

Identificação molecular de isolados de *Trichoderma* spp como biocontrolador de *Fusarium falciforme*, agente causal da podridão radicular da mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz) var. rosinha no Estado de Alagoas/Brasil

Molecular identification of isolates of *Trichoderma* spp as biocontroller of *Fusarium falciforme*, causal agent of root rot of table manioc (*Manihot esculenta* Crantz) var. rosinha in the State of Alagoas/Brazil

Identificación molecular de *Trichoderma* spp como biocontrolador de *Fusarium falciforme*, agente causal de pudrición de raíz en yuca (*Manihot esculenta* Crantz) var. Rosinha en el Estado de Alagoas/Brasil

Recebido: 11/09/2022 | Revisado: 21/09/2022 | Aceitado: 23/09/2022 | Publicado: 30/09/2022

Izael Oliveira Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4430-655X>
Universidade Federal de Alagoas, Brasil
Centro Educacional Pesquisa Robótica e Inovação, Brasil
Secretaria Municipal de Educação, Brasil
Secretaria Estadual de Educação de Alagoas, Brasil
E-mail: Izaelbiologo@gmail.com

Edna Peixoto da Rocha Amorim

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8668-0216>
Universidade Federal de Alagoas, Brasil
E-mail: ednaamorim58@hotmail.com

Nelson Augusto Nascimento Junior

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3608-175X>
Instituto Federal de Alagoas, Brasil
E-mail: nelsonanjr@gmail.com

Juliana Paiva Carnauba

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7246-8639>
Instituto Federal de Alagoas, Brasil
E-mail: juliana.carnauba@ifal.edu.br

Vicente Ferreira de Araújo Neto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3042-5670>
Universidade Federal de Alagoas, Brasil
E-mail: vicente.nt@outlook.com

Ianês Vieira de Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2747-536X>
Centro Educacional Pesquisa Robótica e Inovação, Brasil
Secretaria Municipal de Educação, Brasil
Instituto IANÊS, Brasil
E-mail: ianes.vieira@hotmail.com

Resumo

A podridão radicular causada por patógenos limita a produção da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultura de elevado interesse para a região Nordeste do Brasil. A dificuldade no manejo tem direcionado a busca por alternativas, entre as quais, o biocontrole com *Trichoderma* spp, vem apresentando resultados significativos. Devido à importância da cultura da mandioca e os problemas fitossanitários existentes, este trabalho teve como objetivos identificar através de ferramentas moleculares os isolados de *Trichoderma* spp. que obtiveram o melhor desempenho em inibir o desenvolvimento de *Fusarium falciforme*. Os isolados de *Trichoderma* foram selecionados pela técnica de confrontamento e produção de metabólitos em trabalho anterior. Posteriormente o DNA foi extraído e o sequenciamento da região ITS foi realizado para análise filogenética. Foram obtidos 12 isolados de *Trichoderma*, entre os quais, cinco (T5; T6; T10; T13; T15) produziram substâncias bioativas que inibiram de forma significativa o desenvolvimento de *F. falciforme*. Os isolados T5; T6 e T15 foram submetidos ao estudo filogenético baseado na região ITS do DNA por apresentarem melhor resultado. Os resultados da análise filogenética baseada nas sequências gênicas da região ITS do DNA, revelou com 100% de confiabilidade que os isolados são do gênero *Trichoderma*, sendo T5 da espécie *T. citrinoviride* com 99% de similaridade na sequência; T6 da espécie *T. harzianum* com 95% e T15 da espécie *T. orientale*

com 95%. Os isolados *T. citrinoviride* e *T. orientale* são os primeiros relatos destas espécies atuando como biocontroladores de fitopatógenos em áreas de plantio de mandioca no estado de Alagoas.

Palavras-chave: Biologia molecular; Controle biológico; Antagonismo.

Abstract

Root rot caused by pathogens limits the production of cassava (*Manihot esculenta* Crantz), a crop of high interest for the Northeast region of Brazil. The difficulty in management has led to the search for alternatives, among which, the biocontrol with *Trichoderma* spp, has been showing significant results. Due to the importance of the cassava crop and the existing phytosanitary problems, this work aimed to identify, through molecular tools, the isolates of *Trichoderma* spp. that obtained the best performance in inhibiting the development of *F. falciforme*. *Trichoderma* isolates were selected by the method of confrontation and production of metabolites. Subsequently, the DNA was extracted and the sequencing of the ITS region was performed for phylogenetic analysis. Twelve *Trichoderma* isolates were obtained, among which, five (T5; T6; T10; T13; T15) produced bioactive substances that significantly inhibited the development of *F. falciforme*. The T5; T6 and T15 were submitted to a phylogenetic study based on the ITS region of the DNA because they presented better results. The results of the phylogenetic analysis based on the gene sequences of the ITS region of the DNA, revealed with 100% reliability that the isolates are of the genus *Trichoderma*, being T5 of the species *T. citrinoviride* with 99% of similarity in the sequence; T6 is *T. harzianum* with 95% and T15 is *T. orientale* with 95%. The isolates *T. citrinoviride* and *T. orientale* are the first reports of these species acting as biocontrollers of phytopathogens in cassava plantation areas in the state of Alagoas.

Keywords: Molecular biology; Biological contro; Antagonism.

Resumen

La podredumbre de la raíz causada por patógenos limita la producción de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), un cultivo de gran interés para la región nordeste de Brasil. La dificultad en el manejo ha dirigido la búsqueda de alternativas, entre las cuales, el biocontrol con *Trichoderma* spp, viene presentando resultados significativos. Debido a la importancia del cultivo de la yuca y a los problemas fitosanitarios existentes, este trabajo tuvo como objetivos identificar a través de herramientas moleculares los aislados de *Trichoderma* spp. que obtuvieron el mejor desempeño en la inhibición del desarrollo de *F. falciforme*. Los aislados de *Trichoderma* fueron seleccionados por la técnica de confrontación y producción de metabolitos en trabajos anteriores. Posteriormente se extrajo el ADN y se realizó la secuenciación de la región ITS para el análisis filogenético. Se obtuvieron doce aislados de *Trichoderma*, entre los cuales, cinco (T5; T6; T10; T13; T15) produjeron sustancias bioactivas que inhibieron significativamente el desarrollo de *F. falciforme*. Los aislados T5; T6 y T15 fueron sometidos a un estudio filogenético basado en la región ITS del ADN para presentar un mejor resultado. Los resultados del análisis filogenético basado en las secuencias del gen de la región ITS del ADN, revelaron con un 100% de fiabilidad que los aislados son del género *Trichoderma*, siendo T5 de la especie *T. citrinoviride* con un 99% de similitud en la secuencia; T6 de la especie *T. harzianum* con un 95% y T15 de la especie *T. orientale* con un 95%. Los aislamientos de *T. citrinoviride* y *T. orientale* son los primeros reportes de estas especies actuando como biocontroladores de fitopatógenos en áreas de plantación de yuca en el estado de Alagoas.

Palabras clave: Biología molecular; Control biológico; Antagonismo.

1. Introdução

Vários são os fitopatógenos que causam podridão na raiz da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e limitam a sua produção. Por este motivo pesquisas para minimizar as ações deletérias vem ocupando um patamar cada vez maior. Pesquisas voltadas a cultura e manejo da mandioca têm sido a cada dia intensificadas na tentativa de buscar alternativas viáveis, que reduzam os prejuízos causados pelas perdas ocasionadas por pragas e doenças, e o biocontrole se torna uma das principais armas em virtude de sua capacidade de controlar e minimizar o uso de agrotóxicos e seus resíduos que acabam causando contaminação do solo e redução da microbiota (Silva et al., 2020a, 2020b).

A antibiose, a produção de substâncias bioativas e a excreção de enzimas são capazes de impedir o desenvolvimento ou resultar na completa lise e dissolução da estrutura celular, independente do contato físico. Estes metabólitos mesmo em baixa concentração interferem nas atividades biológicas, na redução ou paralisação do crescimento, esporulação e germinação de esporos, além de distorções na hifa e endólise (Otsubo & Lorenzi, 2004; Santos et al., 2005).

O *Trichoderma* é um fungo amplamente utilizado em biocontrole devido ao seu potencial antagônico e está presente em solos supressivos. Este microrganismo pertence ao filo Ascomycota que detém várias classes, dentre elas estão Euscomycetes e Pyrenomycetes da ordem Hypocreales, família Hypocreaceae e gênero Hypocrea (teleomorfo) (Melo, 1991).

Várias são as vantagens do *Trichoderma* spp. dentre elas estão as relações desarmônicas estabelecidas pela antibiose, competição, decomposição de matéria orgânica, colonização da rizosfera na qual se estabelece uma competição entre os microrganismos fitopatogênicos do solo, e nas plantas podem induzir a resistência (Harman, 2000, 2006; Harman et al., 2004).

Diversos trabalhos foram publicados comprovando a atividade biocontroladora de *Trichoderma* spp., dentre eles estão os trabalhos de (Melo et al., 1998) que trabalharam com *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Fusarium* spp. (Azevedo et al., 2021) e *Pythium* spp. obtendo resultados satisfatórios utilizando o biocontrolador.

Marques et al., (2014); Rollán et al., (1999) e Rondón et al., (2007) comentam que dentre inúmeras espécies de *Trichoderma* spp. que eles trabalharam, a espécie que apresentou a maior taxa de hiperparasitismo e antagonismo aos fitopatogênicos a *S. rolfsii*, *S. minor* e *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *Pyricularia grisea* Sacc foi *T. harzianum* Hifai.

Silva et al., (2020b) em seus trabalhos obtiveram um resultado satisfatório onde todos os isolados utilizados obtiveram uma taxa satisfatória de antibiose e hiperparasitismo (*in vitro*) com isolados de *Trichoderma* spp., coletados de solos de áreas produtoras de mandioca no estado de Alagoas. Dos Santos (2010) relata que seu trabalho usando *S. rolfsii* confrontado com *T. harzianum*, foi capaz de antagonizar e hiperparasitar *in vitro*, as hifas do fitopatogênicos além de competir por nutrientes e espaço.

Confrontando *S. lignicola*, hoje *Neoscytalidium* sp, com *Trichoderma* spp., Silva et al., (2013) observaram que o isolado biocontrolador foi promissor pois era percebido que havia uma sobreposição das hifas na colônia do fitopatogênicos. Resultados semelhantes foram obtidos no trabalho de Silva et al., (2020b) onde o *Neoscytalidium* sp oriundo de áreas de plantação de mandioca foram confrontados com os isolados de *Trichoderma*. O patógeno mostrou-se muito competitivo por espaço e nutriente devido a sua velocidade de crescimento e colonização que superava a do biocontrolador, mas foi notado a ação do *Trichoderma* spp, hiperparasitando o fitopatogênicos (dados não publicados).

Em relação a antibiose e a competição por alimento, o *Trichoderma* spp. tem como característica a colonização rápida devido a sua velocidade de crescimento e eficiência em assimilar os nutrientes do meio, garantindo seu ciclo biológico (Barbosa & Meza, 2009; Hobbs, 1992).

Para Ethur, (2006), entre as estratégias de *Trichoderma* spp. a mais eficiente é a competição, pois a partir dela se estabelece a disputa por espaço, nutrientes e posteriormente a antibiose e o hiperparasitismo ocorrerão.

A partir do processo de produção de antibiótico pelo biocontrolador, a antibiose se faz mais atuante e mesmo que esteja em concentrações mínimas, elas podem causar interferências metabólicas e fisiológicas paralisando o crescimento, redução e inibição da produção de esporos, degradação por hidrólise e distorção das hifas (Bettiol & Wagner Bettiol, 1991; Carvalho Filho, 2013; Claydon et al., 1987; Dias, 2011; Souza, 2013).

Segundo Amorim et al., (2016) várias substâncias bioativas são sintetizadas por *Trichoderma* spp. tais como gliotoxina, viridina e trichodermina, que interfere no desenvolvimento de fitopatogênicos. O trabalho de Ethur, (2006) concluiu que a gliotoxina foi capaz de interferir da fisiologia de *Pythium ultimum* inibindo o crescimento micelial e a germinação dos esporângios.

O sucessor de um biocontrolador se dá pela capacidade de produzir bioativos enzimáticos capazes de hidrolisar a parede celular que é composta de lipídeo, proteínas, carboidratos, quitina e celulose. Desta forma, o biocontrolador precisa sintetizar lipases, proteases, quitinases, celulase, glucanases etc. Estas enzimas precisam ser produzidas em quantidades necessárias para interromper o processo biológico dos fitopatogênicos e garantir a penetração, antibiose e hiperparasitismo do biocontrolador (Bomfim et al., 2010; Harman et al., 2004; Melo, 1991; Silva, et al., 2020a, 2020b; Souza, 2013).

Outro mecanismo importante para o sucesso dos biocontroladores como *Trichoderma* spp., é o micoparasitismo que tem como estratégia sobreviver dentro ou sobre o fitopatogênicos e dele retirar os nutrientes necessários para seu desenvolvimento. Este tipo de antibiose utiliza as enzimas para penetração e hidrólise causando a morte do fitopatogênicos ou de outro biocontrolador

que esteja em desvantagem nutricional ou enzimática, levando a uma ação de canibalismo que é a relação desarmônica entre indivíduos da mesma espécie onde o mais fraco serve como alimento para o mais forte. (Bomfim et al., 2010; Harman et al., 2004; Silva, et al., 2020a, 2020b; Zucchi, 2010).

Entre as enzimas produzidas por *Trichoderma* spp. que hidrolisam a quitina, a β -1,3-glucanase é a que mais interage no micoparasitismo. Isso se dá devido a maioria dos fitopatógenos terem parede celular rica em quitina (Bauermeister et al., 2010; Giese, 2010; Marcello, 2008).

A forma mais eficiente do micoparasitismo é o necrotrófico, pois este tipo de biocontrole antagoniza fungos que possuem estruturas de resistência como escleródios, clamidósporos e microescleródios (Medeiros et al., 2021; Melo et al., 1998).

O gênero *Trichoderma* spp. se mostra um excelente biocontrolador, devido as características apresentadas, tais como: atividade enzimática capaz de hidrolisar hifas e estruturas de resistência, detectar bioquimicamente as estruturas de fitopatógenos, enrolar, estrangular e penetrar via apressório, e se nutrir do hospedeiro, com isso reduzir a população de fitopatógeno, além de ser de fácil propagação, sobreviver a ambientes desfavoráveis e não oferecer impacto ambiental (Azevedo et al., 2021; Melo et al., 1998; Spiegel & Chet, 1998; Vinale et al., 2008).

Devido à importância da cultura da mandioca e os problemas fitossanitários existentes, este trabalho teve como objetivo identificar através de ferramentas moleculares os isolados de *Trichoderma* spp. que obtiveram o melhor desempenho em inibir o desenvolvimento de *F. falciforme*.

2. Metodologia

Os trabalhos foram conduzidos no laboratório de Fitopatologia e de Fitopatologia Molecular, da Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias (CECA), da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) - Campus Delza Gitaí, em Rio Largo, Estado de Alagoas.

Extração de DNA dos isolados de *Trichoderma* spp

Os isolados utilizados nesse experimento, foram previamente selecionados em trabalho anterior, segundo (Silva et al., 2020a, 2020b).

Discos de micélio de isolados de *Trichoderma* spp, foram transferidos para *Erlenmeyers* com 30 mL de meio líquido sacarose-extrato de levedura-asparagina (Alfenas et al., 2007). Após cinco dias, os micélios foram retirados e os excessos do meio lavados com água destilada esterilizada. Para extração, 200mg do micélio de cada isolado foram transferidos para almofariz e refrigerados a -80°C por cinco minutos. Em seguida, os micélios foram macerados na presença do tampão de extração, conforme o protocolo CTAB (*Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*), segundo (Doyle & Doyle, 1987).

O micélio triturado dos isolados foram transferidos para dois tubos de micro-centrífuga com capacidade de 1,5 mL. Em seguida, adicionou-se 1 mL de tampão de extração (CTAB 4%, NaCl 1,4M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, PVP 1%), 4 μL de β -mercaptoetanol, e depois, os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado 600 μL de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico 24:1). Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, acrescentando-se 400 μL de etanol absoluto.

O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e seco em temperatura ambiente e, em seguida, ressuspensionado com 40 μL de TE (Tris-EDTA; Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM) + RNase (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A qualidade do DNA foi estimada visualmente em gel de agarose 0,8%.

Amplificação do DNA e sequenciamento dos produtos de PCR

Os isolados obtidos foram amplificados com o gene que codifica para a região ITS-rDNA (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição do primer utilizado para identificação dos gêneros fúngicos.

Gene	Primer	Sequencia (5'-3')	Referências
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al., 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

Fonte: Autores (2022).

As reações de PCR foram preparadas com tampão 10X, MgCl₂ 50mM, DNTP's 10mM, 10µM de cada oligonucleotídeo, 1U de *Taq* DNA Polimerase e 1µL de DNA diluído (1:20). O volume final das reações foi ajustado para 60µL com água Milli-Q autoclavada. As reações de PCR ocorreram em termociclador Applied Biosystems (2720 *Thermal Cycler*) nas seguintes condições para a região ITS: desnaturação inicial de 95°C por 2 min e 38 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 30s, 72°C por 45s e um ciclo final de 10 min por 72°C. Em seguida, o produto de PCR foi enviado, para purificação e sequenciamento com os mesmos *primers* utilizados na amplificação, para Macrogen Inc. (Seoul, Coréia do Sul).

Sequenciamento e análises filogenéticas

O sequenciamento foi realizado pela Macrogen Inc. (Seoul, Coréia do Sul) diretamente dos produtos de PCR purificados e posteriormente, comparadas com outras sequências depositadas no *Genbank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), utilizando o programa BlastN (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*), para a identificação preliminar da espécie do fungo com maior porcentagem de identidade. Também foram comparadas com sequências no banco de dados Q-Bank Fungi (<http://www.q-bank.eu/fungi/>) para determinar os gêneros fúngicos com os quais compartilharam maior identidade de sequência.

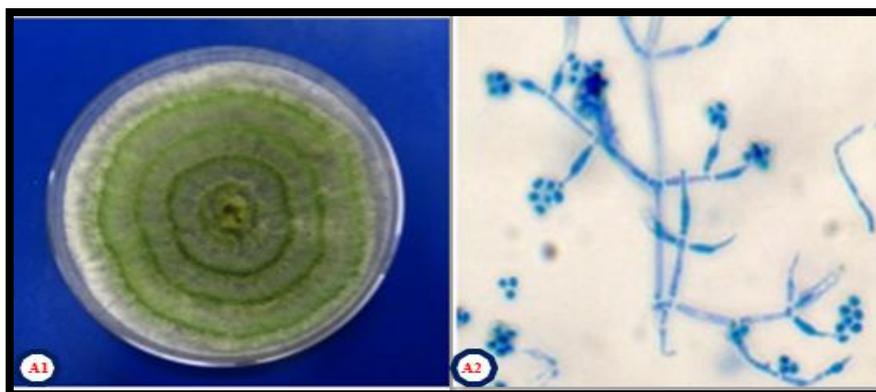
Alinhamentos múltiplos de sequências nucleotídicas foram preparados utilizando-se o algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) e ajustados manualmente no pacote MEGA6 (Tamura et al., 2013). Inferência Bayesiana foi realizada na web portal CIPRES (Miller et al., 2010) usando MrBayes v. 3.2.3 (Ronquist et al., 2012). O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi determinado usando MrModeltest 2.3 (Posada & Buckley, 2004) de acordo com o *Akaike Information Criterion* (AIC). Análises foram rodadas para cada conjunto de dados por 10 milhões de gerações usando quatro cadeias e amostrando a cada 1.000 gerações, para um total de 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas como uma fase de *burn-in*. Probabilidades posteriores (Rannala & Yang, 1996) foram determinadas a partir de uma árvore consenso *majority-rule* gerada com as 7.500 árvores remanescentes. As árvores foram visualizadas e editadas nos programas FigTree v. 1.4 (tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree) e Inkscape (<https://inkscape.org/pt/>).

3. Resultados e Discussão

Identificação molecular de *Trichoderma* spp.

Em experimento anterior, conforme Silva (2016) e Silva et al (2020ab), foram obtidos doze isolados de *Trichoderma* spp. que apresentaram crescimento micelial esbranquiçado que originou rapidamente conidióforos hialinos, agregados e muito ramificados, não verticiliados, fiálides simples ou em grupos, corroborando com (Michereff et al., 1993). Os conídios encontrados eram unicelulares, ovoides, com paredes lisas ou ásperas produzidos em pequenos clusters terminais, de coloração verde ou hialinos se espalhando rapidamente sobre a superfície da colônia, medindo 3,8-4,0 x 3,1-3,7 µm, características de espécies de *Trichoderma* (Figura 1).

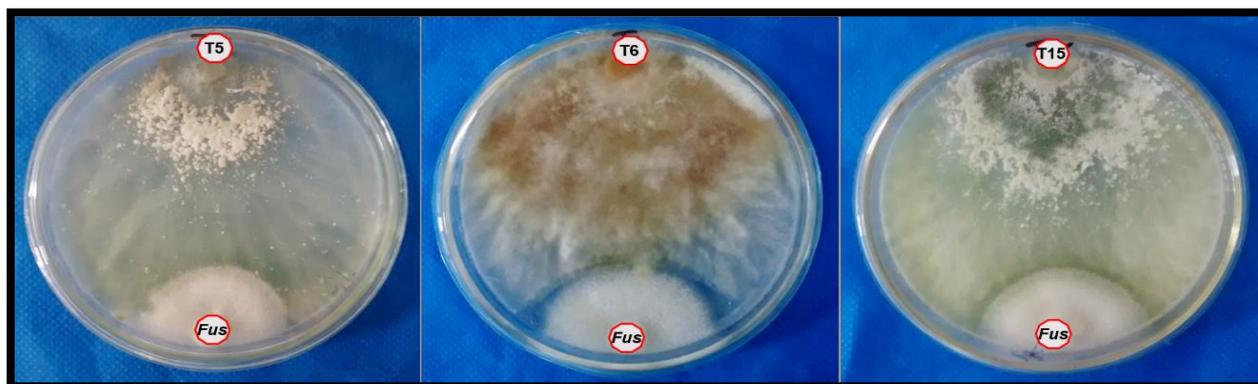
Figura 1. Aspecto da colônia (A1) e estruturas reprodutivas do isolado T6 de *Trichoderma* spp. (A2).



Fonte: Autores (2022).

A partir dos resultados obtidos pela escala adotada, verificou-se que aos sete dias, os 15 isolados de *Trichoderma* spp já provocaram algum grau de inibição no crescimento micelial do fitopatógeno. Após 14 dias foi verificado que os isolados (T1; T2; T3; T5; T6; T9 e T15) obtiveram alta atividade de biocontrole (notas 1) e os isolados (T4; T8; T10; T12 e T14) apresentaram bom desempenho (nota 2). Já os isolados T7 e T13 foram os que obtiveram menor desempenho em sua atividade de biocontrole (Figura 2).

Figura 2. Confronto entre os isolados de *Trichoderma* spp na posição superior e *F. falciforme*. na posição inferior de cada placa, com os isolados T5, T6 e T15.



Fonte: Autores (2022).

O produto da amplificação da PCR com os *primers* ITS1 e ITS4 resultou num fragmento de aproximadamente 550 pares de bases (pb). A análise filogenética baseada nas sequências gênicas da região ITS do DNA do isolado, usando o método de “*maximum Likelihood Tree*” com base em 1000 réplicas de “*bootstrap*”.

Os resultados são aceitáveis para conclusão em nível de espécie, pois, o valor de similaridade encontrado foi 99%. Menezes et al., (2010) e O’Donnell et al., (2000); concluíram em seu trabalho que o sequenciamento da região ITS foi um eficiente método para identificação de *Trichoderma* spp.

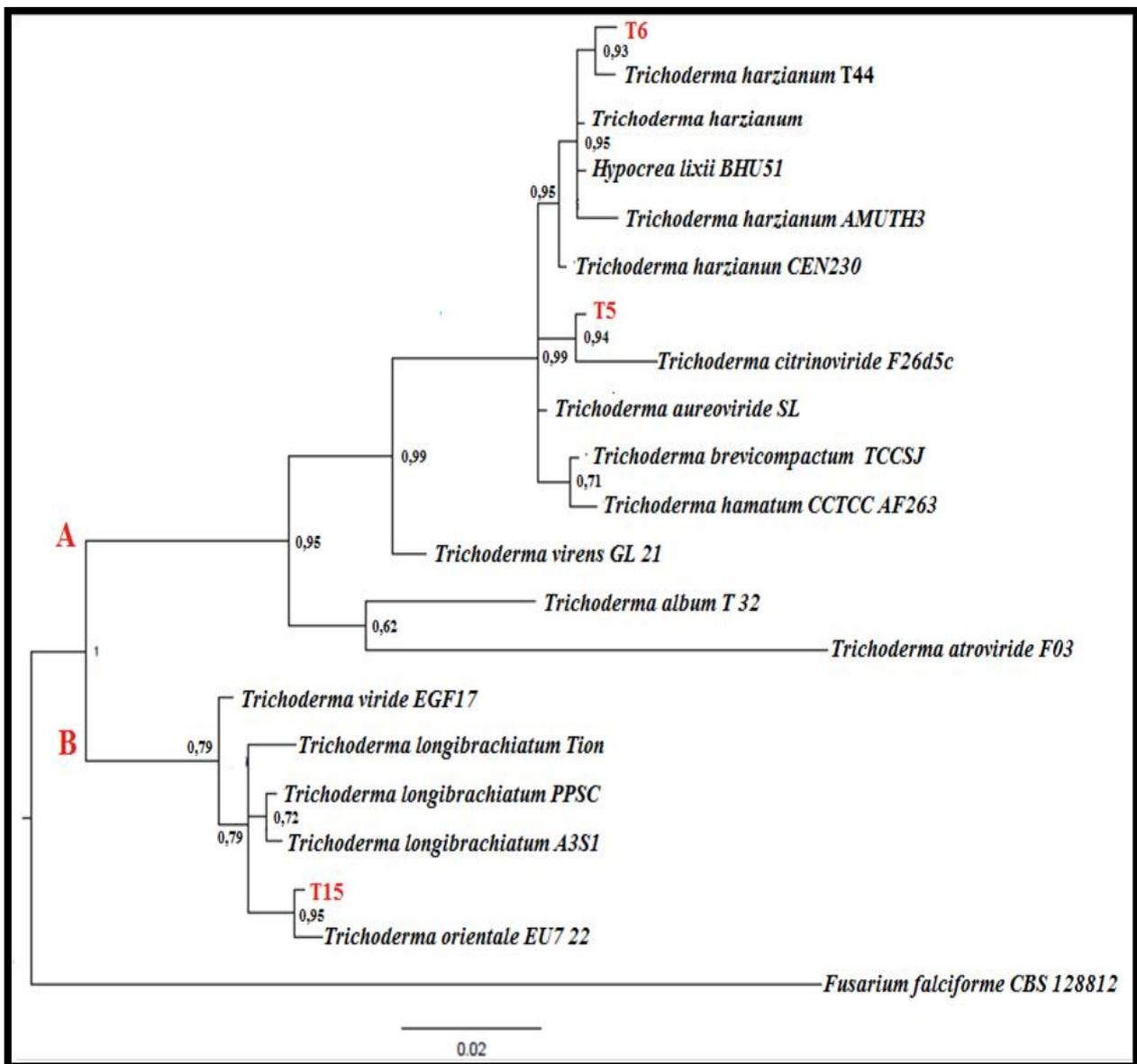
Os isolados de *Trichoderma* T5, T6 e T15 que apresentaram melhor nota na escala de Bell et al., (1982), maior produção de metabolitos secundários, bem como os que tiveram melhor taxa de inibição de *F. falciforme*(Silva, 2016; Silva et al., 2022), foram submetidos a extração de DNA e sequenciamento para identificação molecular e análise filogenética. A árvore filogenética gerada a partir das sequências dos genes ITS1 e ITS5 do rDNA, apresentou dois grandes Clados com suporte de 100%. Estes

clados foram classificados como A, que apresentou o maior número de ramos e também agrupou os isolados T5 e T6 em B, onde ficou agrupado o isolado T15 (Figura 3).

Observando a árvore podemos verificar que T6 agrupou-se no clado A e apresentou 99% de suporte onde estão sequências de *Trichoderma harzianum* e *Hypocrea lixii* sua forma teleomórfica (sexuada), com 95% de similaridade, confirmando então que o isolado em questão seja *Trichoderma harzianum*.

O isolado T5 também apresentou suporte de 99%, igual ao T6, agora identificado como *T. harzianum* e sua similaridade se deu como *Trichoderma citrinoviride* com suporte de 94%, afirmando assim que o isolado seja da mesma espécie. Mais recentemente as formas teleomórficas *Hypocrea lixii*, *H. atroviridis*, *T. harzianum* e *T. atroviride*, foram descobertas e comprovadas através da análise do DNA (Chaverri et al., 2003; Dodd et al., 2003).

Figura 3. Árvore filogenética baseada na região ITS do DNA de *Trichoderma* spp., construída usando o método de “maximum Likelihood Tree”. O isolado de *F. falsiforme* CBS 128812 foi utilizado como “outgroup”. A barra de escala representa mudança de 0,02 e valores de suporte de *bootstrap* de 1000 repetições são apresentados nos ramos.



O isolado T15 se agrupou no clado B, onde apresentou suporte de origem de 100%, mas sua similaridade no ramo em que o ele foi agrupado foi mais baixa. No entanto, a similaridade apresentada foi de 95% com *Trichoderma orientale*. Devido às informações geradas podemos sugerir a espécie deste isolado como a mesma na qual ele foi agrupado na árvore filogenética. Trabalho semelhante foi realizado por Carvalho Filho, (2013), que ao analisar a mesma região genômica, relata que a ITS é suficiente para identificar isolados de *Trichoderma* spp comparando sequências depositadas no NCBI *GeneBank*. (Corabi-Adell, 2005), estudando a filogenia, usando a mesma região, também corrobora com resultados encontrados neste trabalho, ao identificar os isolados de *Trichoderma* spp tomando como suporte a região transcrita. (Reyes-Figueroa et al., 2016) também conseguiu identificar em nível de espécie seus isolados de *Trichoderma* spp, apenas com esta região e com suporte em árvore com score mais baixos que os encontrados neste trabalho. Menezes et al. (2010) concluíram que o sequenciamento da região ITS foi um eficiente método para identificação e separação de isolados de *Trichoderma* spp. Lima- Luz (2012) corrobora com os autores acima citados ao concluir a eficiência na identificação de isolados de *Trichoderma* spp oriundos de solos agrícolas do Norte do Maranhão.

Samuels et al., (2004) em seu estudo não identificou alguns isolados em nível de espécie, devido ao fato desta região ser muito conservada. Por este motivo os isolados que não foram identificados tiveram outra região genômica sequenciada (EF1 — *Translation elongation*) e concatenadas com a transcrita para identificar a espécie destes isolados. Jaklitsch e Voglmayr, (2015) relata que a região RPB1 e RPB2 também são regiões que apresentam elevado número de loci e que dá também um grande suporte para identificação molecular de isolados de *Trichoderma* spp e de sua forma Teleomorfica.

Sánchez e Rebolledo, (2010) comentam que as pesquisas voltadas a biologia molecular com *Trichoderma* ainda são muito escassas e que a partir do estudo realizado por ele com a região ITS foram descritas quatro novas espécies. As árvores filogenéticas geradas mostraram que os isolados foram identificados corretamente, uma vez que os grupos resultaram em ramos contendo indivíduos pertencentes a suas respectivas seções e espécie, com seu alto grau de similaridade, suporte nos cladogramas e nos ramos.

4. Conclusão

A análise filogenética baseada nas sequências gênicas da região ITS do DNA, revelou com 100% de confiabilidade que os isolados são do gênero *Trichoderma*, sendo T5 da espécie *T. citrinoviride* com 99% de similaridade na sequência; T6 da espécie de *T. harzianum* com 95% e T15 da espécie *T. orientale* com 95%.

Os isolados *T. citrinoviride* e *T. orientale* são os primeiros relatos destas espécies atuando como biocontroladores de fitopatógenos em áreas de plantio de mandioca no estado de Alagoas.

Outros trabalhos precisam ser realizados no intuito de identificar novas espécies de *Trichoderma* spp como alternativa biocontrole de fitopatógenos habitantes do solo que causam perdas significativas na cultura da mandioca no Estado de Alagoas.

Referências

- Alfenas, A. C., Ferreira, F. A., Mafia, R. G., & Gonçalves, R. C. (2007). Isolamento de fungos fitopatogênicos. *Métodos em fitopatologia*, 1, 53–91.
- Amorim, L., Rezende, J. A. M., Bergamin Filho, A., & Camargo, L. E. A. (2016). *Manual de fitopatologia*.
- Azevedo, P. F. de, Almeida, A. C. de, Marques, R. D., Costa, C. L., Benedetti, A. R., Lescano, L. E. A. M., Carvalho, M. C. C. G., & Matsumoto, L. S. (2021). In vitro inhibition of *Fusarium solani* by *Trichoderma harzianum* and biofertilizer. *Research, Society and Development*, 10(3), e5210312994–e5210312994. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i3.12994>
- Barbosa, R. J. F., & Meza, C. L. S. (2009). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. Sp *passiflorae* em maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(1), 4743–4748.
- Bauermeister, A., Inês, R., Giese, E., Dekker, R., & Barbosa, A. (2010). Fungal beta-1,3-Glucanases: Production and biotechnological applications. *Semina : Ciências Exatas e Tecnológicas*, 31.

- Bell, D. K., Wells, H. D., & Markham, C. R. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72(4), 379–382.
- Bettiol, W., & Wagner Bettiol, C. (1991). *Controle biológico de doenças de plantas*. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/10080>
- Bomfim, M. P., São José, A. R., Rebouças, T. N. H., Almeida, S. S. de, Souza, I. V. B., & Dias, N. O. (2010). Avaliação antagônica in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. A *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. *Summa Phytopathologica*, 36, 61–67. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052010000100011>
- Carvalho Filho, M. R. de. (2013). *Identificação e relações filogenéticas, potencial de uso de isolados de Trichoderma no controle do mofo branco e como promotores de crescimento do feijoeiro* [Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade de Brasília]. <https://repositorio.unb.br/handle/10482/14254>
- Chaverri, P., Castlebury, L. A., Overton, B. E., & Samuels, G. J. (2003). *Hypocrea/Trichoderma*: Species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia*, 95(6), 1100–1140. <https://doi.org/10.1080/15572536.2004.11833023>
- Claydon, N., Allan, M., Hanson, J. R., & Avent, A. G. (1987). Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 88(4), 503–513. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(87\)80034-7](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(87)80034-7)
- Corabi-Adell, C. [UNESP. (2005). Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (Hypocreales—Fungi) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica. *Aleph*, xviii, 202 f. : il., gráfs., tabs.fots.
- Dias, P. P. (2011). *Controle biológico de fitopatógenos de solo por meio de isolados de fungos do gênero Trichoderma e sua contribuição no crescimento de plantas* [Tese (Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ]. <https://tede.ufrj.br/handle/jspui/2726>
- Dodd, S. L., Lieckfeldt, E., & Samuels, G. J. (2003). *Hypocrea atroviridis* sp. Nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia*, 95(1), 27–40. <https://doi.org/10.1080/15572536.2004.11833129>
- Dos Santos, J. (2010). Atividade hiperparasítica de *Trichoderma* spp. Sobre escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* em solo. In: Seminário de Iniciação Científica E Tecnológica. *Anais...EPAMIG*.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (Orgs.). (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *PHYTOCHEMICAL BULLETIN*, 1(19), 11–15.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Um método de alinhamento de sequências múltiplas com menor tempo e complexidade espacial. *BMC Bioinformatics*, 5(1), 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
- Ethur, L. Z. (2006). *Dinâmica populacional e ação de Trichoderma no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro* [Tese, Universidade Federal de Santa Maria]. <http://repositorio.ufsm.br/handle/1/3189>
- Giese, E. (2010). *Fungal beta-1, 3-Glucanases: Production and biotechnological applications*. 31(2), 78–86.
- Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant disease*, 84(4), 377–393.
- Harman, G. E. (2006). Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2), 190–194. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0190>
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43–56.
- Hobbs, F. C. (1992). *Controle Biológico de doenças em plantas*. In: NETO, A. M. A.; BARAN, C. L. (ed.). *Manual de Controle Biológico*. p.46-51.
- Jaklitsch, W. M., & Voglmayr, H. (2015). Biodiversity of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in Mycology*, 80(1), 1–87. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.11.001>
- Lima- Luz, R. (2012). *Identificação e aspectos de biocontrole de isolados de Trichoderma spp. Oriundos de solos agrícolas do Norte do Maranhão*. [Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária)]. Universidade Ceuma.
- Marcello, C. M. (2008). *Avaliação da expressão e caracterização de uma exo-β-1,3-glucanase envolvida no mecanismo de micoparasitismo de Trichoderma asperellum* [Tese (Doutorado em Biologia Molecular), Universidade de Brasília]. <https://repositorio.unb.br/handle/10482/3503>
- Medeiros, E. V. de, Silva, L. F., Silva, J. S. A., Costa, D. P., Souza, C. A. F., Berger, L. R. R., Lima, J. R. de S., & Hammecker, C. (2021). Biochar and *Trichoderma* spp. in management of plant diseases caused by soilborne fungal pathogens: A review and perspective. *Research, Society and Development*, 10(15), e296101522465–e296101522465. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i15.22465>
- Melo, I. S. de, Azevedo, J. L., & Itamar Soares de Melo, C. (1998). *Ecologia microbiana*. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/13052>
- Melo, I. S. (1991). *Potencialidades da utilização de Trichoderma spp. No controle biológico de doenças de plantas*. In: BETTIOL, W. (Ed.). *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna. p.135-156.
- Menezes, J. P., Lupatini, M., Antonioli, Z. I., Blume, E., Junges, E., & Manzoni, C. G. (2010). Variabilidade genética na região its do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Chrysanthemi*. *Ciência e Agrotecnologia*, 34, 132–139. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000100017>
- Michereff, S. J., Menezes, M., & Mariano, R. L. R. (1993). *Potencial de Trichoderma para o controle da antracnose do sorgo*. 18, . 392-398.

- Miller, A., Chen, J., Takasuka, T. E., Jacobi, J. L., Kaufman, P. D., Irudayaraj, J. M., & Kirchmaier, A. L. (2010). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is required for cell cycle-regulated silent chromatin on replicated and nonreplicated genes. *Journal of Biological Chemistry*, 285(45), 35142–35154.
- O'Donnell, K., Nirenberg, H. I., Aoki, T., & Cigelnik, E. (2000). A Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*, 41(1), 61–78. <https://doi.org/10.1007/BF02464387>
- Otsubo, A. A., & Lorenzi, J. O. (2004). *Cultivo da Mandioca na Região Centro-Sul do Brasil. 1*, 119.
- Posada, D., & Buckley, T. R. (2004). Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches Over Likelihood Ratio Tests. *Systematic Biology*, 53(5), 793–808. <https://doi.org/10.1080/10635150490522304>
- Rannala, B., & Yang, Z. (1996). Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*, 43(3), 304–311. <https://doi.org/10.1007/BF02338839>
- Reyes-Figueroa, O., Ortiz-García, C. F., Torres-de la Cruz, M., Lagunes-Espinoza, L. del C., Valdovinos-Ponce, G., Reyes-Figueroa, O., Ortiz-García, C. F., Torres-de la Cruz, M., Lagunes-Espinoza, L. del C., & Valdovinos-Ponce, G. (2016). *Trichoderma* species from the cacao agroecosystem with biocontrol potential of *Moniliophthora roreri*. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 22(2), 149–163. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2015.08.036>
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Samuels, G. J., Chaverri, P., Farr, D. F., & McCray, E. B. (2004). *USDA, Beltsville, USA. Trichoderma online systematic Botany and Mycology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved September 20, 2004.*
- Sánchez, V., & Rebolledo, O. (2010). *Trichoderma* species in soil cultivated with *Agave tequilana* in Los Altos South region, Jalisco and assessment of their antagonistic capacity against *Thielaviopsis paradoxa*. *Revista mexicana de micología*, 32, 11–18.
- Santos, A. F. dos, Xavier, J. J. B. N., Dias, M. C., Lozano, J. C., & Fukuda, C. (2005). *Controle cultural da podridão das raízes da mandioca causada por Phytophthora*. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/676627>
- Silva, C. A. D., Medeiros, E. V. de, Bezerra, C. B., Silva, W. de M., Barros, J. A., & Santos, U. J. dos. (2013). Interferência da incorporação de matéria orgânica no solo no controle da podridão negra da mandioca, causada por *Scytalidium lignicola*. *Biosci. j.(Online)*, 1823–1831.
- Silva, I. O., Amorim, E. P. da R., Nascimento Junior, N. A., Assunção, I. P., Carnaúba, J. P., Peixinho, G. S., Santos, M. Q. C., & Araujo Neto, V. F. de. (2020a). *Identificação de patógenos causadores da podridão radicular da mandioca (Manihot esculenta CRANTZ) e biocontrole de Trichoderma spp sobre Fusarium sp*. <https://doi.org/10.37423/200702008>
- Silva, I. O., Amorim, E. P. da R., Nascimento Junior, N. A., Assunção, I. P., Carnaúba, J. P., Peixinho, G. S., Santos, M. Q. C., & Araujo Neto, V. F. de. (2020b). *Identificação de patógenos causadores da podridão radicular da mandioca (Manihot esculenta CRANTZ) e biocontrole de Trichoderma spp sobre Fusarium sp. Em Biodiversidade, Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável (3ª, Vol. 3, p. 584f). João Luis Ribeiro Ulhôa*. <https://doi.org/10.37423/200702008>
- Silva, I. O., Amorim, E. P. R., Nascimento Junior, N. A., Carnauba, J. P., Araújo Neto, V. F., & Peixinho, G. S. (2022). The first report about *Fusarium falciforme* that causes root rot in cassava cv Rosinha, in Alagoas state, Brazil. *Research, Society and Development*, 11(12), e221111234369. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i12.34369>
- Souza, J. R. (2013). *Potencialidade de fungicida e agente biológico no controle de requeima do tomateiro* [Dissertação (Mestrado em Agronomia)]. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.
- Spiegel, Y., & Chet, I. (1998). Evaluation of *Trichoderma* spp. As a Biocontrol Agent Against Soilborne Fungi and Plant-parasitic Nematodes in Israel. *Integrated Pest Management Reviews*, 3(3), 169–175. <https://doi.org/10.1023/A:1009625831128>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>
- Zucchi, F. O. (2010). *Trichoderma* sp. Em áreas agrícolas visando o controle de doenças fúngicas de raízes de plantas cultivadas. Campinas SP. *JV Biotecnologia*, 15p.