta de toxinas químicas (defensivos agrícolas), que foram muito utilizados para diminuir o impacto desses organismos nas lavouras. Entretanto, a eficiência e a falta de especificidade desse tipo de produto mostrou-se pouco duradoura. Mesmo com o aumento da quantidade de produto aplicado as pragas se mostraram cada vez mais resistentes (Cruz, 2002). O uso indiscriminado de pesticidas e herbicidas químicos trouxe vários tipos de problemas, pois eles não eram apenas tóxicos para os insetos e microorganismos causadores de problemas, mas também para o meio ambiente de forma geral e extremamente tóxico para os seres humanos (Kogan, 1998). A preocupação crescente com o impacto das ações humanas no meio ambiente, principalmente, no que diz respeito a atividade agropecuária, tem aumentado a busca por soluções, que amenizem o impacto da ação humana sobre o meio ambiente, mas que também seja acessível, lucrativa e que aumente a produção de alimentos. Uma alternativa, que vêm se mostrando promissora para o combate de pragas (tanto insetos quanto microorganismos) em um sistema agrícola sustentável, produtivo e ecologicamente correto é o controle biológico (Parra *et al.*, 2002).

Controle biológico é um processo natural, que regula o número de indivíduos existentes em uma população, pela ação de outro indivíduo chamado de “inimigo natural” ou agente de controle biológico (parasitóides, predadores e patógenos), causando mortalidade biótica (Cook & Baker, 1983). Através dos tempos o homem aprendeu a manipular ou manejar esses inimigos naturais para utilizá-los como aliados na produção agrícola, surgindo o Controle Biológico aplicado como tecnologia baseada na utilização de recursos genéticos de microorganismos, insetos predadores e parasitóides para o controle de pragas, especialmente os insetos e ácaros fitófagos e microorganismos para o controle de doenças causadas por fitopatógenos.

O uso do controle biológico como ferramenta de controle de pragas, pelo homem é antigo e data do século III a.C., quando os chineses se valeram da predação de formigas (*Oecophylla smaragdina*) para controlar pragas de citros (Clausen, 1956; Van den Bosh *et al.*, 1982). As formigas também foram utilizadas pelos árabes no período medieval para o controle de pragas, dando início a história do uso do controle biológico para controlar pragas agrícolas (Gurr *et al.*, 2002). Entretanto, somente no século XX é que o controle biológico passou a ser alvo de pesquisas para implantação de forma mais direta e intensiva nos ecossistemas agrícolas (Maron & Crone, 2006). Nesse sentido, uma área que vêm apresentando grande desenvolvimento é o controle biológico de fitopatologias causadas por fungos que afetam tanto solo quanto folhas através de outras espécies de fungos, chamados antagonistas. Aproximadamente 70% das doenças que atacam grandes plantações são causadas por fungos (Seidl, 2006). Essas doenças têm um papel fundamental na destruição dos recursos naturais na agricultura, principalmente aquelas causadas por patógenos presentes no solo, sendo que os fungos são os mais agressivos (Benítez *et al.*, 2004). Um bom exemplo disso são alguns exemplares de fungos dos gêneros *Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Sclerotinia* e *Fusarium*, *Armillaria*, *Colletotrichum*, *Verticillium*, *Venturia*, *Endotia*, *Rhizopus*, *Diaporthe*, *Fusicladium*, *Poria monticola* e *Stereum purpureum* (Corabi-Adell, 2004).

Fungos que atuam como antagonistas de fungos fitopatogênicos têm sido usados para controlar a doença, sendo que 90% dessas aplicações tem sido feitas utilizando-se linhagens de fungos do gênero *Trichoderma* (Monte, 2001).

Trichoderma spp. têm sido alvo de estudos de muitos pesquisadores que vêm contribuindo com a busca de agentes de controle biológico através de fungos. Indivíduos que pertencem ao gênero *Trichoderma spp.* responde por quase 50% de todo crescente mercado de agentes de controle biológico que os cientistas vêm tentando descobrir (Harman, 2000).

Os fungos classificados com sendo pertencentes ao gênero *Trichoderma*, são assexuados e são os mais freqüentemente encontrados no solo. Eles também colonizam matéria orgânica e árvores em processo de decomposição, nos quais a forma que se reproduz sexuadamente, classificada no gênero *Hypocrea* e denominada teleomorfa são mais encontradas. Entretanto, muitos dos isolados, incluindo aqueles com potencial para controle biológico não têm estágio sexual conhecido. Em seu ambiente natural, a forma assexuada é perpetuada a partir da reprodução clonal dos indivíduos que são

heterocarióticos e que provavelmente evoluem indiferentemente ao estágio sexual. Eles possuem um alto nível de diversidade genética que pode ser utilizada para produzir uma grande variedade de produtos de interesse comercial e ecológico (Harman *et al.*, 2004).

Alguns indivíduos deste gênero têm importante papel como produtor de enzimas de interesse industrial, antibióticos e atuam como agentes de controle biológico de patógenos de plantas (micoparasitismo), principalmente as plantas de interesse agrícola (Kullning-Grandinger *et al.*, 2002). Linhagens de *Trichoderma* que atuam como micoparasitas reconhecem a hifa do hospedeiro e se enrolam ao redor dela, desenvolvendo o micélio vegetativo, penetrando a parede celular do hospedeiro, por meio de uma estrutura denominada apressório que libera enzimas no meio, que degradam a parede celular, como quitinases, glucanases e proteases, utilizando o hospedeiro como fonte de nutrientes (Liu e Yang, 2005).

O sucesso das linhagens de *Trichoderma* como agentes de controle biológico se deve ao fato de que esses indivíduos têm uma alta capacidade de reprodução, habilidade de sobrevivência mesmo sob condições muito adversas, utilizando com eficiência os nutrientes presentes no meio. Podem modificar a rizosfera onde se encontram, são extremamente agressivos contra outros fungos fitopatogênicos e podendo ainda promover o crescimento da planta e mecanismos de defesa. Todas essas qualidades fazem com que indivíduos deste gênero estejam presentes em muito ambientes e em grande concentração (Benítez *et al.*, 2004; Monte, 2001).

1.2. O GÊNERO *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* compreende um grupo de indivíduos presentes em quase todos os tipos de solo, madeira em decomposição e restos de vegetação. As espécies de fungos do gênero *Trichoderma*, são componentes dominantes na microflora presente em uma grande variedade de habitats. Essa característica especial se deve à sua grande capacidade metabólica e a sua natureza agressivamente competitiva. Esses indivíduos dificilmente causam doenças em plantas, mas podem atacar uma espécie comercial de cogumelo (Gams & Bisset, 1998) e mais recentemente foi demonstrado que *T. longibrachiatum* e *T. citrinoviride* podem atuar como patógenos oportunistas em

mamíferos imunocomprometidos, incluindo-se ai seres humanos, causando infecções invasivas e reações alérgicas (Druzhinina *et al.*, 2008). O gênero *Trichoderma* (Ascomycetes), ordem Hypocreales, pertencente à classe dos hifomicetos e reúne espécies que se encontram entre os fungos de solo mais comumente encontrados na natureza (ROIGERS *et al.*, 1991 apud Corabi-Adell, 2004). Além de uma capacidade adaptativa elevada apresentam também grande potencial de dispersão. A grande maioria das linhagens de *Trichoderma* de interesse comercial compreende fungos anamórficos (assexuados), que provavelmente são mitóticos e clonais. Em geral, espécies do gênero *Trichoderma* possui fiálides hialinas formadas pelos conidióforos e conídios que são geralmente lisos, raramente ornamentados, com forma elíptica, oval, mas que pode-se apresentar também globoso, com coloração verde, hialina e menos comumente amarelo (Chaverri & Samuels, 2003). Apesar de todo o conhecimento gerado a respeito desse gênero, a taxonomia de *Trichoderma* permanece incompleta e a distinção entre espécies desse gênero é extremamente problemática. A classificação e identificação correta desses isolados é necessária para predizer importantes informações a cerca da ecologia, toxicologia e tecnologia.

Fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* são conhecidos desde o século XVIII. A partir de material coletado em solo alemão, Persoon propôs pela primeira vez isolados de *Trichoderma* como gênero e sua associação com fungos teleomórficos, classificados dentro do gênero *Hypocrea* Fr. foi reconhecida pelos irmãos Tulasne em 1865 (Gams & Bisset, 1998).

A primeira tentativa importante de distinguir morfologicamente as espécies desse gênero foi feita por Rifai em 1969 e cujos nove taxas definidos por meio de um conceito de “espécies agregadas” não foram correlacionadas a nenhuma espécie teleomórfica (Lima, 2002). Rifai (1969), nomeou cada espécie agregada como *T. aureoviride* Rifai, *T. hamatum* (Bonord) Bain., *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudem., *T. longibrachiatum* Rifai, *T. piluliferum* Rifai, *T. polysporum* (Link: Fr.) Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai, e *T. viride*. Cada uma dessas espécies consideradas “agregadas” compreendia possivelmente mais de uma espécie oculta. Rifai concluiu que somente caracteres anamórficos não poderiam promover uma taxonomia adequada (Rifai, 1969; Chaverri & Samuels, 2003). Algumas conexões estabelecidas entre espécies anamórficas e teleomórficas foram encaixadas fora dos ascósporos (Dingley, 1957 apud Gams & Bisset, 1998). Bisset e colaboradores (1991) concluíram o mais detalhado

estudo sobre espécies anamórficas de *Trichoderma* já feito, onde, 21 taxas foram encontrados e discriminados na seção *Pachybasium* e sete na seção *Longibrachiatum*. Entretanto outras seções do mesmo gênero ainda não foram destrinchadas da mesma forma. Esses estudos demonstraram que baseado somente em graus morfológicos, é extremamente difícil aplicar a delimitação de espécies biológicas aos isolados pertencentes a esse gênero. Desta forma, com a intenção de tornar o trabalho com isolados de *Trichoderma spp.* mais fácil, Bisset (1991), propôs o uso de “seções” para encaixar formas similares dentro das “espécies agregadas” definidas por Rifai (1969), bem como variações morfológicas encontradas nos anamorfos do gênero *Hypocrea*, que compreende os teleomorfos. Essas seções possibilitariam a acomodação da ampla variação morfológica que é reconhecida hoje, visto que, apesar de ser muito utilizado, o sistema proposto por Rifai (1969), reconhece apenas as nove espécies definidas como “agregadas” (Samuels & Seifert, 1995; Lima, 2002; Corabi-Adell, 2004).

A taxonomia de *Trichoderma*, apesar de toda a importância industrial (produção de enzimas hidrolíticas), agrícola (controle biológico, disponibilização de nutrientes e indução de resistência em plantas) e ecológica (decompositores de matéria orgânica), ainda não foi definitivamente esclarecida (Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004; Kullning-Grandinger *et al.*, 2002; Monte, 2001; Harman, 2000). As constantes revisões do gênero que tem sido realizadas, baseadas em caracteres morfológicos, não se mostraram satisfatórias (KUHLS *et al.*, 1997). A utilização da análise morfológica para a identificação tem se mostrado efetiva ao nível de gênero, entretanto quanto à diferenciação intra-específica uma complexidade maior é observada devido à sobreposição de diversos caracteres distintivos, resultando numa chave bastante artificial e, portanto, sujeita a certo subjetivismo (Samuels, 1996 apud Lima, 2002). Essa flexibilidade na morfologia, torna o limite entre espécies quase que impossível de ser identificado, principalmente se tratando de um número de isolados muito grande, causando constantemente confusões na identificação (Lieckfeld *et al.*, 2001; Kullning *et al.*, 2001; Lima, 2002; Corabi-Adell, 2004). Duas são as hipóteses que podem explicar a complexidade na classificação de isolados desse gênero: Primeiro, uma especiação extremamente ativa, denominada explosão evolutiva, que poderia explicar a difícil interpretação do conceito de espécie. Esse fenômeno parece ser bastante comum na natureza, onde é possível observar “espécies” que compartilham várias características comuns e com interrupções pouco nítidas do *continuum* fenotípico das mesmas (Corabi-

Adell, 1999). Segundo, o próprio conceito de espécie. Meyer e Plaskowitz (1989 apud Lieckfeldt *et al.*, 1998) descreveram em seu trabalho que caracteres morfológicos e genéticos, que poderiam ajudar a definir o conceito de espécies biológicas para *Trichoderma* ainda não foram identificados.

A definição de uma medida objetiva da variabilidade de qualquer espécie de *Trichoderma* ainda não foi estabelecida.

A introdução do sequenciamento do DNA e a análise cladística das sequências de DNA nos anos 90, deram início a uma nova era para a sistemática de fungos. O resultado dessa revolução molecular é a habilidade de compreender as inter-relações entre táxons em todos os níveis (Rehner & Samuels, 1995). Muitos táxons de *Trichoderma* tem sido até então identificados com base na morfologia, e a análise da sequência de genes foi utilizada somente para confirmação ou como complemento. Assim, os membros desse gênero, são primeiramente definidos, utilizando-se o conceito de espécies morfológicas (MSR – Morphological Species Concept). A utilização do conceito de espécie biológica (BSR – Biological Species Recognition) é totalmente impraticável (Taylor *et al.*, 2000). O uso do conceito de reconhecimento de espécies filogenéticas em concordância genealógica (GCPSR – Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition) é uma alternativa atrativa ou que pode ser usada como análise complementar ao conceito de espécies morfológicas, mas não tem sido aplicado para *Trichoderma* (Taylor *et al.*, 2000). Para utilizar esse conceito é necessário avaliar árvores obtidas de vários genes sem ligação que, ainda envolve uma circunstância obrigatória: a posição filogenética da espécie verdadeira deverá ser concordante em pelo menos algumas das árvores geradas e não podem ser contradita em outras (Druzhinina & Kubicek, 2005). Vários trabalhos tem utilizado a análise multigênica na tentativa de clarear e obter uma filogenia global para esse gênero. Kullnig-Gradinger *et al.*, (2000) usou quatro diferentes loci, mas a concordância entre as árvores não foi possível, devido a insuficiente resolução filogenética dos genes usados. Na tentativa de elucidar as variantes existentes na espécie *H. lixii/T. harzianum*, Chaverri *et al.*, (2003), também utilizou quatro diferentes loci para avaliação, sendo que três deles diferem daqueles usados no trabalho publicado por Kullnig-Gradinger *et al.*, (2000). Seu trabalho identificou sete linhagens filogenéticas que se mostraram concordantes em muitas das árvores analisadas, mas como não foi possível fazer a distinção morfológica entre esses isolados, não foi possível o reconhecimento como espécie. O conceito morfológico de

espécie é baseado na similaridade dos caracteres e na sua ausência, enquanto que o conceito filogenético de espécie, considera as relações evolutivas entre os organismos (Taylor *et al.*, 2000).

Devido principalmente a sua importância econômica, vários são os grupos de pesquisa que vem trabalhando com isolados do gênero *Trichoderma* pelo mundo. Uma das principais preocupações inerentes à esses trabalhos é a identificação correta de isolados, principalmente daqueles de regiões cultivadas ou em associação com a rizosfera. Muitos desses grupos não possuem pessoal especializado para a identificação e/ou não tem interesse em trabalhos que envolvam avaliações evolutivas ou mesmo discussões de taxonomia. Porém, existe a necessidade de buscar por isolados de atuem bem como agentes de controle biológico ou que sejam bons produtores de enzimas, antibióticos e metabólitos secundários, que possam ser utilizados para aplicações práticas. A busca por um isolado que apresente tais características requer o screening de inúmeros indivíduos. Além do mais, análises taxonomicas requerem taxonomistas experientes.

A formação de um especialista consome muito tempo, pois requer estudo prolongado, tempo de observação para analisar muitas espécies, ter conhecimento detalhado de cada uma delas e estar a par do conhecimento que já foi gerado na área (Thompson *et al.*, 2005). Vários problemas relacionados a falta de incentivo para esse tipo de pesquisa e a diminuição do fator de impacto de revistas especializadas dificultam a obtenção de verbas e levou a diminuição no número de profissionais especializados não só no Brasil com também em outros países (Boero, 2010).

Por todos os motivos citados o processo preferido para muitos pesquisadores é submeter sequências no BLAST e assim aceitam o primeiro resultado como identidade da espécie. Infelizmente para muitos fungos, bancos de dados como o GenBank contém muitas sequências que foram incorretamente identificadas (Kopchinskiy *et al.*, 2005). Outro porém é que muitos pesquisadores sem um bom treinamento em bioinformática, não conseguem interpretar de forma correta os dados e tomam valores de *E-value* igual a 0.0 como identidade, sem verificar se a sequência é idêntica ou altamente similar. Mesmo que idêntica, é necessário verificar se não existe outra espécie identificada com a mesma sequência (Druzhinina & Kubicek, 2005). Na busca pela solução do problema, várias ferramentas moleculares vem sendo geradas para auxiliar no screening e na

identificação de espécies de interesse biotecnológico, de forma mais simples e dinâmica.

1.3. SISTEMÁTICA MOLECULAR

1.3.1. MARCADORES MOLECULARES

A recente revolução na biologia molecular tem resultado em técnicas que permitem a identificação de inúmeros fungos. Essas técnicas permitem a identificação de variedades e linhagens clonais dentro de uma espécie, e a discriminação e classificação de populações, espécies, gênero, famílias, ordens, classes e até mesmo reinos e domínios. Os métodos moleculares tem a capacidade de explorar a imensa variação que ocorre naturalmente no DNA (Xu, 2006).

A ausência de caracteres morfológicos tornou os marcadores moleculares inestimáveis para o estudo de aspectos da ecologia, biologia e genética de fungos. Esses marcadores geralmente são desenvolvidos especificamente para cada espécie de fungo a ser estudada, utilizando técnicas moleculares. Com o aumento da disponibilização de genomas de fungos em bases de dados, tem se tornado possível o desenvolvimento de marcadores moleculares para serem utilizados em genomas sequenciados (Carter *et al.*, 2004). Esses marcadores são baseados em pequenas diferenças que se acumulam no genoma de membros de uma espécie e eles divergem de uma para outra. Em fungos esses marcadores podem ser desenvolvidos de regiões cromossômicas, extracromossômicas e de DNA mitocondrial (González-Chavira *et al.*, 2006). Elas podem ser observadas em cópias simples ou em blocos na extensão do genoma (Frazer, 2002). Existem várias classes de marcadores moleculares que podem ser divididos principalmente em marcadores isoenzimáticos e marcadores de DNA, dentro dos marcadores de DNA, uma classe de marcadores baseados em PCR (Polymerase Chain Reaction), vem sendo utilizados com sucesso para eliminação de linhagens duplicadas em estudos que envolvem o screening de isolados de interesse biotecnológico, incluindo-se ai isolados do gênero *Trichoderma* (Fujimori & Okuda, 1994; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O sucesso do screening microbiano não depende do número de amostras analisadas mas da diversidade encontrada. O uso de marcadores do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), vem mostrando resultados favoráveis não só para a identificação de linhagens duplicadas, mas também na observação de variabilidade genética, que não pode ser observada, utilizando-se por exemplo alguns genes habitualmente usados em construções filogenéticas (Fujimori & Okuda, 1994). A partir de análises utilizando marcadores, foi possível, por exemplo, demonstrar que *T. harzianum* se tratava de um complexo de espécies que foi dividida em grupos subespecíficos denominados Th1, Th2, Th3 e Th4 (Hermosa *et al.*, 2000).

1.3.2. DNA RIBOSSOMAL

O rDNA (DNA ribossomal) encontrado no genoma nuclear de eucariotos consiste de unidades de repetições em tandem e sua disposição provavelmente foi homogenizada através de evolução combinada (Hillis & Dixon, 1991; Sanders, 1999). Devido a sua ocorrência, funções essenciais e conservação, dados que correspondem a sequências das subunidades maior (28S), menor (18S), ITS (Internal Transcribed Spacer Region) e mitocondrial do rDNA tem sido usadas em análises filogenéticas de fungos em altos graus taxonômicos, como clados e ordens (Hong *et al.*, 2002). Entretanto, ITS rDNA é tão variável que não pode ser alinhado corretamente entre gêneros diferentes e tem sido constantemente usado na sistemática de espécies dentro de gêneros tanto em fungos quanto em plantas (Feliner & Rosselló, 2007; Hong *et al.*, 2002).

Existem quatro principais razões pelas quais o uso da região ITS tem sido constante: (i) A viabilidade de grupos universais de iniciadores para reação de PCR, que permitem o trabalho com uma grande diversidade de grupos taxonômicos (White *et al.*, 1990; Gardes & Bruns, 1993). (ii) As múltiplas cópias existentes facilitam a amplificação por PCR, mesmo em amostras cuja quantidade de DNA possa ter sido comprometida. (iii) O tamanho relativo do fragmento gerado – cerca de 700bp – permite a amplificação e sequenciamento sem a necessidade de iniciadores internos (Feliner & Rosselló, 2007). (iv) Devido ao grau de variação, a região ITS oferece uma quantidade suficiente de marcadores moleculares adequados para estudos evolucionários a nível de espécies (Lieckfeldt & Seifert, 2000).

Em *Trichoderma*, essa região vem sendo aplicada na delimitação, identificação e classificação de isolados que mostraram resultados promissores com agentes de controle biológico e hiperprodutores de enzimas (Siddiquee *et al.*, 2007). A região ITS1 é mais variável do que a região ITS2. Essa variação se torna ainda mais óbvia ao se observar as diferenças de tamanho entre regiões ITS1 entre diferentes seções. Membros da seção *Lomgibrachiatum*, '*Pachybasium*' e *Trichoderma* tem sequências ITS1 entre 180, 200 e 220bp, respectivamente (Lieckfeldt & Seifert, 2000). É importante lembrar, entretanto, que cladogramas gerados por sequências ITS (ou de qualquer gene a ser usado), representam árvores de genes e não de espécies (Doyle, 1992). Contudo, dados taxonômicos provenientes do uso da região ITS completa (ITS1 e 2), fornece resultados limitados, mas não impediu que o conceito de espécie utilizado atualmente fosse associado a resoluções taxonômicas provenientes de ITS por uma década, mas essa visão vem mudando devido à definição de conceitos de espécies filogenéticas mais refinados (Druznina & Kubicek, 2005; Samuels, 2006).

Apesar das limitações, em nichos ecológicos onde existe um número limitado de espécies relacionadas, dados advindos de sequências ITS podem ser úteis para o desenvolvimento de sondas diagnósticas ou iniciadores para reações de PCR (Borneman & Hartin, 2000; Lieckfeldt & Seifert, 2000).

1.3.3. DNA BARCODE

O sucesso da biotecnologia aplicada, depende principalmente da escolha do microorganismo a ser estudo. A detecção de isolados produtores de moléculas ou ações de interesse biotecnológico, embora suportada por metodologias de ponta, atualmente é randômica (Beydon *et al.*, 2000; Thiericke, 2003). Quase todas as linhagens isoladas de tais levantamentos, são identificadas com bases em certos marcadores filogenéticos. O aumento da deposição de sequências em bancos de dados e de estudos evolucionários, tem mostrado evidências de que a diversidade fenotípica (metabolismo) em muitos casos é influenciada por processos de especiação e sendo assim pode ter uma correlação com certos marcadores filogenéticos (Nagy *et al.*, 2007). Isso significa que é possível desenvolver sequências de DNA diagnósticas (DNA Barcode) para identificação e

seleção de microrganismos com propriedades únicas, direcionando o screening e promovendo a exploração dos isolados selecionados.

DNA barcode é baseado na premissa de que uma sequência curta padronizada, pode distinguir indivíduos de uma espécie devido a variação genética entre as espécies ser maior do que a variação dentro das espécies (Herbert, 2003). DNA barcode tem sido aplicado com sucesso em vários grupos de animais como aves, peixes, aranhas, conchas e em alguns indivíduos da ordem lepidoptera (Hajibabaei, *et al.*, 2007).

Mesmo demonstrando resultados promissores para a identificação de espécies, seu uso para análise filogenética é mais problemático. Árvores filogenéticas construídas com sequências curtas utilizadas em DNA barcode, não obtiveram suporte estatístico relevante em muitos nós internos e, dessa forma, podem representar incorretamente alguns padrões nos ramos das árvores geradas (Min & Hickey, 2007).

A região ITS, muito usada para reconstruções filogenéticas em *Trichoderma*, tem motivos que são úteis para o desenvolvimento de DNA barcode para fungos. Apesar de seu uso em análises filogenéticas ter sofrido certo descrédito, devido a evidências encontradas de cópias paralogas de ITS2 em plantas e em *Fusarium*, nada foi encontrado em *Trichoderma* (Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002). A região ITS forma hastes e voltas características, que são importantes para a maturação do rRNA. A sequência de DNA que é responsável pela formação da volta possui altas taxas de mutação, o que faz com que seja candidata para o desenvolvimento de oligonucleotídeos Barcode (Fig. 1) (Druzhinina *et al.*, 2005).

A partir da geração de uma sequência que pudesse ser utilizada como Barcode, Druzhinina *et al.*, (2005), criaram um banco de dados específico para a identificação de isolados de *Trichoderma* tendo como base o oligonucleotídeo barcode gerado (Fig. 2) (Druzhinina *et al.*, 2006).

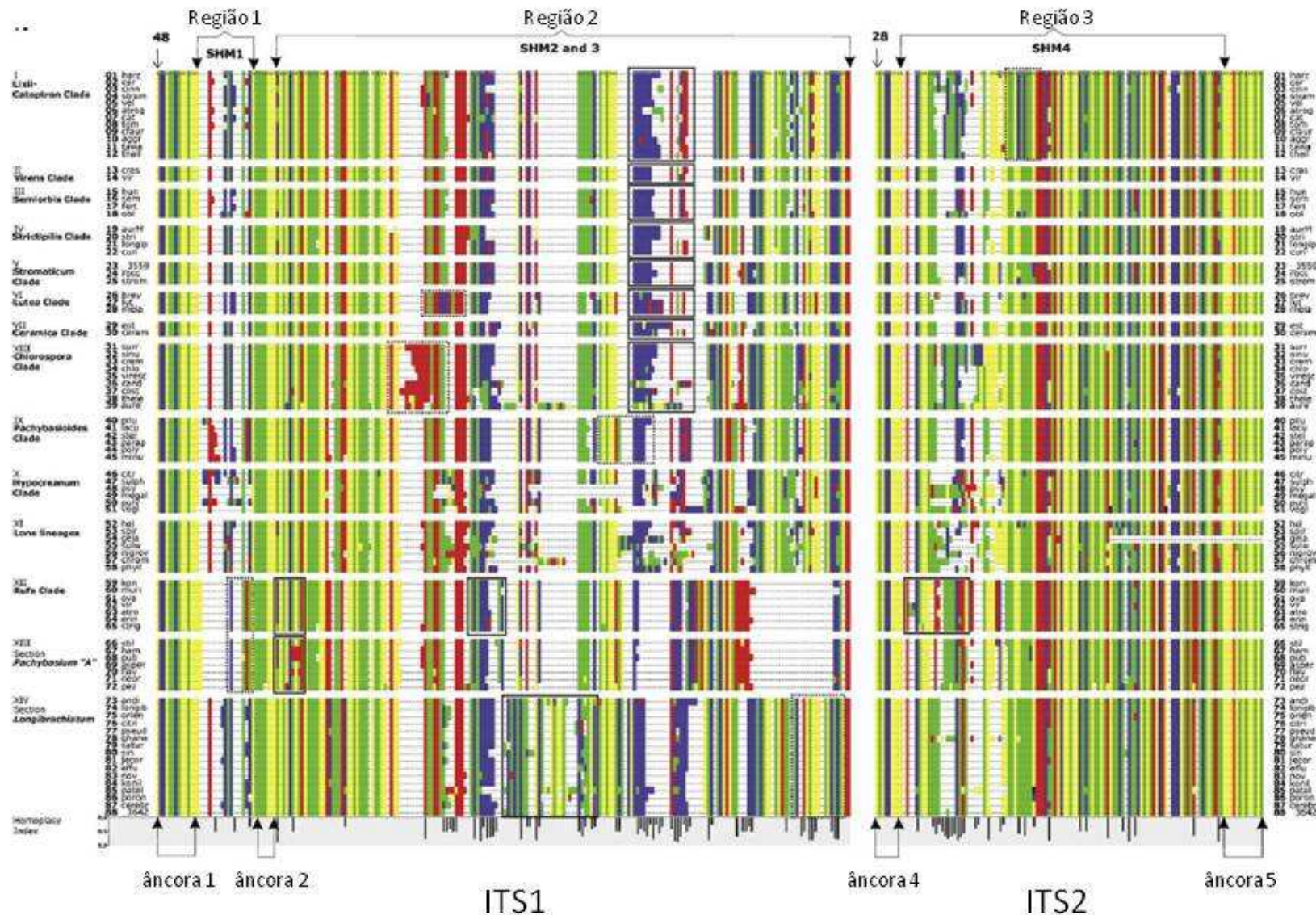


Fig. 1. Desenvolvimento de Oligonucleotídeo Barcode espécie-específico. Alinhamento de 88 tipos de linhagens de *Hypocrea* e *Trichoderma*. Nucleotídeos são mostrados em cores (A, vermelho; G, amarelo; T, azul; C, verde). Nome das espécies aparece abreviado. Retângulos sólidos mostram regiões utilizadas para a construção do oligonucleotídeo Barcode. Retângulos pontilhados mostram zonas clado-específicas. Âncoras 1, 2, 4 e 5 estão indicadas por setas. Âncora 3 está localizada dentro da sequência omitida do gene da subunidade 5.8S do RNA. O índice de homoplasia das regiões variáveis é dado por barras abaixo do alinhamento. A posição do primeiro nucleotídeo da âncora 1 (ITS1) e da âncora 4 (ITS2) é mostrado de acordo com a sequência de referência *H. jericona* AF510497. Colchetes indicam regiões 1, 2 e 3, que foram utilizadas para a busca de SHM1, SHM2-3 e SHM4, respectivamente. Adaptado de Druzhinina *et al.*, 2005.

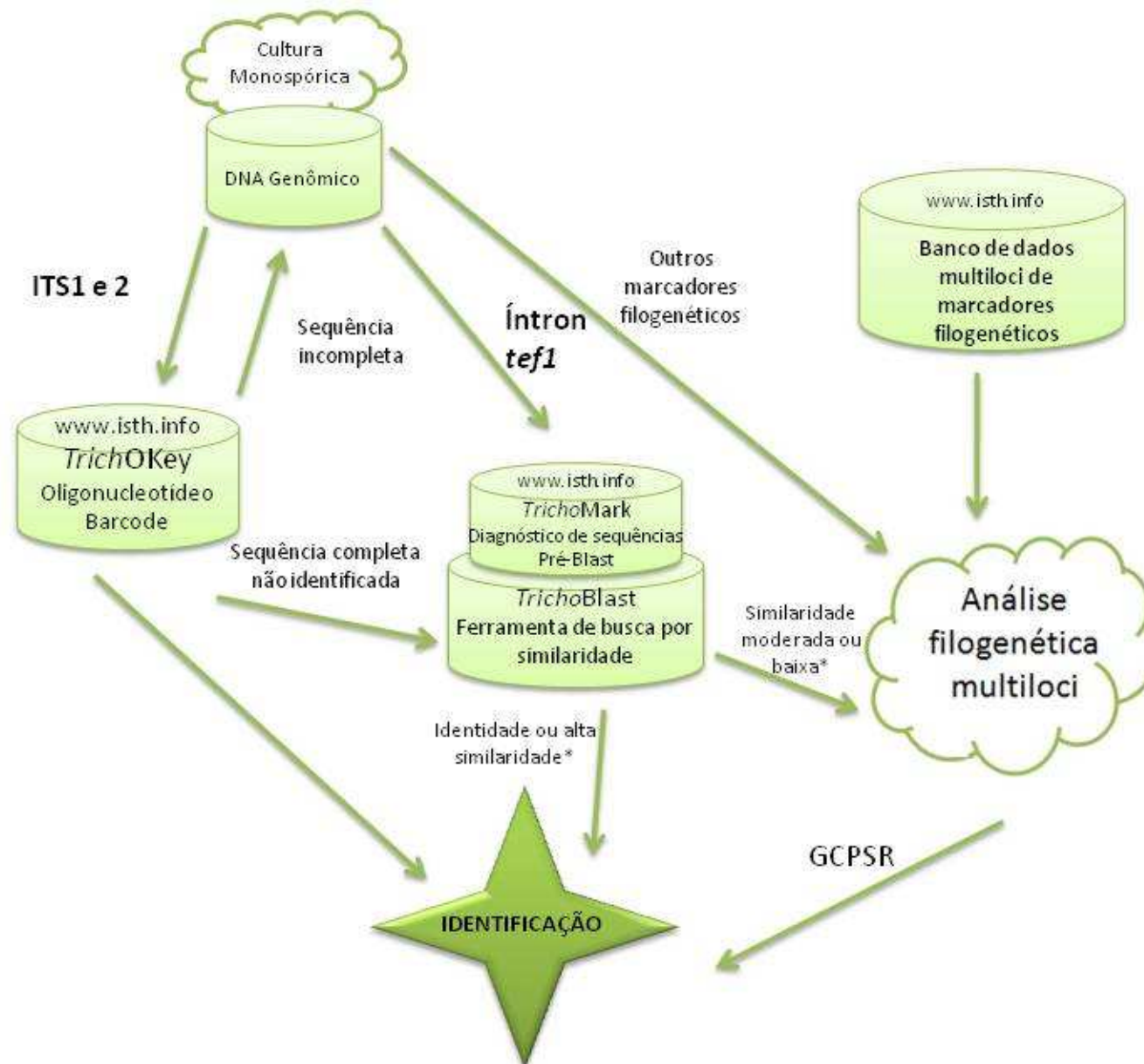


Fig. 2. Esquema demonstrando os passos na identificação molecular de espécies de *Hypocrea/Trichoderma*, usando ferramentas disponíveis no portal www.isth.info. O * indica o grau necessário de similaridade na identificação das espécies difere dependendo do locus empregado. Adaptado de Druzhinina *et al.*, 2006.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Identificar isolados do gênero *Trichoderma* a nível de espécie, utilizando somente ferramentas moleculares.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar a técnica de RAPD-PCR para remover linhagens duplicadas nos isolados coletados.
- Verificar o grau de variabilidade genética nos isolados.
- Identificar os isolados – a nível de espécie – utilizando como ferramenta a região ITS1 e 2, utilizada como oligonucleotídeo Barcode.
- Realizar análise filogenética dos isolados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MANUTENÇÃO E CULTIVO DE ISOLADOS DE *Trichoderma spp.*

247 isolados de *Trichoderma spp.*, coletados em diferentes regiões, áreas cultivadas e mata nativa no Brasil, foram gentilmente cedidos pela EMBRAPA – Arroz e Feijão – GO (Tabela 1) e mantidos em coleção no Laboratório de Enzimologia – UFG. Os isolados foram cultivados em meio MYG e uma solução de esporos foi feita, utilizando 50% de solução salina (NaCl 0,9%) e 50% de glicerol. Essa solução foi armazenada em freezer -80°C e foi usada para cultivos posteriores. Cada isolado foi cultivado separadamente em placa contendo meio MYG e após esporulação, foram transferidos para erlenmeyers de 125ml, contendo 50ml de meio MYG. Os isolados foram colados em shaker a 180 rpm por 48hrs. A solução foi filtrada e o micélio congelado, para posterior extração de DNA.

3.2. EXTRAÇÃO DE DNA E RAPD-PCR

O DNA foi isolado a partir de micélio congelado e liofilizado, de acordo com metodologia proposta por Raeder & Broda (1985), devidamente adaptada e acrescida de tampão CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*). Resumidamente, 0,5g de micélio liofilizado, acrescido de 500µl de tampão CTAB (2% de CTAB; 1,4M NaCl; 20mM EDTA; 100mM Tris-HCl, pH 8.0; 0,2% β-Mercaptoetanol (no momento do uso)), pré-aquecido à 65°C e incubado por 1 hora. Adicionar 1 volume de Clorofórmio-Álcool isoamílico (24:1) e levar ao vortex de forma suave para evitar quebras na molécula de DNA. Centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm. Transferir fase aquosa para um novo tubo e adicionar 0.6 volumes de isopropanol. Agitar por inversão e centrifugar por 20 minutos à 10.000 rpm. Descartar o sobrenadante e lavar o pellet com 1 ml de etanol 70% (gelado). Deixar secar e ressuspender em 200µl de TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH 8.0). Adicionar 1µl de RNase para cada 10µl de amostra e incubar em banho-maria à 37°C por 2 horas. O DNA extraído foi visualizado em gel de agarose à 0,8%. O DNA extraído foi quantificado e alíquotas com DNA à 5ng/µl foi utilizado na

reação de RAPD-PCR (10X PCR Buffer; 50mM MgCl₂; 2,5μM dNTP; 2,5 μM primer randômico; Taq DNA Polymerase Invitrogen®) , utilizando os primers OPX-1, OPX-3, OPX7 e OPX-13. A amplificação foi feita no termociclador modelo MG96+ Biosystems® programado com 5 min a 92°C, seguido de 39 ciclos de 40s a 92°C, 90s a 40°C e 2 min a 72°C, seguida de extensão final de 5 min a 72°C. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizado com brometo de etídio. O gel foi fotografado utilizando Molecular Imager Gel Doc XR+ e a captação do padrão de banda e a geração da matrix binária (1 para presença e 0 para ausência) foi feita utilizando o software Quantity One 1-D Analysis Software, ambos BioRad®.

3. 3. ANÁLISE DOS DADOS DE RAPD-PCR

A análise da matrix binária foi feita utilizando-se o programa NTSYS software, versão 2.10 (Applied Biostatistics Inc., Setauket, NY, USA). A matrix de similaridade foi gerada utilizando coeficiente de DICE (Nei & Li, 1979) e de concordância mínima. O valor do coeficiente de similaridade (F) foi calculado pela fórmula: $F = a / a + b + c$, onde a corresponde ao número de concordâncias positivas e, b e c correspondem ao número de discordâncias. Os dados da matriz de similaridade foram então utilizados pelo programa para a construção de um dendrograma pelo método UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method With Arithmetical Averages”). Análise da variância “AMOVA” foi feita utilizando o programa ARLEQUIN, versão 2.0. O teste de atribuição foi realizado pelo software STRUCTURE 2.2, um teste de atribuição. Este programa utiliza uma estratégia a qual identifica populações geneticamente homogêneas dentro de um grupo de organismos de origens geográficas distintas, assim, ele aloca organismos em K clusters, representados por cores diferentes, os quais possuem marcas com frequências distintas. O número de clusters foi definido de K=1 a K=20, conforme o número de cidades de onde os isolados foram coletados. Foram feitas 10 interações para cada K usando o modelo “admixture model” e frequências alélicas correlacionadas, utilizando um período de “burn-in” de 200.000 e 500.000 pelo algoritmo MCMC (Markov chain Monte Carlo). Esta estatística revela uma mudança na probabilidade do log, de acordo com o número de K proposto por Evano, Regnaut e Goudet (2005), ΔK , que foi usado como uma predição do número real de clusters.

Tabela 1. Lista de isolados e suas respectivas cidades de coleta utilizados neste trabalho.

Isolado	Cidade
45/01	Água Fria - Go
40/01	Água Fria - Go
40/02	Água Fria - Go
41/02	Água Fria - Go
57/01	Água Fria - Go
55/01	Água Fria - Go
55/03	Água Fria - Go
55/02	Água Fria - Go
44/02	Água Fria - Go
40/03	Água Fria - Go
447/01	Araguari - Mg
456/01	Araguari - Mg
453/02	Araguari - Mg
454/01	Araguari - Mg
454/02	Araguari - Mg
45T/01	Cidade Desconhecida
6T/01	Cidade Desconhecida
6T/01'	Cidade Desconhecida
6T/01"	Cidade Desconhecida
5T/01	Cidade Desconhecida
551/02	Cidade Desconhecida
100T/01	Cidade Desconhecida
247/01	Cidade Desconhecida
21/02	Dueré - To
26/04	Dueré - To
26/05	Dueré - To
27/04	Dueré - To
21/02	Dueré - To
26/02	Dueré - To
25/02	Dueré - To
21/01	Dueré - To
26/06	Dueré - To
26/03	Dueré - To
28/11	Dueré - To
28/06	Dueré - To
476/01	Formosa - Go
476/02	Formosa - Go

495/01	Formosa - Go
495/01	Formosa - Go
489/02	Formosa - Go
491/02	Formosa - Go
482/01	Formosa - Go
468/02	Formosa - Go
483/02	Formosa - Go
492/02	Formosa - Go
494/01	Formosa - Go
486/01	Formosa - Go
479/02	Formosa - Go
479/02	Formosa - Go
490/01	Formosa - Go
475/01	Formosa - Go
480/01	Formosa - Go
475/02	Formosa - Go
485/01	Formosa - Go
480/02	Formosa - Go
488/02	Formosa - Go
487/02	Formosa - Go
484/01	Formosa - Go
483/01	Formosa - Go
484/01	Formosa - Go
481/01	Formosa - Go
481/02	Formosa - Go
490/02	Formosa - Go
489/01	Formosa - Go
567/01	Formoso - To
616/02	Formoso - To
616/04	Formoso - To
617/01	Formoso - To
616/01	Formoso - To
323/02	Holambra - Sp
328/01	Holambra - Sp
320/02	Holambra - Sp
333/01	Holambra - Sp
TN/02	Holambra - Sp
TN/01	Holambra - Sp
SB/02	Holambra - Sp
301/01	Holambra - Sp
336/02	Inconfidente - Mg
333/02	Inconfidentes - Mg

332/01	Inconfidentes - Mg
348/01	Inconfidentes - Mg
346/01	Inconfidentes - Mg
346/02	Inconfidentes - Mg
331/02	Inconfidentes - Mg
326/01	Inconfidentes - Mg
352/01	Inconfidentes - Mg
337/01	Inconfidentes - Mg
326/02	Inconfidentes - Mg
339/01	Inconfidentes - Mg
336/01	Inconfidentes - Mg
337/02	Inconfidentes - Mg
325/01	Inconfidentes - Mg
349/02	Inconfidentes - Mg
353/02	Inconfidentes - Mg
353/01	Inconfidentes - Mg
330/01	Inconfidentes - Mg
348/01	Inconfidentes - Mg
348/01	Inconfidentes - Mg
339/02	Inconfidentes - Mg
327/02	Inconfidentes - Mg
400/02	Iraí - To
400/01	Iraí - To
397/01	Iraí - To
401/02	Iraí - To
398/01	Iraí - To
398/02	Iraí - To
395/01	Montes Claros De Goiás - Go
395/02	Montes Claros De Goiás - Go
396/01	Montes Claros De Goiás - Go
04/10	Mucugê E Ibicoara - BA
11/11	Mucugê E Ibicoara - BA
04/02	Mucugê E Ibicoara - BA
04/04	Mucugê E Ibicoara - BA
05/01	Mucugê E Ibicoara - BA
04/10	Mucugê E Ibicoara - BA
09/01	Mucugê E Ibicoara - BA
04/08	Mucugê E Ibicoara - BA
04/07	Mucugê E Ibicoara - BA
04/01	Mucugê E Ibicoara - BA
05/09	Mucugê E Ibicoara - BA
05/05	Mucugê E Ibicoara - BA

05/05	Mucugê E Ibicoara - BA
05/03	Mucugê E Ibicoara - BA
05/07	Mucugê E Ibicoara - BA
05/04	Mucugê E Ibicoara - BA
08/03	Mucugê E Ibicoara - BA
08/05	Mucugê E Ibicoara - BA
06/08	Mucugê E Ibicoara - BA
03/05	Mucugê E Ibicoara - BA
11/06	Mucugê E Ibicoara - BA
02/01	Mucugê E Ibicoara - BA
03/04	Mucugê E Ibicoara - BA
03/03	Mucugê E Ibicoara - BA
11/09	Mucugê E Ibicoara - BA
03/07	Mucugê E Ibicoara - BA
03/04	Mucugê E Ibicoara - BA
06/05	Mucugê E Ibicoara - BA
08/06	Mucugê E Ibicoara - BA
08/02	Mucugê E Ibicoara - BA
05/08	Mucugê E Ibicoara - BA
06/01	Mucugê E Ibicoara - BA
03/02	Mucugê E Ibicoara - BA
03/06	Mucugê E Ibicoara - BA
04/03	Mucugê E Ibicoara - BA
04/01	Mucugê E Ibicoara - BA
02/03	Mucugê E Ibicoara - BA
02/04	Mucugê E Ibicoara - BA
04/09	Mucugê E Ibicoara - BA
11/04	Mucugê E Ibicoara - BA
08/04	Mucugê E Ibicoara - BA
02/05	Mucugê E Ibicoara - BA
04/03	Mucugê E Ibicoara - BA
06/04	Mucugê E Ibicoara - BA
06/03	Mucugê E Ibicoara - BA
06/02	Mucugê E Ibicoara - BA
11/08	Mucugê E Ibicoara - BA
11/02	Mucugê E Ibicoara - BA
418/01	Pad - DF
418/02	Pad - DF
419/02	Paracatu E Iraí - Mg
420/01	Paracatu E Iraí - Mg
421/01	Paracatu E Iraí - Mg
421/02	Paracatu E Iraí - Mg

15/06	Patos De Minas - Mg
15/05	Patos De Minas - Mg
12/12	Patos De Minas - Mg
12/06	Patos De Minas - Mg
12/09	Patos De Minas - Mg
12/04	Patos De Minas - Mg
13/19	Patos De Minas - Mg
12/14	Patos De Minas - Mg
13/03	Patos De Minas - Mg
13/07	Patos De Minas - Mg
15/09	Patos De Minas - Mg
13/09	Patos De Minas - Mg
13/11	Patos De Minas - Mg
15/05	Patos De Minas - Mg
87/01	Patos De Minas - Mg
46/05	Rio Verde - Go
50/03	Rio Verde - Go
47/01	Rio Verde - Go
48/02	Rio Verde - Go
48/01	Rio Verde - Go
34T/01	Santo Antônio De Goiás - Go
40T/03	Santo Antônio De Goiás - Go
97/01	Santo Antônio De Goiás - Go
356/02	Santo Antônio De Goiás - Go
360/01	Santo Antônio De Goiás - Go
359/01	Santo Antônio De Goiás - Go
429/02	Santo Antônio De Goiás - Go
247/01	Santo Antônio De Goiás - Go
364/01	Santo Antônio De Goiás - Go
34T/02	Santo Antônio De Goiás - Go
357/01	Santo Antônio De Goiás - Go
1L/01	Santo Antônio De Goiás - Go
32T/02	Santo Antônio De Goiás - Go
362/02	Santo Antônio De Goiás - Go
362/01	Santo Antônio De Goiás - Go
10T/03	Santo Antônio De Goiás - Go
355/01	Santo Antônio De Goiás - Go
430/01	Santo Antônio De Goiás - Go
364/02	Santo Antônio De Goiás - Go
75/01	Santo Antônio De Goiás - Go
05/02	Santo Antônio De Goiás - Go
19/08	Santo Antônio De Goiás - Go

52T/01	Santo Antônio De Goiás - Go
52T/01	Santo Antônio De Goiás - Go
11T/01	Santo Antônio De Goiás - Go
11T/02	Santo Antônio De Goiás - Go
17/07	Santo Antônio De Goiás - Go
248/01	Santo Antônio De Goiás - Go
364/01	Santo Antônio De Goiás - Go
360/01	Santo Antônio De Goiás - Go
15T/01	Santo Antônio De Goiás - Go
359/02	Santo Antônio De Goiás - Go
75/02	Santo Antônio De Goiás - Go
19/07	Santo Antônio De Goiás - Go
47T/01	Santo Antônio De Goiás - Go
17/06	Santo Antônio De Goiás - Go
19/03	Santo Antônio De Goiás - Go
18/03	Santo Antônio De Goiás - Go
20/02	Santo Antônio De Goiás - Go
3T/02	Santo Antônio De Goiás - Go
28T/02	Santo Antônio De Goiás - Go
75/02	Santo Antônio De Goiás - Go
356/01	Santo Antônio De Goiás - Go
18/05	Santo Antônio De Goiás - Go
18/11	Santo Antônio De Goiás - Go
287/02	Sorocaba - Sp
285/02	Sorocaba - Sp
285/01	Sorocaba - Sp
287/01	Sorocaba - Sp
29/05	Taquarituba - SP
29/04	Taquarituba - SP
29/12	Taquarituba - SP
29/11	Taquarituba - SP
29/02	Taquarituba - SP
29/15	Taquarituba - SP
29/15	Taquarituba - SP
29/11	Taquarituba - SP
29/12	Taquarituba - SP
333/01	Trichoderma Comercial
328/02	Trichoderma Comercial
330/02	Trichoderma Comercial
330/02	Trichoderma Comercial
498/02	Uberlândia - MG
498/02	Uberlândia - MG

3.4. AMPLIFICAÇÃO DO rDNA

A região do rDNA nuclear, contendo ITS1 e 2 e o gene da subunidade 5.8S do rRNA, foi amplificada usando a combinação de primers SR6R e LR1, seguindo protocolo descrito por White et al., 1990, em termociclador modelo MG96+ Biosystems[®], usando os seguintes parâmetros: 1min de desnaturação inicial a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 min de desnaturação a 94°C, 1 min de anelamento a 50°C, 90s de extensão a 74°C e um período de extensão final de 7 min a 74°C. Após amplificação, o produto de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e fotografado utilizando Molecular Imager Gel Doc XR+ da BioRad[®], para confirmação da amplificação e posteriormente purificado utilizando protocolo baseado em PEG (Polietileno glicol) – PEG 20%, NaCl 2,5M, etanol 80% e etanol absoluto – o produto da purificação foi utilizado para reação de sequenciamento utilizando DYEnamic[™] ET Terminator Cycle Sequencing KIT da GE Healthcare[®], de acordo com as instruções do fabricante e sequenciado utilizando sequenciador capilar ABI 3730 XL[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA).

3.5. ANÁLISE DOS DADOS DO rDNA

As sequências de DNA obtidas foram alinhadas utilizando o software para alinhamentos múltiplos ClustalX. As regiões terminais com alinhamento ruim foram removidas manualmente e as porções alinhadas foram unidas. As sequências alinhadas foram usadas para a construção da árvore filogenética usando o método de neighbour-joining (NJ), o modelo de distancia Kimura-2-parameter e “pairwise deletions” na opção relacionada aos gaps. A árvore foi gerada utilizando o programa PAUP4b10 e visualizada no programa TreeView.

3.6. IDENTIFICAÇÕES

A identificação inicial foi feita utilizando o programa de identificação ITS oligonucleotídeo barcode, *TrichOKey* versão 2.0 (www.isth.info), quando não foi possível a identificação foi utilizado o BLAST e a espécie considerada foi aquela cujo valor *E-value* era menor e cuja identidade maior.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. RAPD-PCR

Do total de 247 isolados de *Trichoderma spp.*, gentilmente cedidos pela EMBRAPA Arroz e feijão para identificação, 99 foram escolhidos para a realização da análise prévia, utilizando marcadores RAPD (Tabela 2). Essa análise foi realizada no laboratório Genoma – Universidade Estadual de Londrina e contou com a avaliação de três primers decaméricos, OPX1, OPX13 e OPX3, baseados na sua capacidade de revelar polimorfismos gerados por produtos de reação que variaram de 250 bp para mais de 1600bp. O número máximo de bandas foi produzido pelo primer OPX1 e o mínimo pelo primer OPX3. Um total de 59 fragmentos amplificados pelos 99 isolados de *Trichoderma spp.* foram utilizados para estimar a relação genética dentro das espécies. O dendograma produzido através do método de UPGMA é mostrado na fig.3. Um grau relativamente alto de variabilidade foi observado entre os isolados, pois a partir da observação do dendograma não é possível estabelecer grupos distintos. O dendograma utilizado apesar de importante para a observação da variabilidade entre os isolados necessita de mais análises, como bootstrap e correlação cofenética, para tornar os dados obtidos mais significativos.

A partir dos dados moleculares que são obtidos em estudos sobre diversidade genética de populações ou grupos de organismos, é possível também, utilizando a variância genética molecular total, fazer uma estimativa dos componentes da variância, segundo as causas da sua variação, previstas de acordo com o interesse do pesquisador. A análise molecular da variância (AMOVA) analisa o grau de diversidade genética com base nos locos marcadores escolhidos para o estudo, a partir de distâncias quadráticas, utilizando a distância Euclidiana métrica de Excoffier, Smouse e Quattro (1992).

AMOVA foi realizada para estimar os componentes da variância entre as regiões cultivadas de onde os isolados foram coletados e entre as cidades das áreas de cultivo. A tabela 3 mostra o resultado da AMOVA quando utilizada as regiões de cultivo como componente da variância. A variação observada foi muito maior dentro das áreas cultivadas do que entre elas demonstrando que essa variação é grande entre espécies e

até mesmo entre indivíduos da mesma espécie. Sharma *et al.*, (2009) utilizando marcadores do tipo RAPD também conseguiu observar essa grande variação existente

Tabela 2. Lista de 99 isolados, cidades e regiões de cultivo utilizados na análise prévia feita em Londrina – PR.

Isolados	Localidade	Cultivar
332/01	Inconfidentes-MG	morango
333/02	Inconfidentes-MG	morango
336/01	Inconfidentes-MG	morango
337/01	Inconfidentes-MG	morango
337/02	Inconfidentes-MG	morango
339/01	Inconfidentes-MG	morango
346/02	Inconfidentes-MG	morango
352/01	Inconfidentes-MG	morango
362/02	Santo Antônio de Goiás - GO	Feijão
04/01	Mucugê e Ibicoara - BA	Batata
04/03	Mucugê e Ibicoara - BA	Batata
05/01	Mucugê e Ibicoara - BA	Feijão
1L/01	Santo Antônio de Goiás - GO	Milheto + Brachiaria
320/02	Holambra-SP	Begônia
325/01	Inconfidentes-MG	morango
32T/02	Santo Antônio de Goiás - GO	Soja + Brachiaria
330/01	Inconfidentes-MG	morango
331/02	Inconfidentes-MG	morango
349/02	Inconfidentes-MG	morango
34T/02	Santo Antônio de Goiás - GO	Soja + Milheto
353/01	Inconfidentes-MG	morango
353/02	Inconfidentes-MG	morango
355/01	Santo Antônio de Goiás - GO	Feijão
356/01	Santo Antônio de Goiás - GO	Feijão
357/01	Santo Antônio de Goiás - GO	Feijão
339/02	Inconfidentes-MG	morango
346/01	Inconfidentes-MG	morango
05/02	Santo Antônio de Goiás - GO	Milheto + Brachiaria
05/03	Mucugê e Ibicoara - BA	Feijão
05/08	Mucugê e Ibicoara - BA	Feijão
11T/01	Santo Antônio de Goiás - GO	Milho+Milheto
11T/02	Santo Antônio de Goiás - GO	Milho+Milheto
13/09	Patos de Minas - MG	Tomate
13/11	Patos de Minas - MG	Tomate
13/19	Patos de Minas - MG	Tomate
21/02	Dueré - TO	Pousio
26/04	Dueré - TO	Milheto + Brachiaria brizantha

26/05	Dueré - TO	Milheto + Brachiaria brizantha
27/04	Dueré - TO	Milheto + Brachiaria decumbens
327/02	Inconfidentes-MG	morango
348/01	Inconfidentes-MG	morango
75/01	Santo Antônio de Goiás - GO	Arroz + Brachiaria
15T/01	Santo Antônio de Goiás - GO	Milho+Milheto
359/02	Santo Antônio de Goiás - GO	Feijão
360/01	Santo Antônio de Goiás - GO	Feijão
40/03	Água Fria - GO	Feijão
41/02	Água Fria - GO	Feijão
364/01	Santo Antônio de Goiás - GO	morango
SB/02	Holambra-SP	Turfa Mista
326/01	Inconfidentes-MG	Feijão
362/01	Santo Antônio de Goiás - GO	morango
29/11	Taquarituba - SP	Feijão
29/12	Taquarituba - SP	Feijão
45/01	Água Fria - GO	Soja
45/02	Água Fria - GO	Soja
481/02	Formosa-GO	Feijão
490/02	Formosa-GO	Feijão
29/15	Taquarituba - SP	Feijão
15/09	Patos de Minas - MG	Tomate
75/02	Santo Antônio de Goiás - GO	Arroz + Brachiaria
28/11	Dueré - TO	Vegetação Nativa
28T/02	Santo Antônio de Goiás - GO	Soja + Brachiaria
55/02	Água Fria - GO	morango
55/03	Água Fria - GO	morango
52T/01	Santo Antônio de Goiás - GO	Sorgo + Brachiaria
02/03	Mucugê e Ibicoara - BA	Batata
17/07	Santo Antônio de Goiás - GO	Feijão
10T/03	Santo Antônio de Goiás - GO	Feijão
11/04	Mucugê e Ibicoara - BA	Feijão
13/03	Patos de Minas - MG	Tomate
13/07	Patos de Minas - MG	Tomate
TN/01	Holambra-SP	Turfa Nacional
TN/02	Holambra-SP	Turfa Nacional
400/02	Iraí-MG	Feijão
483/02	Formosa-GO	Feijão
CxL	Formosa-GO	Feijão
17/06	Santo Antônio de Goiás - GO	Feijão
44/02	Água Fria - GO	Soja
19/03	Santo Antônio de Goiás - GO	Banana

12/09	Patos de Minas - MG	Tomate
46/05	Rio Verde - GO	Soja
18/11	Santo Antônio de Goiás - GO	Cobertura verde com café
398/01	Iraí-MG	Feijão
03/06	Mucugê e Ibicoara - BA	Batata
18/05	Santo Antônio de Goiás - GO	Cobertura verde com café
02/05	Mucugê e Ibicoara - BA	Batata
06/01	Mucugê e Ibicoara - BA	Feijão
57/01	Água Fria - GO	morango
3T/02	Santo Antônio de Goiás - GO	Milheto + Brachiaria
19/07 (?)	Santo Antônio de Goiás - GO	Banana
479/02	Formosa-GO	Feijão
15/05	Patos de Minas - MG	Tomate
55/01	Água Fria - GO	morango
19/08	Santo Antônio de Goiás - GO	Banana
48/01	Rio Verde - GO	Soja
47T/01	Santo Antônio de Goiás - GO	Soja + Feijão
301/01	Holambra-SP	Turfa Importada
323/02	Holambra-SP	Begônia
326/02	Inconfidentes-MG	morango

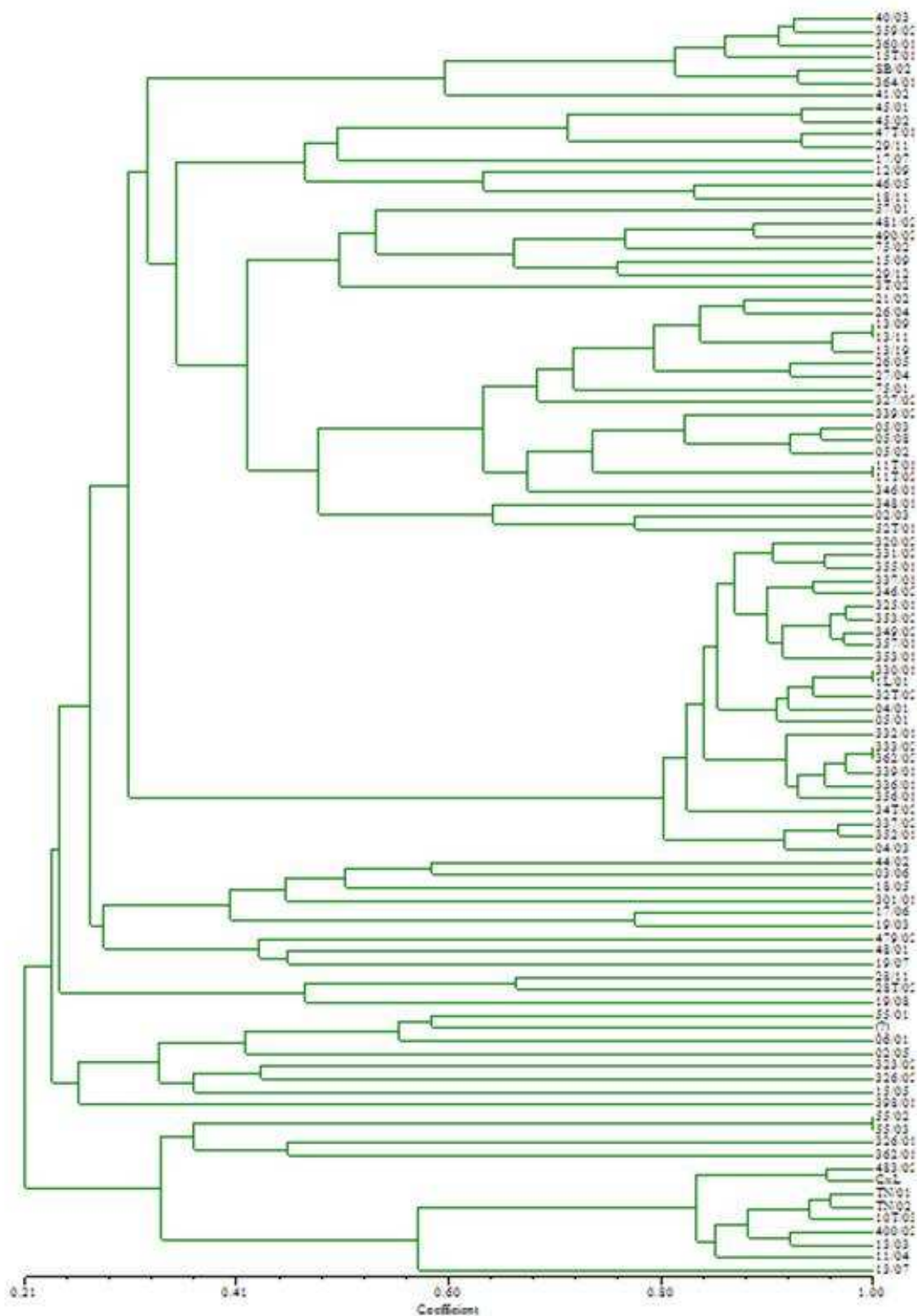


Fig. 3. Relação genética entre os 99 isolados de *Trichoderma* spp.. Dendograma construído pelo método UPGMA baseado no índice de similaridade DICE.

dentro das populações de isolados de mesma espécie em *T. harzianum*. Seu objetivo era determinar a estrutura de populações de espécies de *T. harzianum* isolados de diferentes regiões da Índia. Quando a localidade das áreas cultivadas foram utilizadas como componente da variância, uma maior variabilidade também foi encontrada dentro das cidades do que entre elas (Tabela 4). Levando em consideração de que não foi possível estabelecer grupos de isolados distintos que pudessem reduzir o número de isolados para análises posteriores, foi realizado um teste de atribuição, pelo programa Structure 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000).

Tabela 3. AMOVA realizada com 99 isolados de *Trichoderma spp.* utilizando áreas cultivadas dentro da localidade como fonte de variação. Em vermelho a porcentagem da variação observada.

Método de Distância: Diferenças par a par

Fonte de Variação	d.f.	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre Populações	21	234.576	0.73110 Va	8.13
Dentro das Populações	77	636.071	8.26066 Vb	91.87
Total	98	870.646	8.99175	

Índice de fixação F_{ST} : 0.08131

O programa utiliza uma estratégia que identifica populações geneticamente homogêneas dentro de um grupo de organismos de origens geográficas distintas, alocando esses organismos em K clusters, que são representados por cores diferentes e que possuem marcas com frequências distintas. Cada cluster pode ser considerado uma população onde os organismos estão agrupados de acordo com a sua similaridade, podendo, portanto, serem considerados como possíveis espécies. Utilizando essa estratégia na análise inicial realizada em Londrina – PR, foi avaliado a estruturação das populações de acordo com a região de cultivo de onde foram isolados as linhagens utilizadas. Cada região cultivada foi considerada como um K totalizando 22 (ver figura 4).

O valor mais adequado de K, segundo a análise, foi de $K = 8$, conforme o modelo proposto por Evano, Regnaut e Goudet (2005), ou seja, os dados foram atribuídos em 8 clusters genotípicos, cada um representado por uma cor diferente (fig.4). Um cluster corresponde a um conjunto de isolados que são genotipicamente

similares, como se tivesse sido gerado por uma análise de agrupamento (fig. 3). A coordenada Y, no gráfico da figura 4, mostra o coeficiente de participação do isolado (Q) em determinado cluster. A maioria dos clusters formados se mostraram homogêneos, somente os clusters 5, 8 e alguns indivíduos do cluster 1 se mostraram heterogêneos. O grau de similaridade de cada cluster pode indicar que poderiam existir nesses locais 8 espécies diferentes de *Trichoderma*. O fato de cada cluster ser formado por isolados de áreas diferentes de cultivo reforça a hipótese de que cada cluster possa corresponder a espécies diferentes.

Tabela 4. AMOVA realizada com 99 isolados de *Trichoderma spp.* utilizando a localização (cidades) da área cultivada como fonte de variação. Em vermelho a porcentagem da variação observada.

Método de Distância: Diferenças par a par

Fonte de Variação	d.f.	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre Populações	10	162.396	0.98751 Va	10.93
Dentro das Populações	88	708.250	8.04830 Vb	89.07
Total	98	870.646	9.03581	

Índice de fixação F_{ST} : 0.10929

Em vista dos resultados preliminares positivos obtidos a partir desses 99 isolados, decidiu-se ampliar o número amostral para 247 isolados. Todos os resultados permaneceram inalterados, com exceção daqueles obtidos utilizando programa Structure 2.2. Não foi possível estabelecer grupos de isolados a partir do dendograma formado, mas a alta variabilidade vista nos resultados anteriores manteve-se.

Dados de AMOVA permaneceram constantes com uma discreta alteração na porcentagem da variação observada, sendo a maior variação ainda aquela obtida dentro das populações observadas. Não foi possível estabelecer K clusters utilizando o programa Structure nessa nova amostragem.

O programa structure é muito utilizado para análise de estrutura de populações de besouro e bactéria (Egan *et al.*, 2008; Munhoz, 2009), não foi possível, porém, encontrar na literatura nenhum trabalho relacionado a fungos que pudesse ajudar a explicar o porque de tal resultado. Uma hipótese seria o fato de que, ao ampliar o número de isolados, genótipos diplóides fossem encontrados o que poderia interferir no

padrão de bandas alterando o resultado. Existem poucas formas sexuadas (diplóides) de *Trichoderma* descritas e essas formas são raramente encontradas na natureza, mas não é impossível. Além disso trabalhos recentes vêm demonstrando que existem formas diplóides de *T. harzianum* (Sharma *et al.*, 2009). Essa mistura de genótipos e erros durante a captação de bandas, fato que pode acontecer quando se trabalha com grande número de isolados, podem ter levado a erros que impossibilitaram a obtenção do número real de clusters.

A grande variação entre isolados do gênero *Trichoderma* é desconhecida, mas isolados haplóides e diplóides são heterotáticos, possuem um número de cromossomos variáveis e tem a capacidade de trocar material genético mesmo entre isolados de espécies diferentes e entre células de um mesmo organismo (Goldman *et al.*, 1998). Outro fenômeno que acontece em indivíduos do gênero *Trichoderma* é a parassexualidade (Harman *et al.*, 1998). Todas essas características podem explicar a grande variação existente nesse gênero incluindo aí a dificuldade de se definir a taxonomia.

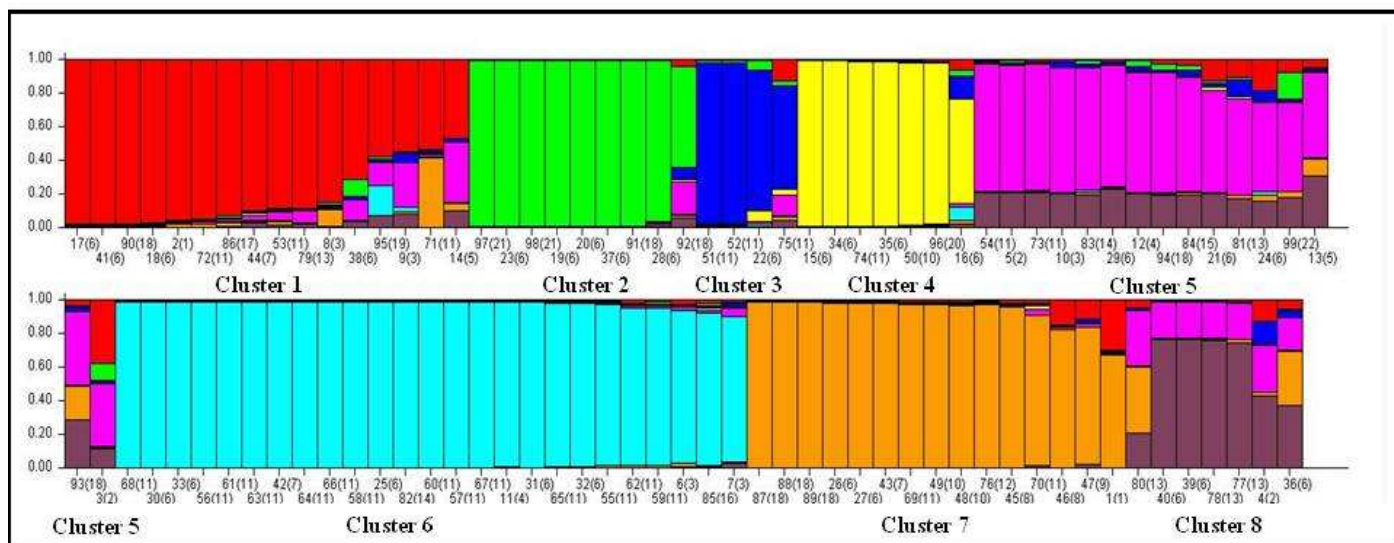


Fig. 4 – Teste de atribuição realizado pelo o *software Structure 2.2*. Cada barra vertical representa um isolado e cada cor representa um *cluster*. A coordenada Y mostra o coeficiente de participação (Q) de um isolado no *cluster*. Os números de 1 a 99 correspondem aos isolados. Os números mostrados entre parênteses correspondem às áreas cultivadas. Arroz+brachiaria (1), Banana (2), Batata (3), Begônia (4), Cobertura verde com café (5), Feijão (6), Milheto + Brachiaria (7), Milheto + Brachiaria brizantha (8), Milheto + Brachiaria decumbens (9), Milho+Milheto (10), Morango (11), Pousio (12), Soja (13), Soja + Brachiaria (14), Soja + Feijão (15), Soja + Milheto (16), Sorgo + Brachiaria (17), Tomate (18), Turfa Importada (19), Turfa Mista (20), Turfa Nacional (21) e Mata Nativa (22).

Análise baseada em RAPD-PCR é muito eficiente para se observar a variabilidade nesses organismos e para identificar marcadores para identificação de espécies específicas e de bons produtores de enzimas, antibióticos e antagonistas, mas utilizar a técnica para reduzir o número de indivíduos em levantamentos que envolvam

uma quantidade muito grande do organismos pode ser problemático. A escolha do marcador a ser usado, por exemplo, pode levar a um padrão de bandas claras e de fácil interpretação enquanto que outra são ambíguas. Outro problema a ser considerado trata de equipamentos, como cubas para eletroforese, que consigam comportar a corrida de um grande número de amostras para minimizar erros no padrão do deslocamento de bandas obtidas de géis diferentes. Durante a revisão da literatura somente uma trabalho que utiliza da técnica de RAPD-PCR no screening de isolados foi encontrada (Fujimori & Okuda, 1994). Todos os outros trabalhos tratam somente da avaliação do grau de variabilidade existente entre esses isolados principalmente entre indivíduos da mesma espécie (Sharma *et al.*, 2009; Chaverri, 2003).

4.2. AMPLIFICAÇÃO, ANÁLISE FILOGENÉTICA DO DNA RIBOSSÔMICO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS UTILIZANDO DNA BARCODE

Um total de 247 isolados de *Trichoderma spp.* foram utilizados para a análise da região espaçadora transcrita interna (ITS). A região ITS foi utilizada para a identificação dos isolados utilizando a ferramenta *TrichOKey* (www.isth.info). A amplificação por PCR gerou produtos variando em torno de 328bp a 791bp. A identificação utilizando o *TrichOKey* só foi possível em apenas sete delas (Tabela X). Em todas as outras foi acusado falta de regiões importantes denominadas âncoras para a identificação (Fig.1).

A identificação utilizando motivos localizados na sequência ITS1 – 5.8S rRNA – ITS2 oferece a vantagem de ter sido desenvolvida por taxonomistas especializados em *Trichoderma/Hypocrea*, com a intenção de facilitar o trabalho daqueles que não possuem conhecimento suficiente para realizar a identificação correta desses indivíduos evitando assim o depósito de sequências em bancos de dados públicos de isolados identificados de forma incorreta.

A sequência Barcode baseada na região ITS, criada por Druzhinina *et al.*, (2005), oferece como vantagem a identificação absoluta desses isolados, visto que em seu banco de dados somente sequências corretamente identificadas são depositadas. Outra facilidade importante é o fato de que é possível identificar cerca de 95% das espécies conhecidas de *Trichoderma/Hypocrea* e ainda discriminar novas espécies.

Infelizmente, para que seja possível proceder com a identificação, o sequenciamento deve ser de alta qualidade, qualquer artefato da técnica ou erro de sequenciamento impossibilita a identificação. A amplificação da sequência ITS1 – 5.8S rRNA – ITS2 também deve ser completa. A ausência de qualquer parte dessas regiões também impossibilita a identificação. O barcode também não consegue discriminar isolados entre os complexos *koningii* e *rufa* e não distingue entre *T. longibrachiatum* – *H. orientalis* e *T. tomentosum* e *T. cerinum*.

O resultado obtido durante a identificação inicial demonstra que é necessário realizar a padronização das reações de sequenciamento para garantir a qualidade das sequências e a amplificação de toda a região necessária. O passo seguinte foi submeter as sequências ao banco de dados BLAST. Para escolher a espécie referente à sequência submetida, levou-se em conta não somente o menor *E*-value observado, mas também o grau de identidade das sequências e a existência de sequências identificadas como sendo de uma espécie diferente daquele cujo *E*-value foi menor. Somente uma sequência não pode ser identificada utilizando o BLAST.

Essa sequência denominada “desconhecida”, foi submetida também ao *Tricho*BLAST e o resultado permaneceu o mesmo. Após a identificação, todas as sequências foram submetidas ao alinhamento utilizando-se o programa ClustalX2. Devido a problemas observados na etapa de sequenciamento, somente a sequência da região ITS1 e 5.8S do rRNA completa e parte da região ITS2 foram utilizadas para a análise filogenética. Outro problema observado foi a formação de três blocos distintos durante o alinhamento. Esses blocos não apresentaram regiões alinhadas entre si, assim sendo, o bloco dois que possuía o maior número de isolados (198) e que parecia ter o alinhamento mais homogêneo foi utilizado para a análise filogenética e para submissão de sequências no BLAST (Tabela 6).

A árvore gerada pelo método de Neighbour-joining usando o modelo de distância Kimura-2-parameter (Fig. 5) mostrou que muitos dos isolados podem ter sido identificados de modo incorreto pelo BLAST. Essa análise colocou em um mesmo ramo isolados de seções diferentes, o que indica erro de identificação. Isolados identificados como *T. viride*, *T. atroviride*, *T. koningii*, *T. asperellum* e *T. hamatum*, que pertencem a seção *Trichoderma*, foram agrupados junto com isolados de *T. virens*, *T. harzianum*, *T. tomentosum* e *T. inhamatum* que pertencem a seção *Pachybasium*. Outros ramos, mesmo sem o suporte de valores de bootstrap maiores que 50%, como nível de confiança

dos nós demonstraram a junção de espécies que pertencem a seções diferentes e portanto não poderiam ser agrupadas no mesmo nó filogenético (*T. atroviride* e *T. virens*).

Todos os isolados identificados com *T. ghanense*, foram alocados em um mesmo ramo e dois deles formaram um nó suportado por um valor de bootstrap de 97% o que indica a correspondência da espécie. A espécie “desconhecida” foi agrupada junto com os isolados identificados como *T. ghanense*. O valor de bootstrap que suporta esse nó foi menor que 70%. O mesmo ocorreu com isolados de *T. brevicompactum*.

Vários ramos ligando isolados de *T. harzianum*, *T. tomentosum* e *T. inhamatum*, com valores de bootstrap variando de 70 a 90% indicam a possível identificação correta desses isolados devido ao alto valor de confiança desses nós e a coincidência dos isolados na seção *Pachybasium*. Outra observação que se mostrou de acordo com a literatura foi a identificação de ramificações dentro de grupos de isolados identificados com *T. harzianum*, demonstrando ser este um complexo de linhagens monofiléticas independentes (Chaverri *et al.*, 2003). Alguns ramos suportados por valores de bootstrap maiores que 50% demonstraram também o agrupamento de isolados da seção *Trichoderma* (*T. asperellum*, *T. hamatum*, *T. atroviride*, *T. gamsii* e *T. viride*). Isolados identificados como *T. erinaceum* não se agruparam e quando alocados com outras espécies, esses nós não foram suportados por valores de bootstrap maiores que 50%. Esses dados confirmam dados obtidos na literatura de que existem muitas espécies de *Trichoderma* incorretamente identificadas no banco de dados público BLAST.

Tabela 6. Isolados utilizados para a análise filogenética e identificação utilizando o BLAST. Além do menor *E*-value, foi considerado a porcentagem de identidade entre as sequências e a existência de espécies diferentes daquelas cujo valor *E*-value foi menor. Isolados foram selecionados de acordo com o alinhamento.

Isolado	Espécie sugerida (Blast - NCBI)	Nº de acesso GeneBank	<i>E</i> -Value
06-05F	<i>Trichoderma ghanense</i>	EU280100.1	3e-169
12-14F	<i>Trichoderma ghanense</i>	EU280100.1	1e-173
11-02F	<i>Trichoderma ghanense</i>	EU280100.1	3e-130
11-08F	<i>Trichoderma ghanense</i>	EF442075.1	3e-140
395-01F	<i>Trichoderma brevicompactum</i>	FJ610290.1	6e-172
396-01F	<i>Trichoderma brevicompactum</i>	FJ610290.1	8e-156
364-02F	Desconhecido*	–	–
395-02F	<i>Trichoderma brevicompactum</i>	FJ610290.1	2e-115
08-05F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU198317.1	8e-166
332-01F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU318216.1	1e-178
04-02F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU318216.1	2e-167
08-02F	<i>Trichoderma asperellum</i>	EU021220.1	2e-177
247-01F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU198318.1	3e-155
330-01F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU318216.1	6e-177
08-04F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU198317.1	1e-179
353-01F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU198318.1	1e-174
11-11F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU318216.1	3e-155
328-01F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU198318.1	3e-155
TN-01F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU198318.1	1e-159
45T-01F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU198318.1	8e-171
482-01F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU198318.1	8e-161
04-04F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU198318.1	6e-147
15-06F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU198317.1	6e-157
04-09F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU318216.1	4e-154
04-10F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU198318.1	1e-148
364-01F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU198318.1	3e-149
356-02F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU198318.1	3e-150
287-02F	<i>Trichoderma asperellum</i>	EU021220.1	2e-147
05-01F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU318216.1	5e-138
328-02F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU198318.1	2e-116
04-10-2F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU318216.1	8e-156
333-01-2F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU318216.1	3e-160
09-01F	<i>Trichoderma hamatum</i>	FJ710058.1	3e-95
333-01F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU198318.1	5e-143
03-04F	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	FJ442662.1	4e-154
08-06F	<i>Hypocrea koningii</i>	EF417481.1	2e-156
48-02F	<i>Trichoderma gamsii</i>	EU280129.1	1e-173

06-02F	Trichoderma koningiopsis	FJ442655.1	3e-165
398-02F	Hypocrea koningii	EF417481.1	8e-171
11-06F	Trichoderma atroviride	EU715691.1	1e-158
19-07F	Trichoderma koningiopsis	FJ442655.1	2e-161
11-09F	Trichoderma atroviride	FJ975597.1	3e-154
40-01F	Trichoderma gamsii	EU280129.1	1e-163
28-06F	Trichoderma koningiopsis	DQ379015.1	8e-166
06-03F	Trichoderma atroviride	EU715691.1	6e-172
17-06F	Trichoderma erinaceum	EU280134.1	5e-178
360-01-2F	Trichoderma gamsii	EU280129.1	5e-173
359-02F	Trichoderma gamsii	EU280129.1	5e-168
491-02F	Trichoderma gamsii	EU280129.1	1e-174
29-04F	Trichoderma atroviride	FJ975598.1	1e-157
02-04F	Trichoderma viride	GU067751.1	2e-122
40T-03F	Trichoderma asperellum	GU198318.1	6e-127
285-02F	Trichoderma erinaceum	EU280134.1	1e-144
34T-01F	Trichoderma asperellum	GU198318.1	2e-127
248-01F	Trichoderma gamsii	EU280129.1	2e-132
04-07F	Trichoderma asperellum	GU198318.1	1e-129
285-01F	Trichoderma asperellum	GU198318.1	2e-147
87-01F	Trichoderma gamsii	EU280129.1	3e-135
97-01F	Trichoderma gamsii	EU280129.1	8e-131
429-02F	Trichoderma asperellum	GU198318.1	2e-147
06-08F	Trichoderma atroviride	EU715691.1	5e-153
362-02F	Trichoderma asperellum	GU198318.1	2e-136
287-01F	Trichoderma hamatum	GQ331987.1	6e-112
336-02F	Trichoderma hamatum	GQ331987.1	2e-161
15T-01F	Trichoderma asperellum	GU198318.1	2e-87
398-01F	Trichoderma asperellum	GU198317.1	1e-36
357-01F	Trichoderma erinaceum	EU280134.1	2e-159
08-03F	Trichoderma asperellum	GU198317.1	5e-177
400-01F	Trichoderma asperellum	GU198318.1	7e-170
06-04F	Trichoderma atroviride	EU715691.1	0.0
03-04-2F	Trichoderma atroviride	EU715691.1	0.0
551-02F	Trichoderma gamsii	EU280129.1	0.0
03-07F	Trichoderma viride	GU067751.1	0.0
320-02F	Trichoderma asperellum	GU198318.1	0.0
359-01F	Trichoderma asperellum	GU198318.1	0.0
03-03F	Trichoderma atroviride	EU715691.1	6e-172
15-05-2F	Trichoderma asperellum	GU198318.1	0.0
04-08F	Trichoderma asperellum	GU198318.1	1e-178
331-02F	Trichoderma asperellum	GU198318.1	0.0
337-01F	Trichoderma asperellum	GU318216.1	1e-164

1L-01F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU198318.1	0.0
326-02F	<i>Trichoderma asperellum</i>	FJ605245.1	2e-149
247-01-2F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU198318.1	2e-165
399-02F	<i>Trichoderma hamatum</i>	GQ331987.1	3e-164
32T-02F	<i>Trichoderma asperellum</i>	FJ004799.1	0.0
333-02F	<i>Trichoderma asperellum</i>	FJ004799.1	0.0
353-02F	<i>Trichoderma viride</i>	GQ221864.1	0.0
44-02F	<i>Trichoderma atroviride</i>	EU280111.1	0.0
55-01F	<i>Trichoderma gamsii</i>	EU280129.1	0.0
13-07F	<i>Trichoderma asperellum</i>	EU272525.1	0.0
355-01F	<i>Trichoderma asperellum</i>	FJ797513.1	0.0
483-02F	<i>Trichoderma asperellum</i>	EU280122.1	0.0
02-05F	<i>Trichoderma gamsii</i>	EU280129.1	0.0
19-03-2F	<i>Trichoderma erinaceum</i>	EU280134.1	6e-167
50-03F	<i>Trichoderma atroviride</i>	FJ975597.1	1e-113
47T-01F	<i>Trichoderma erinaceum</i>	EU280134.1	1e-97
04-01F	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	FJ442648.1	2e-160
10T-03F	<i>Trichoderma asperellum</i>	GU198318.1	6e-141
02-01F	<i>Trichoderma harzianum</i>	AF443925.1	2e-141
476-02F	<i>Trichoderma tomentosum</i>	EU280072.1	6e-132
419-02F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ459968.1	4e-134
484-01F	<i>Trichoderma harzianum</i>	EU280103.1	2e-141
484-01-2F	<i>Trichoderma harzianum</i>	EU280103.1	8e-136
488-02F	<i>Trichoderma harzianum</i>	EU280103.1	3e-140
12-06F	<i>Trichoderma harzianum</i>	EF442085.1	1e-143
330-02F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ998176.1	8e-146
475-02F	<i>Trichoderma harzianum</i>	EU280103.1	3e-145
487-02F	<i>Trichoderma harzianum</i>	EU280103.1	2e-156
481-01F	<i>Trichoderma harzianum</i>	EU280103.1	3e-140
481-02F	<i>Trichoderma harzianum</i>	EU280103.1	6e-157
21-02F	<i>Trichoderma harzianum</i>	GQ426039.1	7e-132
489-02F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ998177.1	2e-147
25-02F	<i>Trichoderma harzianum</i>	EF442085.1	2e-146
494-01F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ442672.1	5e-138
617-01F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ361038.1	5e-153
29-12F	<i>Trichoderma tomentosum</i>	EU280083.1	6e-152
454-02F	<i>Trichoderma tomentosum</i>	EU280081.1	4e-164
26-03F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ442274.1	1e-148
6T-01F	<i>Trichoderma harzianum</i>	AF443919.1	5e-158
29-15F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ459971.1	6e-162
5T-01F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ459971.1	2e-162
430-01F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ442672.1	2e-126
418-02F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ442672.1	2e-126

420-01F	Trichoderma harzianum	FJ442663.1	4e-139
29-12-2F	Trichoderma tomentosum	EU280083.1	5e-128
476-01F	Trichoderma harzianum	EF442082.1	8e-136
04-03-2F	Trichoderma tomentosum	EU280083.1	7e-102
05-03F	Trichoderma harzianum	FJ998176.1	5e-108
15-05F	Trichoderma harzianum	FJ442681.1	3e-120
468-02F	Trichoderma tomentosum	FJ412064.1	2e-68
486-01F	Trichoderma harzianum	FJ442252.1	2e-101
330-02-2F	Trichoderma harzianum	AB374280.1	4e-65
05-02F	Trichoderma harzianum	FJ998176.1	1e-148
454-01F	Trichoderma harzianum	EU280103.1	1e-164
05-09F	Trichoderma harzianum	EU589151.1	1e-158
26-05F	Trichoderma harzianum	AY605752.1	6e-167
26-06F	Trichoderma inhamatum	AM888373.1	1e-153
100T-01F	Trichoderma harzianum	FJ442663.1	8e-166
480-01F	Trichoderma harzianum	FJ442672.1	2e-152
421-01F	Trichoderma tomentosum	EU280081.1	2e-157
475-01F	Trichoderma harzianum	FJ442631.1	2e-156
12-04F	Trichoderma harzianum	FJ998176.1	9e-160
75-02F	Trichoderma harzianum	FJ442665.1	1e-154
567-01F	Trichoderma virens	FJ908742.1	2e-171
29-05F	Trichoderma inhamatum	AM888373.1	8e-155
26-04F	Trichoderma harzianum	FJ998176.1	0.0
479-02F	Trichoderma harzianum	FJ442252.1	0.0
327-02F	Trichoderma harzianum	FJ537124.1	0.0
490-02F	Trichoderma harzianum	EU280103.1	0.0
616-02F	Trichoderma harzianum	EF442085.1	4e-167
327-02-3F	Trichoderma harzianum	FJ412025.1	0.0
327-02-2F	Trichoderma harzianum	EU744191.1	0.0
46-05F	Trichoderma inhamatum	AF455502.1	0.0
17-07F	Trichoderma harzianum	EF392739.1	0.0
48-01F	Trichoderma harzianum	EU871021.1	0.0
45-01F	Trichoderma tomentosum	FJ412065.1	0.0
29-11-2F	Trichoderma tomentosum	EU280072.1	0.0
13-11F	Trichoderma harzianum	EU280078.1	0.0
57-01F	Trichoderma harzianum	AY605745.1	0.0
348-01-3F	Trichoderma harzianum	EU280078.1	0.0
27-04F	Trichoderma harzianum	EU280078.1	0.0
45-01-2F	Trichoderma tomentosum	EU280072.1	0.0
456-01F	Trichoderma harzianum	FJ998176.1	0.0
29-03F	Trichoderma harzianum	AF275330.1	0.0
20-02F	Trichoderma harzianum	FJ884177.1	0.0
397-01F	Trichoderma harzianum	FJ998176.1	7e-171

05-06F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ998177.1	4e-152
21-02-2F	<i>Trichoderma harzianum</i>	EU280078.1	0.0
26-02F	<i>Trichoderma harzianum</i>	GU266272.1	0.0
616-04F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ442674.1	2e-176
348-01-2F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ998176.1	0.0
447-01F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ998176.1	1e-179
15-09F	<i>Trichoderma harzianum</i>	EU280077.1	0.0
21-01F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ998176.1	4e-164
348-01F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ442631.1	1e-159
492-02F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ442252.1	3e-174
479-01F	<i>Trichoderma harzianum</i>	EU280103.1	1e-178
483-01F	<i>Trichoderma harzianum</i>	EU280103.1	0.0
495-01F	<i>Trichoderma tomentosum</i>	EU280081.1	3e-165
498-02F	<i>Trichoderma tomentosum</i>	EU280081.1	0.0
291-02F	<i>Trichoderma tomentosum</i>	EU280072.1	0.0
418-01F	<i>Trichoderma tomentosum</i>	EU280083.1	2e-155
05-04-2F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ442640.1	1e-174
480-02F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ884177.1	4e-178
05-05F	<i>Trichoderma inhamatum</i>	AM888373.1	2e-172
12-09F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ998176.1	0.0
489-01F	<i>Trichoderma tomentosum</i>	EU280083.1	1e-178
3T-02F	<i>Trichoderma harzianum</i>	EF442082.1	0.0
75-02-2F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ442665.1	0.0
12-12F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ998176.1	2e-176
13-19F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ998176.1	0.0
6T-01-2F	<i>Trichoderma harzianum</i>	EF442085.1	1e-157
05-04F	<i>Trichoderma inhamatum</i>	AJ849892.1	4e-101
05-07F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ998176.1	7e-155
52T-01F	<i>Trichoderma harzianum</i>	FJ998176.1	8e-150
301-01F	<i>Trichoderma virens</i>	GU365897.1	2e-52
401-02F	<i>Trichoderma atroviride</i>	AF057601.1	6e-53
41-02F	<i>Trichoderma virens</i>	GQ495269.1	2e-52

*. Isolado denominado "Desconhecido", por que não foi possível a identificação em nenhum dos bancos de dados utilizados neste trabalho.

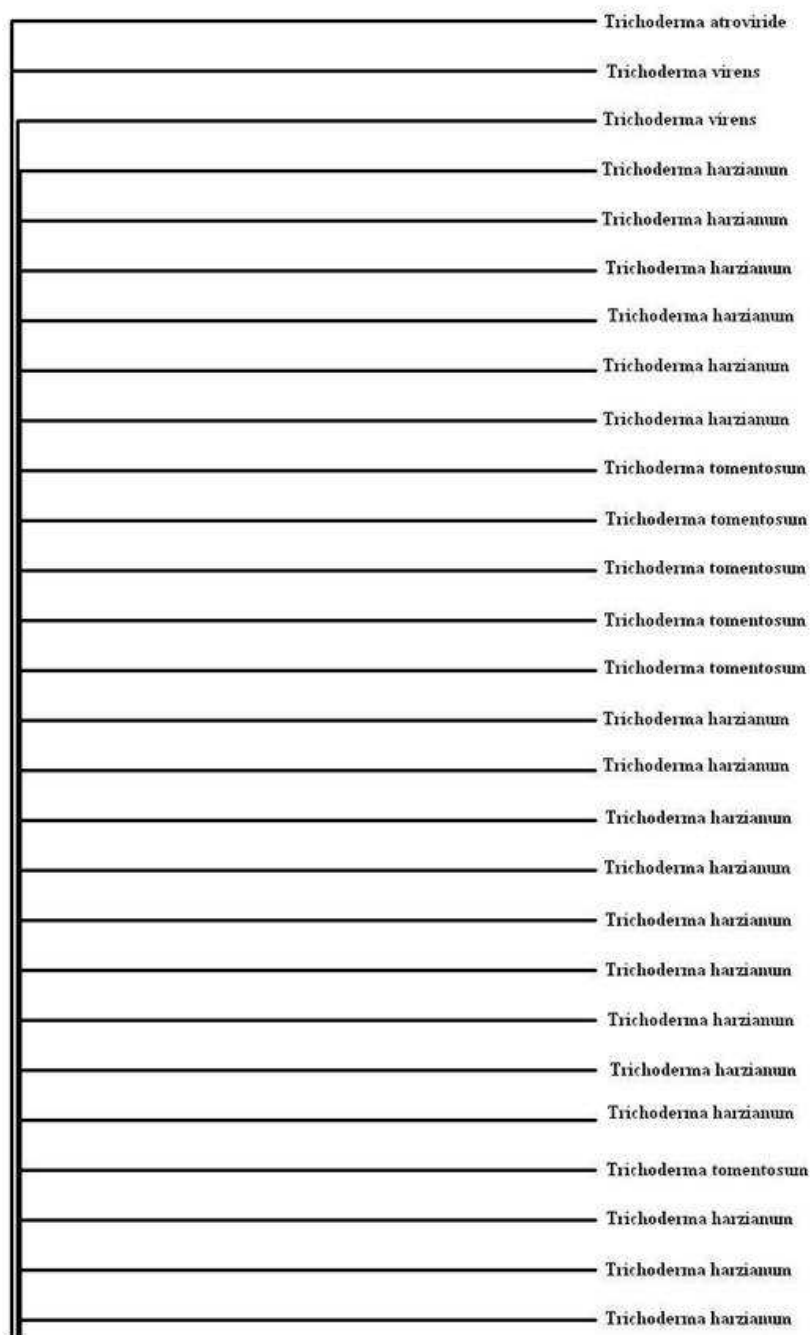


Fig. 5. Árvore gerada pelo método de Neighbor-joining sem valores de bootstrap. O número do isolado foi substituído pela provável espécie. Continua...

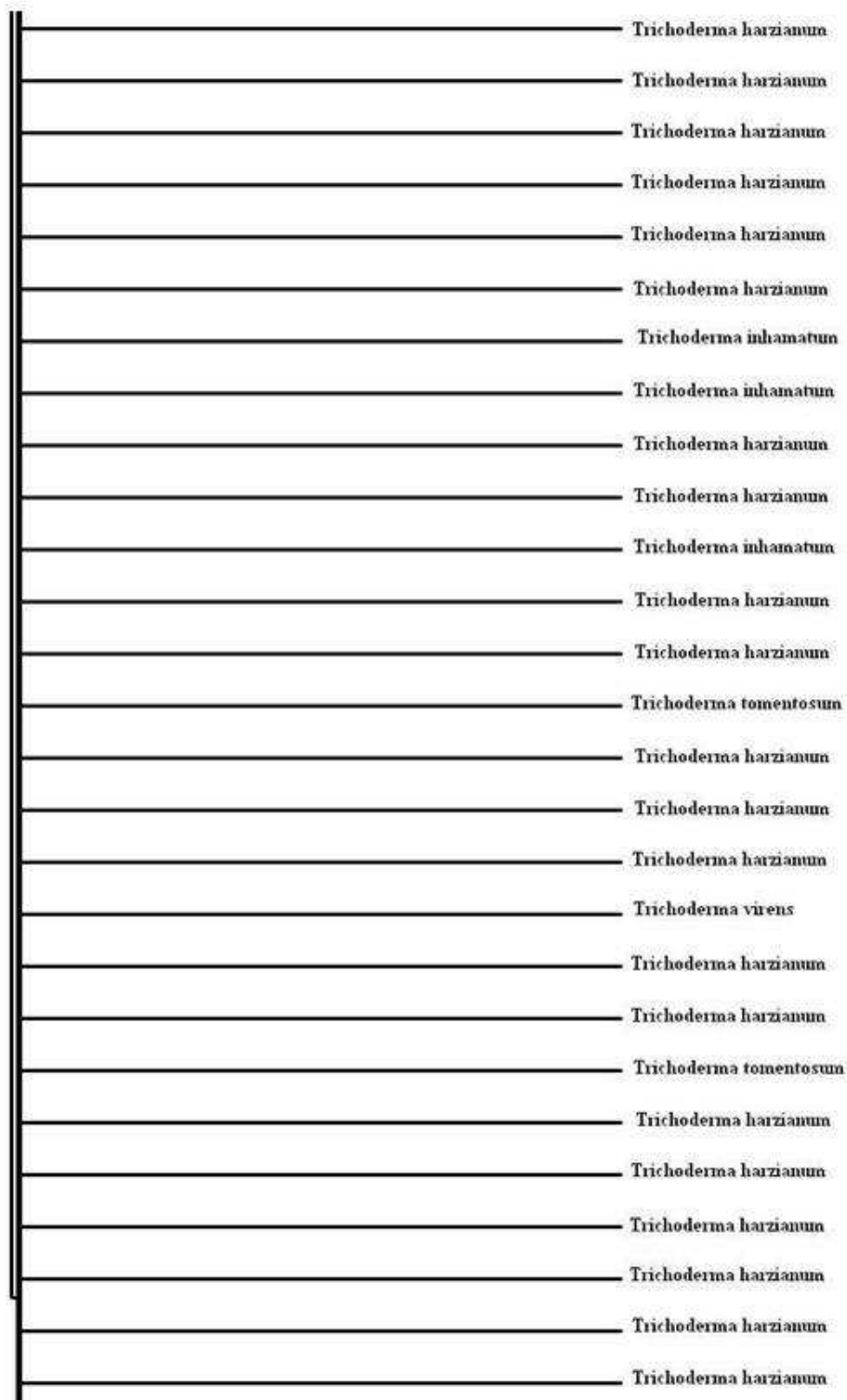


Fig. 5. Árvore gerada pelo método de Neighbor-joining sem valores de bootstrap. O número do isolado foi substituído pela provável espécie. Continua...

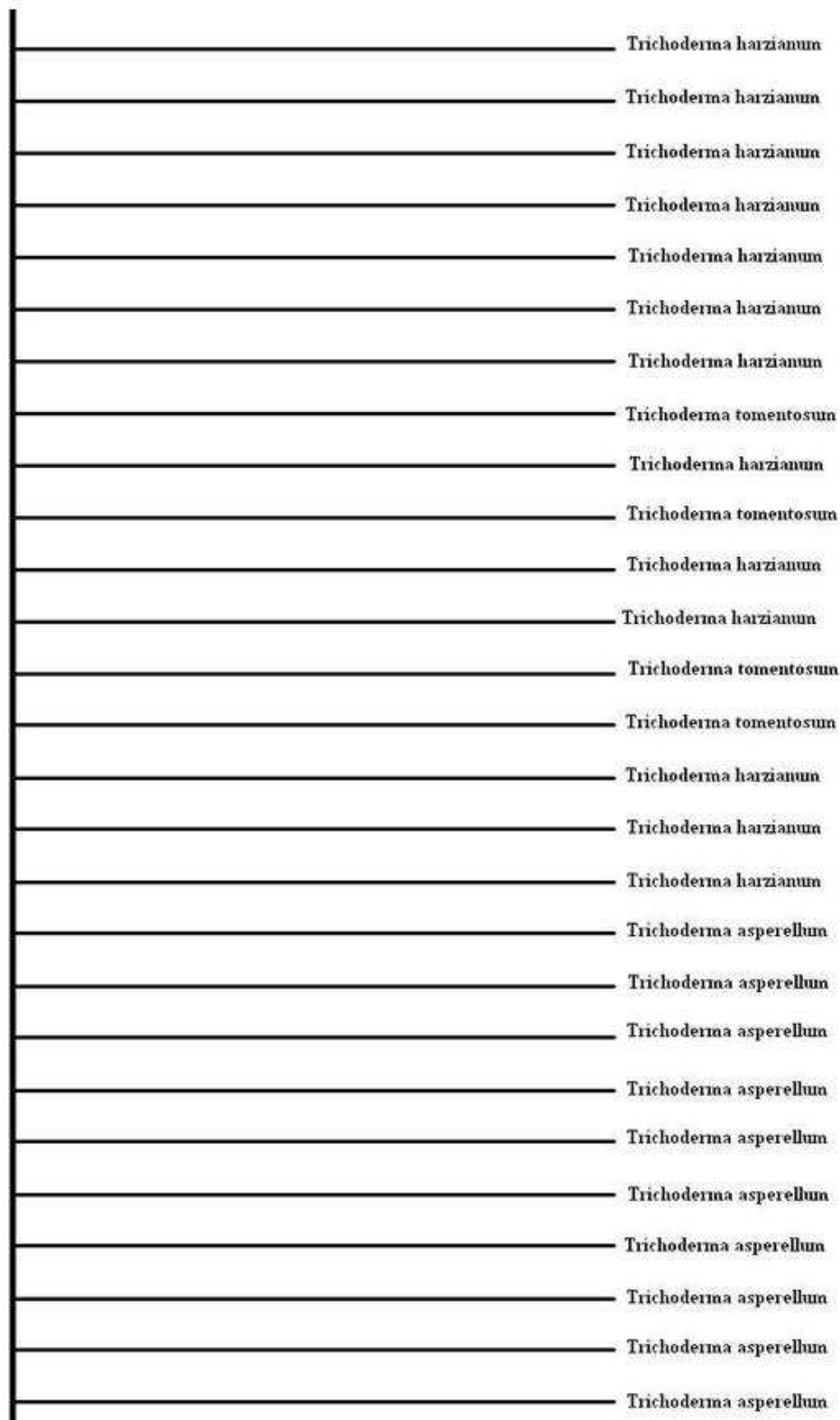


Fig. 5. Árvore gerada pelo método de Neighbor-joining sem valores de bootstrap. O número do isolado foi substituído pela provável espécie. Continua...

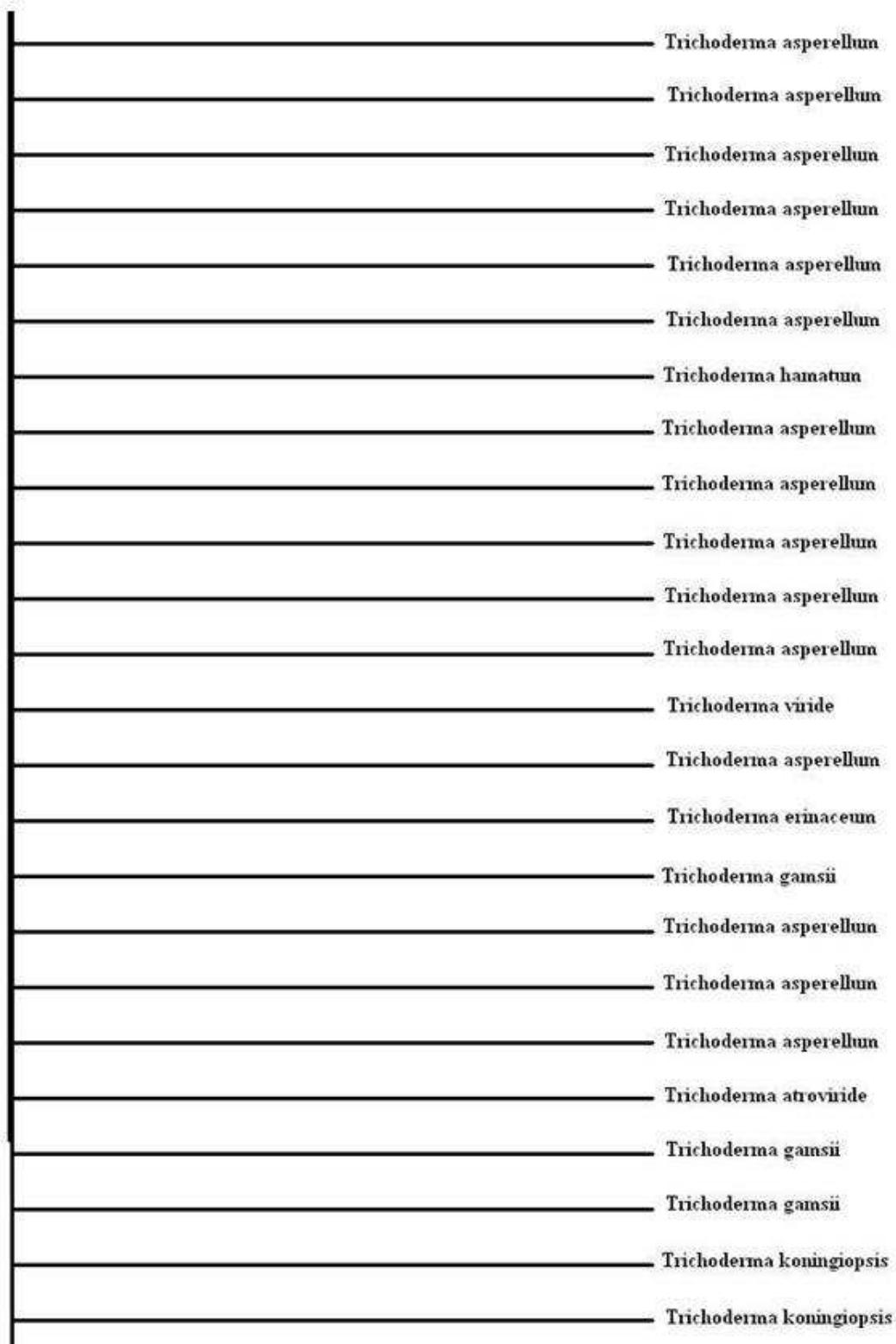


Fig. 5. Árvore gerada pelo método de Neighbor-joining sem valores de bootstrap. O número do isolado foi substituído pela provável espécie. Continua...

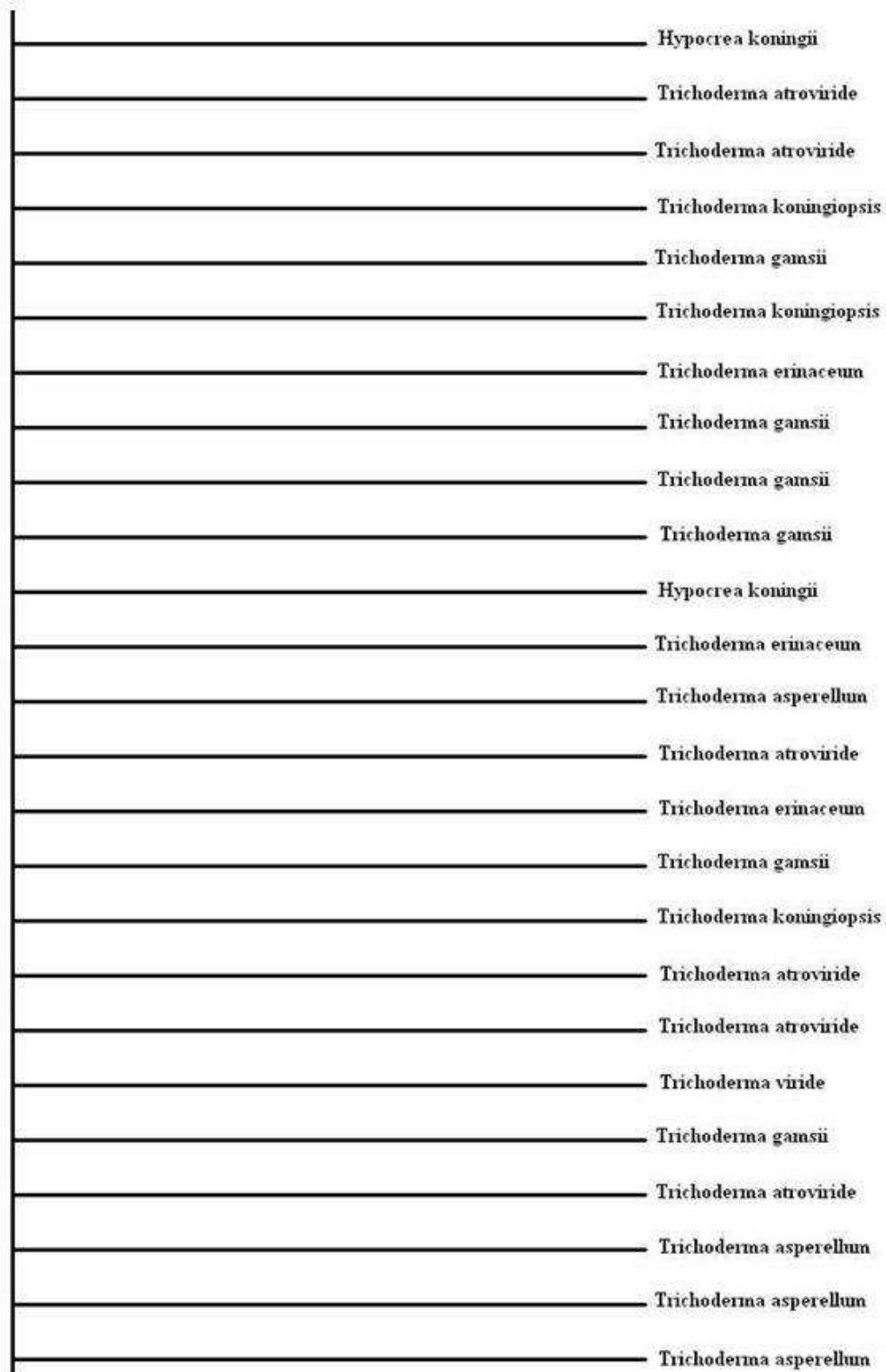


Fig. 5. Árvore gerada pelo método de Neighbor-joining sem valores de bootstrap. O número do isolado foi substituído pela provável espécie. Continua...

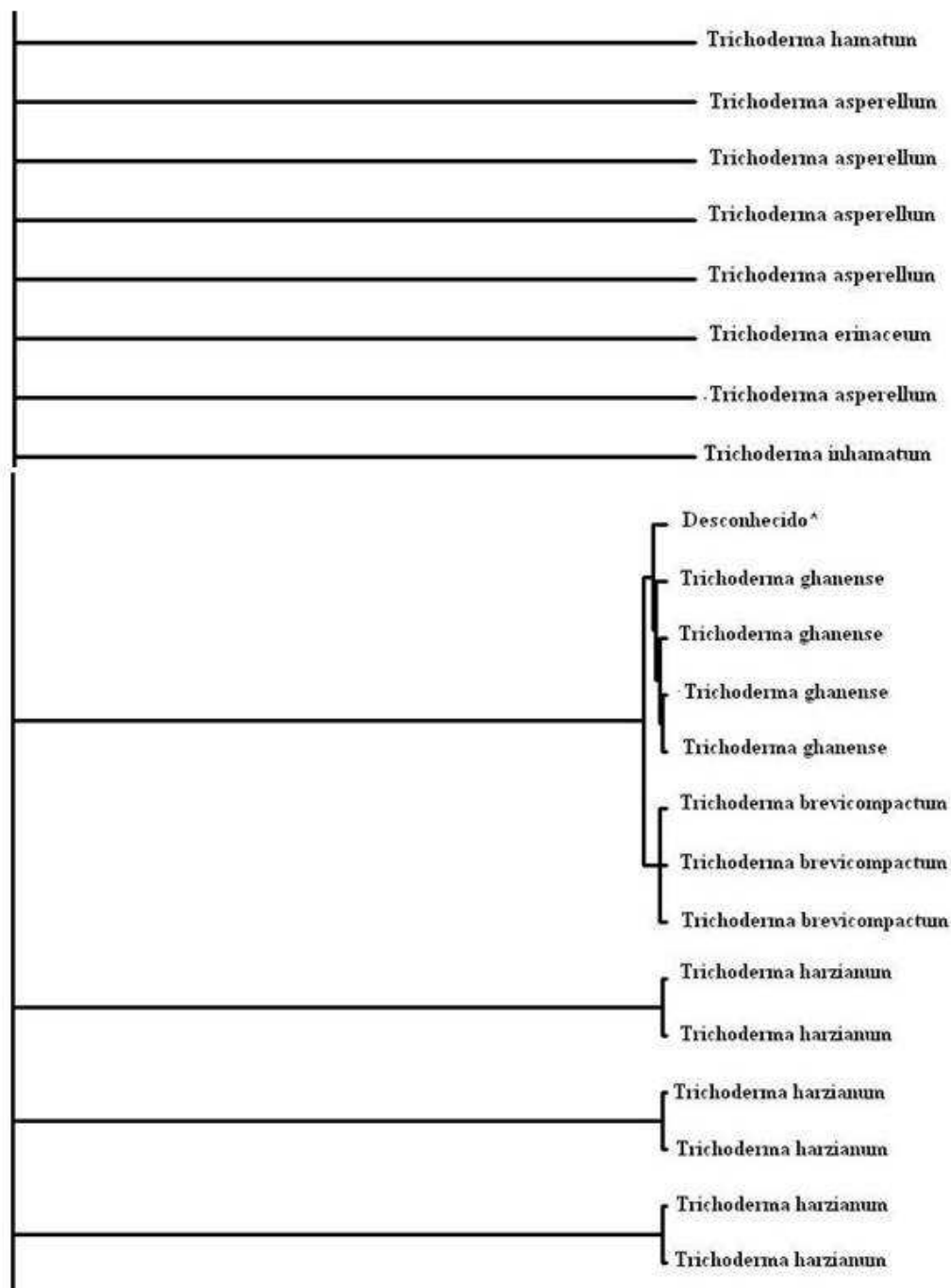


Fig. 5. Árvore gerada pelo método de Neighbor-joining sem valores de bootstrap. O número do isolado foi substituído pela provável espécie. * indica isolado que não pode ser identificado. Continua...

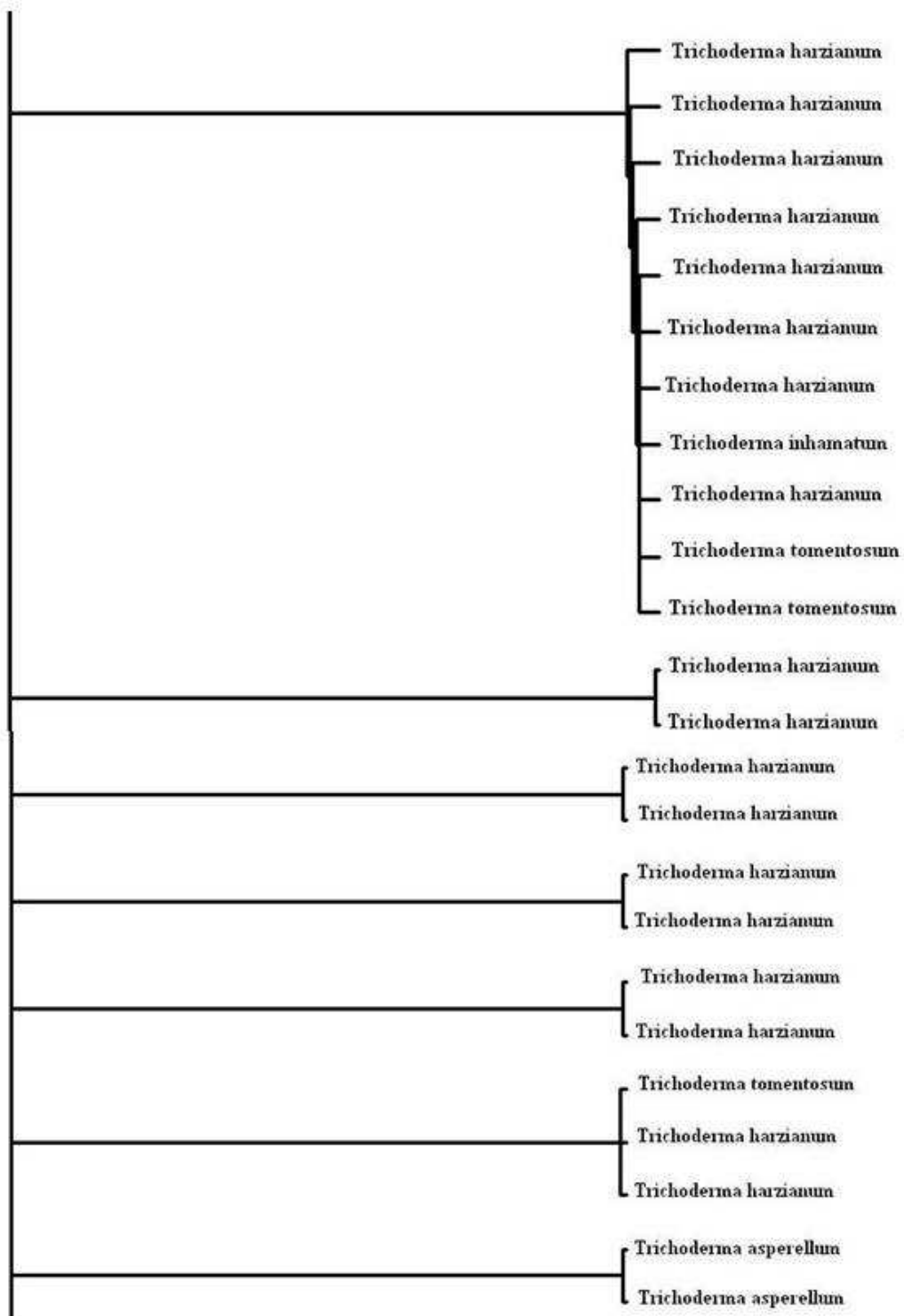


Fig. 5. Árvore gerada pelo método de Neighbor-joining sem valores de bootstrap. O número do isolado foi substituído pela provável espécie. Continua...

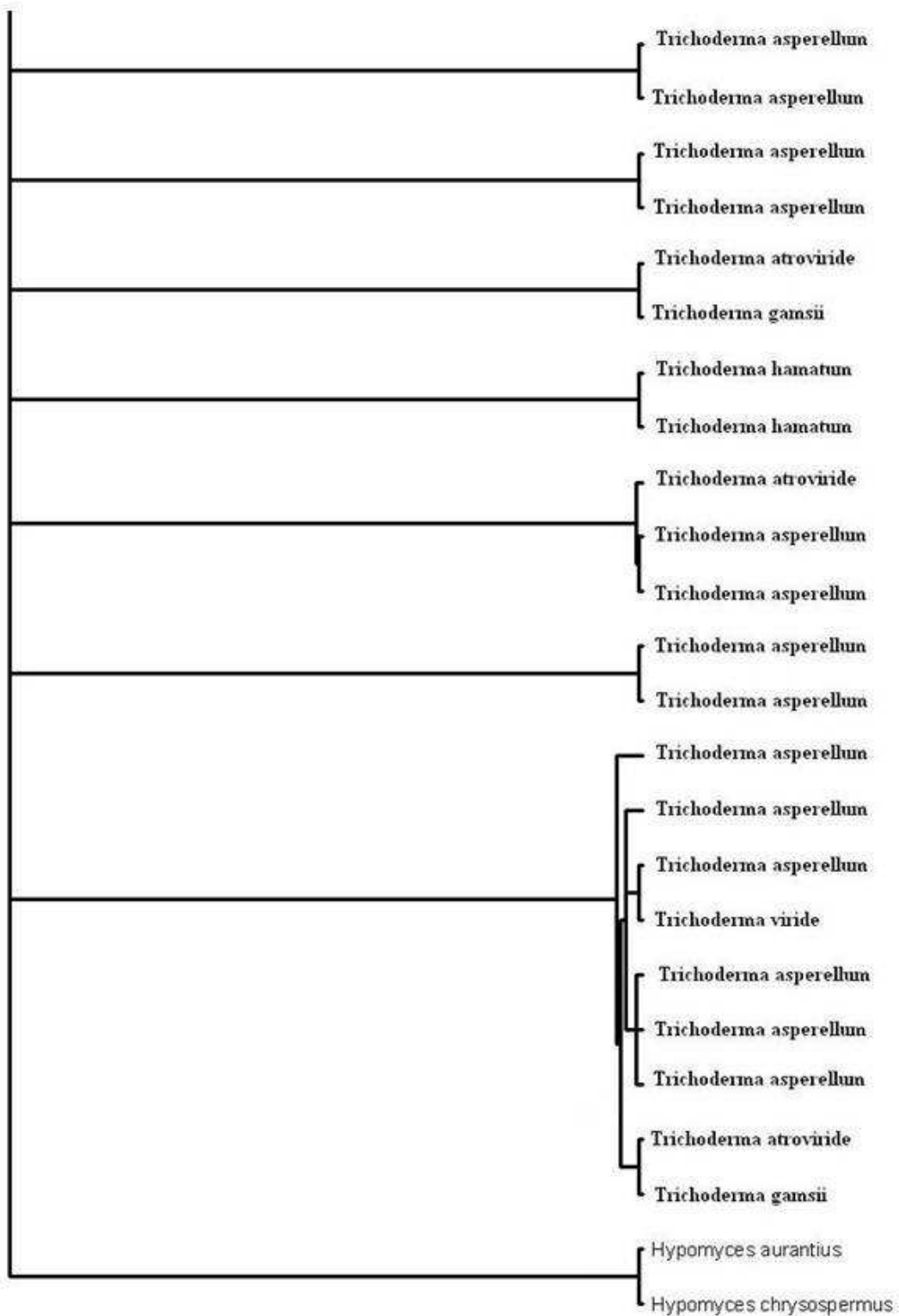


Fig. 5. Árvore gerada pelo método de Neighbor-joining sem valores de bootstrap. O número do isolado foi substituído pela provável espécie.

5. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho demonstram a necessidade de se buscar cada vez mais por metodologias que possibilitem a rápida identificação de isolados para permitir sua utilização em biotecnologias que possam beneficiar efetivamente a população.

Dentre as novas ferramentas moleculares desenvolvidas, a utilização de marcadores do tipo RAPD, marcadores filogenéticos e marcadores que permitam a criação de sequências que possam ser utilizadas como barcodes estão entre as mais utilizadas. Todavia, a realização de análises envolvendo um grande número de amostras pode se tornar problemática e deve ser feita com cuidado. Essas análises necessitam de muito tempo e requerem pessoal especializado na utilização de ferramentas de bioinformática. O grau de complexidade das análises tende a aumentar ainda mais se as relações filogenéticas e taxonômicas entre os organismos estudados não forem bem estabelecidas, como ocorre com indivíduos do gênero *Trichoderma*. Para amenizar esses problemas, o screening de isolados que envolvam um grande número de amostras deve ser direcionado primeiro na busca das características fenóticas desejadas e somente após obtido resultados desejados proceder com a análise para a identificação dos isolados de interesse. Esse trabalho inicial diminuiriam a chance de erro e facilitaria a realização das análises filogenéticas, que auxiliam na identificação correta desses isolados por estabelecer as relações entre eles.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENÍTEZ, T.; RINCON, A. M.; LIMON, M. C.; CODON, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol.*, v. 7, p. 249-260, 2004.
- BEYDON, M.H., FOURNIER, A., DRUGEAULT, L., BECQUART, J. Microbiological high throughput screening: an opportunity for the lead discovery process. *J.Biomol. Screen.* 5:13-22, 2000.
- BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Can. J. Bot.* 62:924-931, 1984.
- BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can. J. Bot.* 69:2357-2372, 1991a.
- BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Can. J. Bot.* 69:2373-2417, 1991b.
- BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Can. J. Bot.* 69:2418-2420, 1991c.
- BISSETT, J. *Trichoderma atroviride*. *Can. J. Bot.* 70:639-641, 1992.
- BISSETT, J.; SZAKACS, G.; NOLAN, C.A.; DRUZHININA, I.; GRADINGER, C.; KUBICEK, C.P. New species of *Trichoderma* from Asia. *Can. J. Bot.*, v. 81, p. 570-586, 2003.
- BOERO, F. (2010). The Study of Species in the Era of Biodiversity: A Tale of Stupidity. *Diversity*, 2 (1), 115-126.
- BORNEMAN, J., HARTIN, R.J. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(10): 4356-4360, 2000.
- CARTER, D.A., TRAN-DINH, N., MARRA, R.E., VERA, R.E. The Development of genetic markers from fungi genome initiatives In: *Applied Mycology & Biotechnology – An International Series. Fungal Genomics*. v. 4: 1-27, 2004.

- CLAUSEN, C.P. Biological Control of insect pest in the continental United States. Washington, USDA, 1956.
- COOK, R.J.; BAKER, K.F. The nature and practice of biological control of plant pathogens, American Phytopathological Society, St.Paul, MN, 1983.
- CORABI-ADELL, C. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (HYPOCREALES – FUNGI) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica. 202 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro – SP, 2004.
- CRUZ, I. Controle Biológico em manejo integrado de pragas. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. Controle Biológico no Brasil – Parasitóides e Predadores. São Paulo: Manole, 2002. p. 543-579.
- DOYLE, J.J. Gene trees and species trees: molecular systematics as one-character taxonomy. *Syst. Bot.* 17: 144-163, 1992.
- DRUZHININA, I.; KUBICEK, C.P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters, *J Zhejiang Univ Sci B.*, v. 6, p. 100-112, 2005.
- DRUZHININA, I.S., KOMOŃ-ZELAZOWSKA, M., KREDICS, L., HATVANI, L., ANTAL, Z., BELAYNEH, T., KUBICEK, C.P. Alternative reproductive strategies of *Hypocrea orientalis* and genetically close but clonal *Trichoderma longibrachiatum*, both capable of causing invasive mycoses of humans. *Microbiology.* 154: 3447–3459, 2008.
- DRUZHININA, I.S., KOPCHINSKIY, A.G., KOMÓN, M., BISSET, J., SZACACS, G., KUBICEK, C.P. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* e *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology.* 42: 813-828, 2005.
- DRUZHININA, I.S., KOPCHINSKIY, A.G., KUBICEK, C.P. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience.* 47:65-54, 2006.
- FELINER, G.N., ROSSELLÓ, J.A. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 44: 911-919, 2004.
- FRAZER, L.N. The physical genoma. In: *Essential Fungal Genetics – Moore., D.* 3:184-210, 2002.

- GAMS, W. & BISSET, J. Morphology and identification of Trichoderma. In: Kubicek, P. & Harman, G. E. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium: basic biology, taxonomy and genetics*, vol. 1. Taylor & Francis, London, p.3-34, 1998.
- GONZÁLEZ-CHAVIRA, M.M., TORRES-PACHECO, I., VILLORDO-PINEDA, E., GUEVARA-GONZALEZ, R.G. DNA markers. In: *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. González-Chavira, M.M., Torres-Pacheco, I. Research Signpost. 99-134, 2006.
- GURR, G.M.; BARLOW, N.D.; MEMMOTT, J.; WRATTEN, S.D.; GREATHEAD, D.J. A history of methodological, theoretical and empirical approaches to biological control. In: GURR, G.; WRATTEN, S. *Biological Control: Measures of success*. Kluwer Academic Publishers, 2002. p. 3-38. Disponível em: < <http://books.google.com>>. Acesso em: 20 jul. 2008.
- HAJIBABAEI, M., SINGER, G.A.C., HERBERT, P.D.N., HICKEY, D.A. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *TRENDS in Genetics*. 23(4): 167-172, 2007.
- HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.*, v. 84, p. 377-393, 2000.
- HARMAN, G. E. Seed treatment for biological control of plant disease. *Crop Protection*, v. 10, p. 166-171, 1991.
- HARMAN, G.E.; HOWEL, 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.
- HERBERT, P.D.N., CYWINSKA, A., BALL, S.L., DEWAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 270: 313-321, 2003.
- HERMOSA, M.R.; GRONDONA, I.; ITURRIAGA, E.A.; DIAZ-MINGUEZ, J.M.; CASTRO, C.; MONTE, E.; GARCIA-ACHA, I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp.. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 5, p. 1890-1898, May. 2000.
- HERMOSA, M.R.; KECK, E.; CHAMORRO, I.; RUBIO, B.; SANZ, L.; VIZCAÍNO, J.A.; GRONDONA, I.; MONTE, E. Genetic diversity show in *Trichoderma* biocontrol isolates, *Mycol. Res.*, v. 108, n. 8, p. 897-906, Ago. 2004.

- HILLIS, D.M., DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 64: 411-453, 1991.
- HONG, S.G., JEONG, W., JUNG, H.S. Amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of polypores and its potential for phylogenetic analysis. *Mycologia*. 94 (5): 823-833, 2002.
- KARKOURI, K.E.; MURAT, C.; ZAMPIERI, E.; BONFANTE, P. Identification of internal transcribed spacer sequence motifs in truffles: a first step toward their DNA bar coding. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 16, p. 5320-5330, 2007.
- KOGAN, M. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary development. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 43, p. 243-270, 1998.
- KOPCHINSKIY, A., KOMÓN, M., KUBICEK, C.P., DRUZHININA, I.S. *TrichoBlast*: A multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. *Mycological Research*. 109(6): 658-660, 2005.
- KUBICEK, C.P.; BISSETT, J.; DRUZHININA, I.; KULLNIG-GRADINGER, C.; SZAKACS, G. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South- East Asian isolates. *Fungal Genet Biol.*, v. 38, p. 310-319, 2003.
- KUBICEK, C.P.; KOMÓN-ZELAZOWSKAL, M.; KARAFFA-SANDOR, E.; DRUZHININA, I.S. Facts and challenges in the understanding of the biosynthesis of peptaibols by *Trichoderma*, a review. *Chem. Biodivers.*, v. 4, n. 6, p. 1068-1082, 2007.
- KUHLS, K., LIECKFELDT, E., SAMUELS, G.J., MEYER, W., KUBICEK, C.P., BÖRNER, T. Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia*, v.89, p.442-60, 1997.
- KULLNIG-GRADINGER, C.M.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C.P. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach, *Mycol Res.*, v. 106, p. 757-767, 2002.
- LIECKFELDT, E., SEIFERT, K.A. An evaluation of the use of ITS sequences in the taxonomy of *Hypocreales*. *Studies in Mycology*. 45: 35-44, 2000.
- LIU, PI-GANG; YANG, QIAN. Identification of genes with a biocontrol function in *Trichoderma harzianum* mycelium using the expressed sequence tag approach. *Research in Microbiology*, v. 156, p. 416-423, 2005.

- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A. & RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MARON, J.L.; CRONE, E. Herbivory: effects on plant abundance, distribution and population growth. *Proc. R. Soc. B.* v. 273, p. 2575–2584. 2006.
- MARTIN, K.J.; RYGIEWICZ, P.T. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BCM Microbiology*, v. 5, n. 28, 2005.
- MEYER, R. J. PLASKOWITZ, J. S. Scanning electron microscopy of conidia and conidial matrix of *Trichoderma*. *Mycologia* 81(2):312-317, 1989.
- MIN, X.J., HICKEY, D.A. Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Notes*. 7: 365-373, 2007.
- MOLANO, J.; DURAM, A. & CABIB, E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Anal. Biochem.*, v. 83, p. 648-656, 1977.
- MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International of Microbiology*, v. 4, p. 1-4, 2001.
- NAGY, Viviana; SEIDL, Verena; SZAKACS, George; KOMOŃ-ZELAZOWSKA, Monika; KUBICEK, Christian P.; DRUZHININA, Irina S. Application of DNA Bar Codes for screening of industrially important fungi: the haplotype of *Trichoderma harzianum* sensu stricto indicates superior chitinase formation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 21, p. 7048-7058, Nov. 2007.
- NEI, M., LI, W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76:5269-5273, 1979.
- PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. Controle Biológico: Terminologia. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. Controle Biológico no Brasil – Parasitóides e Predadores. São Paulo: Manole, 2002. p.1-16.
- PERSOON, C. H. *Dipositio methodica fungorum*. *Römer's Neues Magazin Botanische* 1:81-128, 1794.
- REHNER, S.A., SAMUELS, G.J. (1995). Molecular sytematics of the Hypocreales: a telemorph gene phylogeny and the status of their anamorphs. *Canadia Journal of Botany* 73 (Supl. 1): S816–S823.
- RIFAI, M. A. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.* 116:1-56, 1969.

- ROIGERS, D. J.; JEFFERS, S. N. & CALDEWELL, R. W. 1991. Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soils. *Soil Biol. Biochem.* 23(4):353-359, 1991.
- SAMUELS, G. J. & REHNER, S. A. Toward a concept of genus and species in *Trichoderma*. In: Lumsden, R.D. & Vaughn, J.L. (eds.). *Pest Management: Biologically based technologies*. American Chemical Society, Washington, District of Columbia, p.186-188, 1993.
- SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.* 100(8): 923-935, 1996.
- SAMUELS, G. J.; LIECKFELDT, E. & NIRENBERG, H. I. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia* 51(1):71-88, 1999.
- SAMUELS, G. J.; PARDO-SCHULTHEIS, R.; HEBBAR, K. P.; LUMSDEN, R. D.; BASTOS, C. N.; COSTA, J. C. & BEZERRA, J. L. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycol. Res.*, v. 104, n. 6, p. 760-764, 2000.
- SAMUELS, G.J. & SEIFERT, K.A. The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:37-67, 1995.
- SAMUELS, G.J. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology.* 96: 195-206, 2006.
- SANDERS, I. R. No sex please, we're fungi. *Nature*, 399: 737-739, 1999.
- SANTOS, T.; VILLANUEVA, J. R.; & NOMBELA, C. Production and catabolite repression of *Penicillium italicum* β -glucanases. *J. Bacteriol.*, v. 129, p. 52-58, 1977.
- SANZ, L.; MONTERO, M.; GRONDONA, I.; VISCAÍNO, J.A.; LLOBELL, A.; HERMOSA, R.; MONTE, E. Cell wall-degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma* biocontrol strains show correlation with rDNA taxonomic species. *Curr. Genet.*, v. 46, p. 277-286, 2004.
- SCHINDEL, D.E.; MILLER, S.E. DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature*, v. 435, p. 17, 2005.
- SEIDL, V. Molecular and physiological investigations of biocontrol by the genus *Hypocrea/Trichoderma*. 109 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia aplicada e tecnologia

do gene) – Instituto de engenharia de processos e técnicas de engenharia ambiental – Biociências, Universidade de Tecnologia de Viena, Viena – Áustria, 2006.

SIDDIQUEE, S., GUAN, F.A.T.S., AZIZ, E.R. Phylogenetic relationships of *Trichoderma harzianum* based on the sequence analysis of the internal transcribed spacer region-1 of the rDNA. *Journal of Applied Sciences Research*. 3 (9): 896-903, 2007.

TAYLOR, J. W., JACOBSON, D. J., KROKEN, S., KASUGA, T., GEISER, D. M., HIBETT, D. S., AND FISHER, M. C. (2000). Fungal Genetics and Biology 31, 21–32. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31, 000–000.

THIERICKE, R. High-throughput screening technologies. *EXS*. 93: 71-85, 2003.

THOMPSON, F.L.; OLIVEIRA, V.M.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L.; INÁCIO, C.A.; SELEGHIM, M.H.R.; KITAJIMA, E.W. Taxonomia: Microbiana, de Procariontes, de Fungos, de Protozoários e de Vírus em: Projeto: Diretrizes e estratégias para a modernização de coleções biológicas brasileiras e a consolidação de sistemas integrados de informações sobre biodiversidade. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Brasília – DF. p. 53. 2005,. Disponível em: <www.cgee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=1752>. Acesso em: 12 Jun. 2009, 15:35:32.

ULHOA, C.J., PEBERDY, J. Purification and some properties of the extracelular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 14, p. 236-240, 1992.

VAN DEN BOSCH, R.; MENSSENGER, P.S.; GUTIERREZ, A.P. An Introduction to biological control. New York, Plenum Press, 1992. Disponível em: <<http://books.google.com>>. Acesso em: 20 jul. 2008.

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

XU, J. Fundamental of fungal molecular population genetic analyses. *Curr. Issues Mol. Biol.* 8: 75-90, 2006.