



KIZE ALVES ALMEIDA

Trichoderma: diversidade genética e fusão de
protoplastos

LAVRAS-MG

2016

KIZE ALVES ALMEIDA

Trichoderma: diversidade genética e fusão de protoplastos

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de mestre.

Orientador: Dr. Jorge Teodoro de Souza

LAVRAS – MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Almeida, Kize Alves.

Trichoderma : diversidade genética e fusão de protoplastos /
Kize Alves Almeida. - 2016.

54 p. : il.

Orientador(a): Jorge Teodoro de Souza.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Bibliografia.

1. Filogenia. 2. Fungos endofíticos. 3. Recombinantes. I. de
Souza, Jorge Teodoro. . II. Título.

KIZE ALVES ALMEIDA

Trichoderma: diversidade genética e fusão de protoplastos

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 16 de setembro de 2016.

Dr. Alan William V. Pomella - Laboratório Farroupilha - Lallemand

Dra. Sarah S. Costa Guimarães - UFLA

Dr. Jorge Teodoro de Souza

Orientador

Lavras – MG

2016

Aos meus pais, Carlos e Leni, pelo incentivo e confiança.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os colegas de curso, em especial: Camila Nicolli, Thaíssa Farias e Gláucia Moreira pelos conhecimentos compartilhados.

Aos técnicos, Ana Maria dos Santos e Edson Rezende, pela paciência e disponibilidade.

Ao professor Jorge Teodoro pela oportunidade, aprendizado e desafios propostos.

Ao meu namorado Lucas pelos anos de amizade, compreensão e companheirismo.

Ao Laboratório de Biocontrole Farroupilha – Lallemand e ao Dr. Alan Pomella pela parceria.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização desse trabalho e para a minha formação profissional.

RESUMO

Trichoderma é um gênero que desperta a atenção de pesquisadores de várias áreas devido a sua diversidade de espécies com importância industrial, médica e biotecnológica. Nesse trabalho, dividido em três capítulos, buscou-se no primeiro fazer uma revisão de literatura sobre o assunto; no segundo conhecer a diversidade de *Trichoderma* spp. associada a plantas de cacau (*Theobroma cacao*); e no terceiro melhorar isolados de *Trichoderma* utilizados em formulações comerciais quanto à tolerância a baixas temperaturas por meio da fusão de protoplastos. Para o estudo de diversidade, amostras de troncos e ramos de cacau foram coletadas aleatoriamente em uma lavoura em Ilhéus (Bahia) até a obtenção de cem isolados morfologicamente semelhantes a *Trichoderma* spp. Foram obtidos 83 isolados endofíticos e 17 epifíticos. A identificação foi realizada com base no sequenciamento das regiões ITS e *TEF* e a filogenia realizada com base no alinhamento de 896 pares de bases. As espécies identificadas estão distribuídas dentro de cinco grupos: 1) *Harzianum*, 2) *Virens*, 3) *Longibrachiatum*, 4) *Brevicompactum* e 5) *Trichoderma*. *Trichoderma lentiforme* representou 56,6% dos endófitos e *T. parareesei* foi isolado apenas de ramos mortos do solo. Sete isolados representam seis prováveis novas espécies e serão descritos em um trabalho futuro. Protoplastos foram obtidos dos isolados 427 (*T. harzianum*) e 691PR (*T. asperellum*), selecionados com base no diâmetro de crescimento micelial a 10°C e resistência a fungicidas, respectivamente. A maior liberação de protoplastos foi obtida após 20-24 h de crescimento micelial e 2 h de digestão enzimática utilizando MgSO₄ como estabilizador osmótico. Esses resultados contribuem para o aumento do conhecimento sobre a diversidade de *Trichoderma* em associação com cacau e iniciam o melhoramento de uma formulação comercial por meio da fusão de protoplastos.

Palavras-chave: filogenia, diversidade, cacau, endófitos, baixas temperaturas, recombinantes.

ABSTRACT

Trichoderma is a fungal genus that attracts the attention of researchers worldwide due to its diversity and potential industrial, medical and biotechnological importance. In this work, divided into three chapters, we sought to review the literature in the first chapter; study the diversity of *Trichoderma* spp. associated with cacao (*Theobroma cacao*) in the second; and improve *Trichoderma* isolates used in commercial formulations for low temperature tolerance through protoplast fusion in the third chapter. For the diversity studies, samples of sapwood and dead cacao branches were collected in a plantation located in Ilheus (Bahia) to obtain one hundred isolates morphologically similar to *Trichoderma* species. A total of 83 endophytes from sapwood and 17 epiphytes from dead branches were obtained. The identification was based on the sequencing of the ITS and *TEF* regions and phylogeny was based on the alignment performed with 896 base pairs. The identified species belong to five clusters: 1) *Harzianum*, 2) *Virens*, 3) *Longibrachiatum*, 4) *Brevicompectum* and 5) *Trichoderma*. *Trichoderma lentiforme* represented 56.6% of all endophytes and most of the epiphytes isolates were identified as *T. parareesei*. Six putative novel species were identified among the isolates and these will be further investigated and described in the future. Studies with protoplasts were performed with isolates 427 (*T. harzianum*) and 691PR (*T. asperellum*), selected on the basis of mycelial growth diameter at 10°C and resistance to fungicides, respectively. The highest protoplast release was observed after 20-24 h of spore incubation and after 2 h of digestion using MgSO₄ as osmotic stabilizer. These results contribute to increase our knowledge on the diversity of *Trichoderma* in association with cacao and begins to explore the improvement of a commercial formulation by protoplast fusion.

Key-words: phylogeny, diversity, cocoa trees, endophytes, low temperatures, recombinant.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO 1 | 9 |
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 9 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 11 |
| 2.1 O gênero <i>Trichoderma</i> | 11 |
| 2.2 Taxonomia | 12 |
| 2.3 Diversidade genética de <i>Trichoderma</i> | 13 |
| 2.3 <i>Trichoderma</i> na agricultura | 14 |
| 2.4 Fusão de protoplastos | 16 |
| 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 19 |
| CAPÍTULO 2 ARTIGO | 24 |
| Abstract | 24 |
| CAPÍTULO 3 FUSÃO DE PROTOPLASTOS DE <i>Trichoderma</i> spp. VISANDO À TOLERÂNCIA A BAIXAS TEMPERATURAS | 37 |
| 1 INTRODUÇÃO | 39 |
| 2.1 Isolados | 39 |
| 2.3 Obtenção de mutantes resistentes a fungicidas | 41 |
| 2.4 Obtenção de protoplastos | 41 |
| 2.5 Fusão e regeneração dos protoplastos | 42 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 43 |
| 3.1 Crescimento em diferentes temperaturas | 43 |
| 3.2 Obtenção de mutantes resistentes a fungicidas | 45 |
| 3.3 Obtenção de protoplastos | 47 |
| 3.4 Fusão e regeneração dos protoplastos | 50 |
| 4 CONCLUSÃO | 51 |
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 52 |

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

Trichoderma é um dos gêneros de fungos filamentosos mais estudados mundialmente. Esse fato se deve a sua distribuição cosmopolita e alta diversidade genética e metabólica. São tipicamente fungos habitantes de solo, endófitos de plantas, decompositores de matéria orgânica e parasitas de outros fungos (EVANS; HOLMES; THOMAS, 2003; HANADA et al., 2010; JAKLITSCH; VOLGMAYR, 2015; SAMUELS et al., 2002). Uma das espécies de maior importância para a indústria biotecnológica, *T. reesei*, é altamente eficaz na produção de enzimas celulolíticas, além de ser utilizado na indústria de biocombustíveis. Além disso, vários genes de *Trichoderma* spp. são expressos em plantas e em outros microrganismos para maior tolerância a estresses abióticos, degradação de compostos tóxicos e maior resistência a doenças (DIXIT et al., 2011). Outro fato interessante é a frequente ocorrência de algumas espécies como patogênicas para humanos imunocomprometidos. A espécie *T. longibrachiatum* é comprovadamente a mais representativa nessas associações (SANDOVAL-DENIS et al., 2014).

Trichoderma é o mais importante agente de biocontrole de doenças de plantas do mundo. Este fato é comprovado pelos inúmeros produtos disponíveis no mundo. Na Índia existe mais de 250 formulações a base de *Trichoderma* comercializadas (KUMAR et al., 2012). No Brasil, a área tratada com esse antagonista em 2010 foi de 1.200.000 ha com custo médio de R\$90/ ha para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoeiro (BETTIOL, 2011).

A adoção do controle biológico vem sendo crescente nos últimos anos devido à busca por produtos alimentícios livres de agrotóxicos e que

sejam produzidos racionalmente. *Trichoderma harzianum* é a principal espécie desse gênero utilizada como agente de biocontrole de doenças, representando 38% das formulações disponíveis no mercado (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Outra espécie amplamente utilizada no controle biológico de doenças de plantas é *T. stromaticum*, um dos principais responsáveis pelo controle de *Moniliophthora perniciosa*, agente etiológico da vassoura de bruxa no cacau, que devastou a produção de cacau no final da década de 1980. O Brasil é o quinto principal produtor de cacau, atrás da Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Nigéria e Camarões. A Bahia é o maior produtor do Brasil e detém mais de 60% da produção nacional (CEPLAC, 2015). O cacau é uma cultura de grande importância econômica e social para o país. É utilizado pela indústria alimentícia para a produção de chocolate e também pela indústria cosmética. Nos últimos anos, a comunidade de *Trichoderma* spp. associada a essa cultura tem sido estudada em busca de se conhecer a diversidade genética desses fungos e identificar potenciais agentes de biocontrole (HANADA et al., 2008). Um exemplo recente é a espécie *T. martiale*, isolada como endófito em troncos de cacau e com potencial para o controle biológico de *Phytophthora palmivora* (HANADA et al., 2010).

O biocontrole de doenças de plantas pode ser fortemente afetado pelas condições ambientais como temperatura, disponibilidade de água, pH e presença de outros microrganismos. Em especial, baixas temperaturas são limitantes para o sucesso do controle biológico durante o inverno. A maioria das espécies de *Trichoderma* são mesofílicas e perdem a eficácia no controle de patógenos adaptados a baixas temperaturas (KREDICS et al., 2003; PAULA JÚNIOR et al., 2012).

Uma alternativa para melhorar a capacidade de crescimento do antagonista em condições adversas é a fusão de protoplastos, que possibilita recombinar espécies ou isolados incompatíveis, muitas vezes melhorando a característica de interesse. Em vista disso, esse trabalho buscou no primeiro

capítulo fazer uma revisão da literatura sobre *Trichoderma*; no segundo capítulo estudar a diversidade genética de *Trichoderma* em associação com o cacauero; e no terceiro capítulo iniciar estudos de fusão de protoplastos para melhorar a tolerância de isolados utilizados no biocontrole de doenças a baixas temperaturas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O gênero *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* Pers. (1794) é atualmente um dos gêneros de fungos mais estudados devido a sua versatilidade e importância biotecnológica. Pertence ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, subclasse Hypocreomycetidae, ordem Hypocreales e família Hypocreaceae. De acordo com o Código Internacional de Nomenclatura de Algas, Fungos e Plantas, desde janeiro de 2013 fungos pleomórficos anteriormente caracterizados por dois nomes passaram a adotar uma única nomenclatura para as duas fases reprodutivas (PRADO; HIRAI; GIULIETTI, 2011). No caso de *Trichoderma* Pers. (1794), publicado antes da fase sexuada, *Hypocrea* Fr. (1825), convencionou-se o nome *Trichoderma*, determinado pela lei de prioridade e por preferência dos pesquisadores, representados pela Subcomissão Internacional de *Trichoderma* e *Hypocrea* (ISTH). Até o momento, 252 espécies foram descritas (BISSETT et al., 2015).

Trichoderma possui uma ampla diversidade genética e metabólica de espécies adaptadas aos mais diferentes ecossistemas. São fungos tipicamente oportunistas. Podem ser encontrados no solo, onde desempenham funções determinantes para a manutenção desse ecossistema como a decomposição de matéria orgânica e xenobióticos, como endofíticos de plantas (Evans; Holmes; Thomas et al., 2003) patógenos de outros fungos (Samuels et al.,

2002) e atuar como agentes de biocontrole de doenças de plantas (DRUZHININA et al., 2011; HARMAN et al., 2004). Além disso, possui espécies de importância médica como *T. longibrachiatum* e *T. koningiopsis*, que são encontrados como patógenos de humanos, embora outras espécies tenham sido relatadas (SANDOVAL-DENIS et al., 2014).

2.2 Taxonomia

Quase dois séculos após a criação do gênero *Trichoderma*, Rifai (1969) propôs o conceito de “espécies agregadas” baseado em características micromorfológicas. A partir da revisão de Rifai, outros estudos foram realizados e as espécies agrupadas em cinco seções: a) *Longibrachiatum*, b) *Pachybasium*, c) *Trichoderma*, d) *Hypocreanum* e e) *Saturnisporum* (a qual foi incluída em *Longibrachiatum*) por Bissett, (1984, 1991a–c, 1992) e Doi et al. (1972) de acordo com os padrões de ramificação do conidióforo e disposição dos conídios. O conceito de espécie morfológica em *Trichoderma* deve ser utilizado somado a métodos moleculares uma vez que esses fungos apresentam sinapomorfia em relação aos caracteres morfológicos utilizados para a identificação das espécies. Já o conceito de espécie biológica não se aplica à *Trichoderma* devido à dificuldade de obtenção da fase sexuada em cruzamentos controlados.

Atualmente várias ferramentas moleculares estão disponíveis para auxiliar na rápida identificação de espécies de *Trichoderma* como o *TrichOKey* (Druzhinina e Kubicek, 2005), *TrichoBLAST* (Kopchinskiy et al., 2005) e *TrichoCHIT* (NAGY et al., 2007). A região ITS1-2 oferece subsídios para identificação de *Trichoderma* spp. mas é insuficiente para distinguir espécies dentro do mesmo clado (Druzhinina e Kubicek, 2005) principalmente quando se trata do complexo de espécies *T. harzianum* (CHAVERRI et al., 2015). Isso ocorre devido ao baixo polimorfismo dessa região.

Sandoval-Denis et al. (2014) encontraram uma concordância de 49,3% entre identificação morfológica e molecular de espécies de *Trichoderma* clinicamente relevantes. Isso mostra a importância de métodos moleculares adicionais para a correta identificação desses fungos. Com isso, regiões que possuem maior polimorfismo têm sido utilizadas para diferenciar as espécies de *Trichoderma* tais como fator de alongação 1-alfa (*tef1*), actina (*act*), calmodulina (*cal*), endoquitinase (*chi18-5 = ech42*) e RNA polimerase II (*rpb2*) embora alguns autores discutam que *TEF* é suficiente (CHAVERRI et al., 2015).

2.3 Diversidade genética de *Trichoderma*

O estudo da diversidade genética de qualquer micro-organismo possibilita o descobrimento de novas espécies e o papel que estas desempenham no ecossistema em que se encontram. Vários trabalhos destacam a diversidade de *Trichoderma* em solo (Kredics et al., 2012; Migheli et al., 2009; Zachow et al., 2009), embora o número de estudos referentes à diversidade em outros nichos como endofíticos e epifíticos de plantas, parasitas de outros fungos e patogênicos de humanos sejam crescentes (CHAVERRI et al., 2015; JAKLITSCH e VOGLMAYR, 2015; HATVANI et al., 2007; SANDOVAL-DENIS et al., 2014).

Jaklitsch e Voglmayr (2015) identificaram 652 isolados em nível de espécie em seis países no sul da Europa coletados em madeira em decomposição e em outros fungos, dentre os quais 17 novas espécies foram descritas. Sandoval-Denis (2014) obtiveram 73 isolados de *Trichoderma* spp. de amostras clínicas de humanos e outros animais, das quais 40% foram amostradas do trato respiratório de humanos e uma nova espécie *T. bissettii* foi descrita. Estes autores encontraram *T. longibrachiatum* (26%) como a espécie mais frequente seguido de *T. citrinoviride*, complexo de espécies *T. harzianum*, *T. bissettii* e *T. orientale*. Gazis e Chaverri (2010) estudaram a diversidade de fungos endofíticos de seringueira (*Hevea brasiliensis*)

isolados de folhas e alburno. De 175 isolados, 22% corresponderam ao gênero *Trichoderma* e 82% a espécies do complexo *T. harzianum* e 18% a *T. koningiopsis*. Hoyos-Carvajal; Orduz; Bissett, (2009) identificaram 18 espécies de *Trichoderma* em 183 isolados de solos tropicais.

Fungos endofíticos são caracterizados por viverem assintomaticamente em tecidos de plantas e estabelecerem uma relação mutualística com seus hospedeiros. Evans; Holmes; Thomas (2003) isolaram mais de 40 gêneros de fungos endofíticos de caules e frutos de *Theobroma gileri* sadios, sendo *Trichoderma* spp. um dos principais representantes. Várias espécies de *Trichoderma* foram isoladas de tecidos de *Theobroma* spp. a exemplos de: *Trichoderma caribbaeum* var. *aequatoriale* (Samuels et al., 2006), *T. evansii* (Samuels e Ismaiel, 2009), *T. koningiopsis* (Samuels et al., 2006), *T. lieckfeldtia* e *T. martiale* (Hanada et al., 2008), *T. endophyticum*, *T. lentiforme* e *T. rifaii* (CHAVERRI et al., 2015). Estudos de biodiversidade de *Trichoderma* endofíticos de cacau para o biocontrole de doenças dessa cultura têm sido realizados (HANADA et al., 2008).

2.3 *Trichoderma* na agricultura

Trichoderma spp. é o agente de biocontrole de doenças de plantas mais utilizado no mundo com inúmeros produtos disponíveis no mercado. Em 2010, a área tratada com esse bioagente no Brasil correspondeu a 1.200.000 ha (BETTIOL, 2011). Vários estudos apontam uma ampla gama de benefícios proporcionados às plantas e ao ambiente por esses fungos como proteção contra fitopatógenos e herbívoros, promoção do crescimento vegetal, aumento da tolerância a estresses abióticos e indução de resistência sistêmica (HERMOSA et al., 2012).

Trichoderma spp. são utilizados principalmente no controle de doenças causadas por fungos de solo, oomicetos e nematóides. O controle biológico de doenças de plantas é caracterizado pela redução da densidade de inóculo ou agentes determinantes da doença causada por um patógeno e

controlada por um ou mais organismos (Cook e Backer, 1983) e é o resultado da interação entre patógeno, hospedeiro e antagonista(s), fortemente influenciados pelo ambiente.

Bons agentes de biocontrole se caracterizam pela ampla distribuição no ambiente e alta capacidade de competição seja por micoparasitismo, produção de antibióticos ou competição por nutrientes. *Trichoderma* possui vários mecanismos de ação como antibiose, competição, indução de resistência e micoparasitismo. Harman et al. (2004) relataram indução de resistência em plantas por *Trichoderma* contra os mais diversos patógenos: oomicetos, fungos, bactérias e vírus. Entretanto, o micoparasitismo é o principal mecanismo de biocontrole utilizado pelos fungos desse gênero (HERRERA-ESTRELLA e CHET, 2003).

O micoparasitismo é um processo complexo que se caracteriza pelo ataque direto do patógeno pelo antagonista. Em *Trichoderma*, envolve o reconhecimento e crescimento em direção à presa, contato e enrolamento das hifas com posterior formação de apressório, seguido de produção de enzimas de lise da parede celular, morte do hospedeiro e subsequente consumo da biomassa pelo micoparasita (HARMAN et al., 2004; HERRERA-ESTRELLA e CHET, 2003). A produção de enzimas líticas por espécies de *Trichoderma* como protease, β -glucosidase e quitinase desempenha um papel importante na degradação da parede celular de fungos patogênicos (Hassan, 2014) e é utilizada como produto comercial, para obtenção de protoplastos como a enzima Glucanex, derivada de *T. harzianum*.

Apesar de todos os benefícios e sucesso da utilização de *Trichoderma* como agente de biocontrole, alguns fatores bióticos e abióticos podem interferir no seu crescimento e, conseqüentemente, na sua eficácia em controlar doenças no campo. Begoude et al. (2007) estudaram o efeito combinado da temperatura, pH e atividade da água na taxa de crescimento de quatro isolados de *T. asperellum* e verificaram que a atividade de água é o fator limitante para o bom crescimento desses fungos, não sendo significativamente afetados pela temperatura ou pH em condições

controladas. Já outros trabalhos demonstraram que a temperatura é um fator limitante para o crescimento e eficácia de *Trichoderma* como agente de biocontrole (PAULA JÚNIOR et al., 2012; VARGAS HOYOIS et al., 2012).

Paula Júnior et al. (2012) avaliaram o efeito do isolado *T. harzianum* (LQC 88) e quatro isolados de produtos comerciais: *T. harzianum* (Trichodermil SC), *T. asperellum* (Quality WG), *Trichoderma* spp. (Trichodel Solo) e *Trichoderma* spp. + *T. harzianum* (Trichoplus) no controle de mofo branco no período de junho a agosto de 2008, com temperaturas médias variando de 15,4° a 18,4°C e alta umidade relativa. Nenhum dos produtos avaliados foi capaz de reduzir a intensidade e severidade da doença quando comparados ao controle (sem tratamento) nas condições supracitadas.

2.4 Fusão de protoplastos

A fusão de protoplastos é uma importante ferramenta para a manipulação genética de microrganismos de importância biotecnológica, amplamente utilizada para o melhoramento de fungos filamentosos (Hassan et al., 2014; Fahmi et al., 2012), leveduriformes e micorrízicos (DIAS et al., 1996). Protoplastos são células desprovidas de parede celular, as quais são removidas pela ação de enzimas líticas, tornando-as permeáveis e receptoras à entrada do DNA exógeno. Essa técnica permite a recombinação de linhagens incompatíveis e pode ser realizada entre microrganismos da mesma espécie ou entre espécies diferentes (BALASUBRAMANIAN et al., 2008; DILLON et al., 2008).

A técnica consiste na digestão da parede celular das células, seguida da fusão dos protoplastos em solução de polietilenoglicol e regeneração em meio de cultivo osmoticamente regulado. Em *Trichoderma*, a técnica tem sido utilizada para aumentar o potencial de biossíntese de enzimas (ex. celulolíticas e quitinolíticas) e antibióticos, tolerância a metais pesados e a estresses abióticos, controle de patógenos e para melhorar a competência na

rizosfera (BALASUBRAMANIAN et al., 2012; DILLON et al., 2008; FAHMI; AL-TALHI; HASSAN, 2012; HASSAN, 2014;).

Protoplastos podem ser obtidos a partir de micélio, conídios ou corpos de frutificação. Sua obtenção e regeneração podem ser influenciadas por diversos fatores como: a) idade do material biológico a ser utilizado; b) estabilizador osmótico, que deve proporcionar um alto rendimento de protoplastos; c) o composto lítico utilizado, que pode influenciar tanto na obtenção como na regeneração dos protoplastos e d) condições de regeneração como temperatura, pH e inoculação dos protoplastos (DILLON et al., 2008; ISHIKAWA et al., 2010).

O exemplo de maior sucesso no emprego da fusão de protoplastos na agricultura é do isolado T-22, obtido pela fusão de dois isolados de *T. harzianum* visando aumentar a capacidade de competência na rizosfera (STASZ et al., 1988). Esse isolado foi testado contra os mais diversos patógenos de solo em várias culturas (Harman et al., 1989; Sivan et al., 1991) e atualmente é comercializado como biofungicida em diversas formulações pela BioWorks Inc. nos Estados Unidos.

Para a aplicação da técnica de fusão de protoplastos é necessária a obtenção de mutantes auxotróficos ou linhagens mutantes resistentes a fungicidas para seleção dos recombinantes (PEBERDY, 1979). Dillon et al., (2008) utilizaram benomyl, ciclohexamida e nystatin para a seleção de isolados resistentes de *Penicillium echinulatum* e *Trichoderma harzianum* antes da fusão. O método tradicional de fusão de protoplastos utiliza um agente de seleção (ex. fungicida) para cada linhagem a ser fusionada. No entanto, outro método conhecido como “doador morto” consiste na obtenção de apenas um mutante resistente a fungicida, o qual tem seus protoplastos inativados por choque térmico (60 a 70°C) e tem seus protoplastos fundidos com os da linhagem sensível ao mesmo fungicida utilizado. Esta técnica é mais empregada na fusão de protoplastos de bactérias (AZEVEDO, 1998).

Após a fusão dos protoplastos, as células necessitam ter a parede celular regenerada em meio de cultivo osmoticamente regulado. A

regeneração e posterior haploidização das células dos fusantes são fatores determinantes do sucesso da fusão. Dillon et al. (2008) obtiveram 17 fusantes de *Penicillium echinulatum* e *Trichoderma harzianum*, no entanto após cinco ciclos de haploidização a característica de interesse foi perdida. Ao contrário, Hassan (2014) obteve fusantes de *T. harzianum* e *T. viride* com alta atividade antagonista contra *Pythium ultimum*, *Sclerotium rolfsii* e *Macrophomina phaseolina*.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismos**: volume 1. Goiânia: Editora UFG, 1998.

BALASUBRAMANIAN, N.; LALITHAKUMARI, D. Characteristics of protoplast inter, intra-fusant and regeneration of antagonistic fungi *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride*. **African Journal of Biotechnology**, Ponta Delgada, v. 7, n. 18, p. 3235-3243, Sept. 2008.

BEGOUDE, B. A. D. et al. Response surface methodology study of the combined effects of temperature, pH, and aw on the growth rate of *Trichoderma asperellum*. **Journal of Applied Microbiology**, Yaounde', v. 103, n. 1, p. 845–854, Dec. 2007.

BETTIOL, W. Biopesticide use and research in Brazil. **Outlooks on Pest Management, Hemel Hempstead**, Jaguariúna, v. 22, n. 6, p. 280-283, dez. 2011.

BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. **Canadian Journal of Botany**, v. 62, n. 5, p. 924-931, 1984.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Intrageneric classification. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 60, n. 1, p. 2357–2372, 1991a.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, n. 1, p. 2373–2417, 1991b.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, n. 1, p. 2418–2420, 1991c.

BISSETT, J. et al. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. **IMA Fungus**, v. 6, n. 2, p. 263–295, dez. 2015.

BISSETT, J. *Trichoderma atroviride*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 70, n. 3, p. 639–641, 1992.

CEPLAC - Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2015/11/retomada-das-exportacoes-de-cacau-da-novo-animo-aos-produtores>>. Acesso em: 16 jan. 2016.

CHAVERRI, P. et al. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the reidentification of commercial biocontrol strains. **Mycologia**, Lawrence, v. 107, n. 3, p. 558–590, May/June 2015.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. 2. ed. Saint Paul: APS Press, 1983. 539 p.

DIAS, E. S. et al. Production and regeneration of protoplasts from the mycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 12, p. 625–628, Nov. 1996.

DILLON, A. J. P. et al. Generation of recombinants strains to cellulases production by protoplast fusion between *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 6, p. 403–409, July 2008.

DIXIT, P. et al. Enhanced tolerance and remediation of anthracene by transgenic tobacco plants expressing a fungal glutathione transferase gene. **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, n. 1, p. 270–276, Jan. 2011.

DOI, Y. et al. Revision of the Hypocreales with cultural observations IV. The genus *Hypocrea* and its allies in Japan (2) Enumeration of the species. **Bulletin of the National Science Museum. Series B, Botany**, v. 15, n. 1, p. 649–751, 1972.

DRUZHININA, I. S. et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749–759, Oct. 2011.

DRUZHININA, I. S.; KOPCHINSKIY, A. G.; KUBICEK, C. P. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. **Mycoscience**, Japão, v. 47, n. 2, p. 55–64, Jan. 2006.

DRUZHININA, I.; KUBICEK, C. P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? **Journal of Zhejiang University. Science. B**, Hangzhou, v. 6, n. 2, p. 100–112, Oct. 2005.

EVANS, H.; HOLMES, K.; THOMAS, S. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. **Mycological Progress**, v. 2, n. 2, p. 149–160, May 2003.

FAHMI, A. I.; AL-TALHI, A. D.; HASSAN, M. M. Protoplast fusion enhances antagonistic activity in *Trichoderma* spp. **Nature and Science**, v. 10, n. 5, p. 100–106, 2012.

GAZIS, R.; CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**, v. 3, n. 3, p. 240–254, Sept. 2010.

HANADA, R. E. et al. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. **Fungal Biology**, v. 114, n. 11–12, p. 901–910, Nov./Dec. 2010.

HANADA, R. E. et al. *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. **Mycological Research**, v. 112, n. 11, p. 1335–1343, Nov. 2008.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43–56, Jan. 2004.

HARMAN, G. E.; TAYLOR, A. G.; STASZ, T. E. Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatments. **Plant Disease**, v. 73, p. 631–637, Aug. 1989.

HASSAN, M. M. Influence of protoplast fusion between two *Trichoderma* spp. on extracellular enzymes production and antagonistic activity. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 28, n. 6, p. 1014–1023, July 2014.

HATVANI, L. et al. Green mold diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp. are caused by related but phylogenetically different *Trichoderma* species. **Phytopathology**, v. 97, n. 4, p. 532–537, Apr. 2007.

HERMOSA, R. et al. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 17–25, Jan. 2012.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropical regions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 9, p. 615–631, Sept. 2009.

ISHIKAWA, F. H. et al. Factors affecting the production and regeneration of protoplasts from *Colletotrichum lindemuthianum*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 74–79, jan./fev. 2010.

JAKLITSCH, W. M.; KUBICEK, C. P.; DRUZHININA, I. S. Three European species of *Hypocrea* with reddish brown stromata and green ascospores. **Mycologia**, Lawrence, v. 100, n. 5, p. 796–815, Sept./Oct. 2008.

JAKLITSCH, W. M.; VOGLMAYR, H. Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. **Studies in Mycology**, v. 80, p. 1–87, Mar. 2015.

KOPCHINSKIY, A. G. et al. *TrichoBLAST*: a multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p. 657–660, June 2005.

KREDICS, L. et al. Genetic and biochemical diversity among *Trichoderma* isolates in soil samples from winter wheat fields of the great Hungarian plain. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 56, n. 2, p. 141–149, Jan. 2012.

KREDICS, L. et al. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 37–42, 2003.

MIGHELI, Q. et al. Soils of a Mediterranean hot spot of biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan-European, invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 35–46, Jan. 2009.

NAGY, V. et al. 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.

PAULA JÚNIOR, T. J. de et al. Limitations in controlling white mold on common beans with *Trichoderma* spp. at the fall-winter season. **Summa Phytopatologica**, v. 38, n. 4, p. 337–340, Aug. 2012.

PEBERDY, J. F. Protoplast fusion: isolation, reversion, and fusion. **Annual Review of Microbiology**, v. 33, p. 21–39, Oct. 1979.

PERSOON, C. H. Disposita methodica fungorum. **Römer's Neues Magazin für die Botanik**, v. 1, p. 81–128, 1794.

PRADO, J.; HIRAI, R. Y.; GIULIETTI, A. M. Mudanças no novo Código de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (Código de Melbourne). **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 25, n. 3, p. 729–731, jul./set. 2011.

RIFAI, M. A. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers**, v. 116, p. 1–56, 1969.

SAMUELS, G. J. et al. The *Trichoderma koningii* aggregate species. **Studies in Mycology**, v. 56, n. 1, p. 67–133, 2006.

SAMUELS, G. J. et al. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, Lawrence, v. 94, n. 1, p. 146–70, Jan./Feb. 2002.

SAMUELS, G. J.; ISMAIEL, A. *Trichoderma evansii* and *T. lieckfeldtia*: two new *T. hamatum*-like species. **Mycologia**, Lawrence, v. 101, n. 1, p. 142–156, Jan./Feb. 2009.

SANDOVAL-DENIS, M. et al. Phylogeny of the clinically relevant species of the emerging fungus *Trichoderma* and their antifungal susceptibilities. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2112–2125, June 2014.

SIVAN, A.; HARMAN, G. E. Improved rhizosphere competence in a protoplast fusion progeny of *Trichoderma harzianum*. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 23-29, Sept. 1991.

STASZ, T. E.; HARMAN, G. E.; WEEDEN, N. F. Protoplast preparation and fusion in two biocontrol strains of *Trichoderma harzianum*. **Mycologia**, Lawrence, v. 80, n. 2, p. 141-150, Mar./Apr. 1988.

VARGAS-HOYOS, H. A.; RUEDA-LORZA, E. A.; GILCHRIST-RAMELLI, E. Actividad antagonica de *Trichoderma asperellum* (fungi: ascomycota) a diferentes temperaturas. **Actualidades Biológicas**, v. 34, n. 96, p. 103-112, Jan./June 2012.

ZACHOW, C. et al. Fungal diversity in the rhizosphere of endemic plant species of Tenerife (Canary Islands): relationship to vegetation zones and environmental factors. **The ISME Journal**, v. 3, n. 1, p. 79–92, Jan. 2009.

CAPÍTULO 2 ARTIGO**DIVERSITY OF *Trichoderma* IN ASSOCIATION WITH CACAO TREES**

Kize Alves Almeida¹; Cecília Armesto²; Fernando Pereira Monteiro¹; Jorge Teodoro de Souza¹

¹Department of Phytopathology, Federal University of Lavras, P.O. Box 3037, Lavras 37200-000, MG, Brazil

²FVR/Unisepe, 11900-000 Registro, SP, Brazil

Author for correspondence: Jorge Teodoro de Souza, jorge.souza@dfp.ufla.br

Abstract

This study was conducted in order to investigate the genetic diversity of *Trichoderma* spp. associated with *Theobroma cacao*. A collection of 83 isolates from sapwood and 17 from dead branches were obtained from a cacao plantation in Bahia State, Brazil. Phylogenetic analyses based on fragments of the ITS rDNA and the translation elongation factor 1-alpha (*TEF*) were conducted with Maximum Likelihood and Bayesian inference. A total of 15 known species and six putative new species were found among the 100 isolates studied. Members of the *Harzianum* clade corresponded to 56,6 % of the species found in sapwood whereas most isolates from dead branches were identified as *T. parareesei*. The knowledge on the diversity of these fungi will

contribute to their future exploitation in biotechnological applications, such as industrial processes and biological control of plant diseases.

Keywords: endophytes, taxonomy, phylogeny, epiphyte, *Theobroma cacao*.

Findings

Cacao (*Theobroma cacao*) is a perennial tree native to the Amazon basin and is nowadays cultivated mostly in small-scale farms in South and Central America, Africa, and Asia. Cacao is cultivated within 20° of the Equator, where water supplies usually allow satisfactory plant development without the need of irrigation (Wood and Lass, 2008). Approximately 70% of the cacao beans produced in the world come from Ivory Coast, Ghana, Nigeria, and Cameroon. Brazil is the fifth largest producer and Bahia state are responsible for most of the national production (CEPLAC, 2015).

In the late 1980s, Brazilian cacao production suffered a sharp decline due to the introduction of the witches' broom disease caused by *Moniliophthora perniciosa* in Bahia State, turning the country into an importer of cacao beans to supply its internal market. This pathogen is considered one of the most serious cacao phytosanitary problems, causing major economic and social impacts. Biological control with the mycoparasite *Trichoderma stromaticum* is among the measures used to control the disease in Brazil (De Souza et al., 2008).

Trichoderma species are commonly isolated from soil, bark, parasitizing other fungi and from inside plant tissues as endophytes. *Trichoderma* are employed not only

as agents of biocontrol but also in industrial processes, such as the production of enzymes and antibiotics (Wu et al., 2014). Most studies on the diversity of *Trichoderma* focus on samples collected from soil and dead plant tissues, although some surveys were done in inner plant tissues (Evans et al., 2003, Gazis and Chaverri, 2010; Hanada et al., 2010). Studies to estimate the diversity of this genus in *Theobroma cacao* are lacking. In this study we investigated the genetic diversity of *Trichoderma* species in association with cacao trees both on fallen dead cacao branches collected from the soil surface and from inside the trees as endophytes. These isolates may potentially be used in future biotechnological applications such as biocontrol, growth promotion, and production of enzymes or other metabolites.

The sampling area is composed of 10 ha of 15-year-old cacao trees located at Ilhéus, Bahia. For the isolation of endophytic *Trichoderma*, samples of the sapwood were collected from the tree trunks at 1 m height by removing the bark with a knife surface-sterilized with 96% ethanol and a burning flame (Evans et al., 2003). Fragments of 5 mm of sapwood were plated in Petri dishes containing 1/10 strength PDA medium (potato dextrose agar) plus 1% antibiotic solution (penicillin-streptomycin-neomycin). Isolation of *Trichoderma* from fallen cacao dead branches was done by transferring spores produced on the surface of the branches directly to Petri dishes containing the medium described above. Plates were incubated at 25°C and 12 h photoperiod for 3-7 days and emerging colonies with features of *Trichoderma* spp. were subcultured to obtain pure isolates. All isolates were preserved in 15% glycerol at -80 °C for subsequent studies.

To extract DNA, all isolates were grown in 100 mL of PD (potato dextrose) for 7 days at 25°C and 110 rpm of shaking. The mycelium was filtered and macerated in

liquid nitrogen to obtain the genomic DNA according to the CTAB method (Murray and Thompson, 1980). Two fragments were amplified: the Internal Transcribed Spacer (ITS) of the rDNA, by using primers ITS1 and ITS4 (White et al., 1990), and translation elongation factor 1- α (*tef*) of the RNA polymerase, with primers EF1-728M and EF1-986 (Carbone and Kohn, 1999). PCR amplifications were done as described by Samuels et al. (2012). The quality and editing of the sequences were conducted in the Sequencher v. 4.1 software (Gene Codes). Sequences of the ITS and *tef* regions were compared with sequences of isolates deposited in public databases with the program Blastn (Altschul et al., 1990). Sequences of ex-type cultures of *Trichoderma* spp. were used to construct concatenated alignments using the MAFFT v. 7.0 program (Katoh and Standley, 2013). Phylogenetic analyses were performed with the Maximum Likelihood (ML) method in the program MEGA6 (Tamura et al., 2013) using 1,000 bootstrap replicates and Bayesian Inference (BI) was done using the program MrBayes v. 3.1 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) with ten million generations. MrModeltest v. 2.3 (Nylander, 2004) was used to select the model of nucleotide substitution for the BI analyses. The substitution model K2 + G was used in ML analyses and GTR + G and GTR + I + G for ITS plus *tef* regions to BI analyses. Analyses were initiated from a random tree and trees were sampled every 1,000 generations. Prior to BI, the Partition Homogeneity Test was performed in PAUP v. 4.0b 10 (Swofford, 2002) to verify incongruence in the different data sets. A P value of 0,01 (99% confidence) was used as the significance threshold. MatGat v. 2.02 (Campanella et al., 2003) was used to construct a matrix containing the identity of the combined ITS + *tef* DNA sequences between every possible pair of isolates included in the analysis.

A total of 100 *Trichoderma* isolates was obtained, 83 from sapwood and 17 from dead branches from cacao trees. The phylogenetic analyses showed a total of 15 known and six putative new species. The species were placed into five clusters: 1) *Harzianum* clade (*T. lentiforme*, *T. inhamatum*, *Trichoderma* sp. nov.), 2) *Virens* clade (*T. virens*); 3) *Longibrachiatum* (*T. longibrachiatum*, *T. andinense*, *T. parareesei*, *T. orientale*); 4) *Brevicomactum* clade (*T. brevicomactum*); 5) section *Trichoderma* (*T. atroviride*, *T. erinaceum*, *T. paratroviride*, *T. koningiopsis*, *T. ovalisporum*, *T. asperellum*, *T. asperelloides* and *Trichoderma* sp. nov.). The aligned sequences of ITS and *tef* resulted in 541 bp and 355 bp, respectively and 896 nucleotides in the concatenated analysis (ITS + *tef*). The phylogenetic analyses using ML and BI were congruent and therefore only the latter is shown with bootstrap values and posterior probabilities (Figure 1). Most nodes are well supported in both ML and BI analyses (bootstrap \geq 70% and posterior probability \geq 0.94).

Among the endophytes, *Trichoderma lentiforme* was the most abundant species representing 56.6 %, followed by *T. asperelloides* (8.43%), *T. ovalisporum* (4.81%), *T. koningiopsis*, *T. brevicomactum*, *T. longibrachiatum* and *T. inhamatum* equally represented by 3.61%, *T. atroviride* (2.4%) and *T. paratroviride*, *T. virens* and *T. asperellum* totalizing 3.6%. The 17 isolates obtained from dead branches were classified into the *Harzianum* and *Longibrachiatum* clades and section *Trichoderma* (Figure 1). Among the isolates from dead branches, *T. parareesei* was the most abundant species representing 41.17%, *T. andinense*, *T. orientale* and *T. erinaceum* totalizing 17.64% and were not found endophytically (Table 1). The *Harzianum* clade corresponded 53% of the isolates and only one was obtained from dead branches.

The six putative novel species represented by isolates T22, T70, T42, T36, ES13 and T76 are distributed in the *Harzianum* clade and section *Trichoderma*. The clades containing these novel species are strongly supported by ML and/or Bayesian analyses and their identities are between 88% and 97% when the *tef* gene is compared with other species (Figure 1).

Trichoderma lentiforme showed a highly diverse group with a difference of 33.3% among all isolates of the species and 27.6% in relation to epitype culture G.J.S. 98-6, suggesting that it is composed by more than one species.

Trichoderma is one of the most representative genera of endophytic fungi in studies of diversity inside plants (Evans et al., 2003; Gazis and Chaverri, 2010). It is known that these fungi play an important role in plant development as beneficial avirulent symbionts (Harman et al., 2004). Nevertheless, it is interesting to note that species such *T. longibrachiatum* and *T. orientale*, known to be pathogenic to humans (Sanddoyal-Denis et al., 2014), were recovered from inside cacao tissues.

Species of the section *Trichoderma* reported in this study were found in other studies of fungal diversity associated with plants (Jaklistch and Voglmayr, 2015) and soils (Hoyos-Carvajal and Bisset, 2011). *Trichoderma asperelloides* is a species widely used in the biological control of plant diseases (ELIAS et al., 2016).

Species of the *Harzianum* clade have been the most commonly isolated as endophytes in the sapwood of tropical trees (Evans; Holmes; Thomas, 2003; Chaverri et al., 2015) and soils (KREDICS et al., 2012). According Chaverri et al. (2015), some species of *T. harzianum* complex were isolated only as endophytes in leaves and stems of tropical trees in South America, such as *T. endophyticum*, *T. neotropicale* and *T. rifai*. Endophytic *Trichoderma* may be latent saprophytes, waiting for the plant to die to

start decomposition or dormant mycoparasites waiting for the death of the plant and primary colonization by other fungi to prey on them (Chaverri and Samuels, 2013). Mycoparasitism has been shown to be the original mode of nutrition of *Trichoderma* species and was a condition inherited from its ancestors (Atanasova et al., 2013). On the other hand, endophytism appears to be a derived condition that arose recently in the genus thanks to its flexibility to adapt to different environments and food sources (Chaverri and Samuels, 2013; Druzhinina et al., 2011).

Trichoderma brevicompactum is not commonly isolated from plant tissues, but are common in soil and bark (KRAUS et al., 2004; DEGENKOLB et al., 2008; Jaklistch et al. 2011). *T. parareesei* is known as producer of cellulase and xylanase enzymes used for industry (Atanasova et al., 2010) and recently cited as potential biocontrol agent against fungi and oomycetes (RUBIO et al., 2014).

The order *Hypocreales* is present in most studies of fungal diversity of endophytes in plants. However, *Trichoderma* species are not dominant as plant endophytes (Gazis and Chaverri, 2010; Evans et al. 2003; Hanada et al., 2010; Vega et al., 2010). We found a total of 21 *Trichoderma* spp. isolated from sapwood and dead branches of cacao trees, of which 57.14% were isolated only endophytically. The richness of *Trichoderma* species associated is 0.21. In the host *Hevea brasiliensis* this richness is 0.05 in Peru (Gazis and Chaverri, 2010) and 0.24 and 1.0 in stems and healthy pods from *Theobroma gileri* in Ecuador (Evans et al. 2003). In the Brazilian states Amazonas and Bahia the endophytic *Trichoderma* sp. diversity associated with cacao plants was 0.26 (Hanada et al., 2010). Smaller diversity indexes were found in banana roots (0.031) and in other plant and fungal material on Southern Europe (0.14) (Xia et al., 2011; Jaklitsch and Voglmayr, 2015).

Although *Trichoderma* is not the predominant genus as plant endophytes, some of these isolates are efficacious in the biocontrol of plant diseases (De Souza et al., 2016; Hanada et al., 2010). *Trichoderma* species have high mycoparasitic potential against diverse plant pathogens. The knowledge of the diversity of endophytic species associated with plants allows exploiting these microorganisms for discovery of potential biocontrol agents. In conclusion, the genetic diversity of *Trichoderma* spp. on cacao trees revealed that *T. lentiforme* as the most representative endophytic species from sapwood and *T. parareesei* as the main epiphytic species from dead branches on the ground. The six putative new species will be investigated and described in future studies. This work contributes to the knowledge of the diversity in the *Trichoderma* community associated with cacao trees and prompts new investigations of the diversity and biocontrol potential of these fungi.

Acknowledgements

The authors thank CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) and CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) for financial support and the colleagues Thaíssa Farias, Camila Nicolli and Gláucia Moreira for their contribution in this work.

References

ATANASOVA, L. et al. Clonal species *Trichoderma parareesei* sp. nov. likely resembles the ancestor of the cellulase producer *Hypocrea jecorina*/*T. reesei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 21, p. 7259–7267, 2010.

ATANASOVA, L. et al. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. **BMC Genomics**, v. 14, n. 121, 2013.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.

CAMPANELLA, J. J.; BITINCKA, L.; SMALLEY, J. MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. **BMC Bioinformatics**, v. 4, n. 29, 2003.

CARBONE, I., and KOHN, L. A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 553-556, 1999.

CEPLAC - Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2015/11/retomada-das-exportacoes-de-cacau-da-novo-animo-aos-produtores>>. Acesso em: 16 jan. 2016.

CHAVERRI, P. et al. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the reidentification of commercial biocontrol strains. **Mycologia**, v. 107, n. 3, p. 558–590, 2015.

CHAVERRI, P. and SAMUELS, G. J. Evolution of habitat preference and nutrition mode in a cosmopolitan fungal genus with evidence of interkingdom host jumps and major shifts in ecology. **Evolution**, v. 67, n. 10, p. 2823-2837, 2013.

DE SOUZA, J. T. et al. Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. **Biological Control**, v. 46, n. 1, p. 36–45, 2008.

DEGENKOLB, T. et al. The *Trichoderma brevicompactum* clade: A separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. **Mycological Progress**, v. 7, n. 3, p. 177-219, 2008.

DRUZHININA, I. et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749-759, 2011.

ELIAS, L. M. et al. Selection of *Trichoderma* isolates for biological control of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* in lettuce. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 3, p. 216-221, 2016.

- EVANS, H.; HOLMES, K.; THOMAS, S. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. **Mycological Progress**, v. 2, p. 149–160, 2003.
- GAZIS, R. and CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**, v. 3, n. 3, p. 240–254, 2010.
- HANADA, R. E. et al. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. **Fungal Biology**, v. 114, n. 11–12, p. 901–910, 2010.
- HANADA, R. E. et al. *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. **Mycological Research**, v. 112, n. 11, p. 1335–1343, 2008.
- HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43–56, 2004.
- HOYOS-CARVAJAL, L., and BISSETT, J. Biodiversity of *Trichoderma* in neotropics. The Dynamical process of Biodiversity—Case studies of evolution and spatial distribution, 2011.
- HUELSENBECK, J. P. and RECONQUIST, F. MRBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754–755, 2001.
- JAKLITSCH, W. M. and VOGLMAYR, H. Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. **Studies in Mycology**, v. 80, p. 1–87, 2015.
- Katoh, K., and Standley, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780.
- KRAUS, G. et al. *Trichoderma brevicompactum* sp. nov. **Mycologia**, v. 96, n. 5, p. 1059–1073, 2004.
- KREDICS, L. et al. Genetic and biochemical diversity among *Trichoderma* isolates in soil samples from winter wheat fields of the great Hungarian plain. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 56, n. 2, p. 141–149, 2012.
- MURRAY, M. G., and THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 19, p. 4321–4326, 1980.
- NYLANDER, J. A. A. et al. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2, 2004.

RUBIO, B. M. et al. Identifying beneficial qualities of *Trichoderma parareesei* for plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1864–1873, 2014.

SAMUELS, G. J. et al. The *Longibrachiatum* Clade of *Trichoderma*: a revision with new species. **Fungal Diversity**, v. 55, n. 1, p. 77–108, 2012.

SANDOVAL-DENIS, M. et al. Phylogeny of the clinically relevant species of the emerging fungus *Trichoderma* and their antifungal susceptibilities. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2112–2125, 2014.

SWOFFORD, D.L. PAUP*.Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods) Version 4.0b10.**Sinauer Associates**, Sunderland, Massachusetts, 2002.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

VEGA et al. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawaii, Mexico and Puerto Rico. **Fungal Ecology**, v. 3, p. 122–138, 2010.

XIA, X. et al. Species Diversity, Distribution, and Genetic Structure of Endophytic and Epiphytic *Trichoderma* Associated with Banana Roots. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 3, p. 619- 625, 2011.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.**PCR Protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

WU, B. et al. Two new antibiotic pyridones produced by a marine fungus, *Trichoderma* sp. strain MF106. **Marine Drugs**, v. 12, n. 3, p. 1208–1219, 2014.

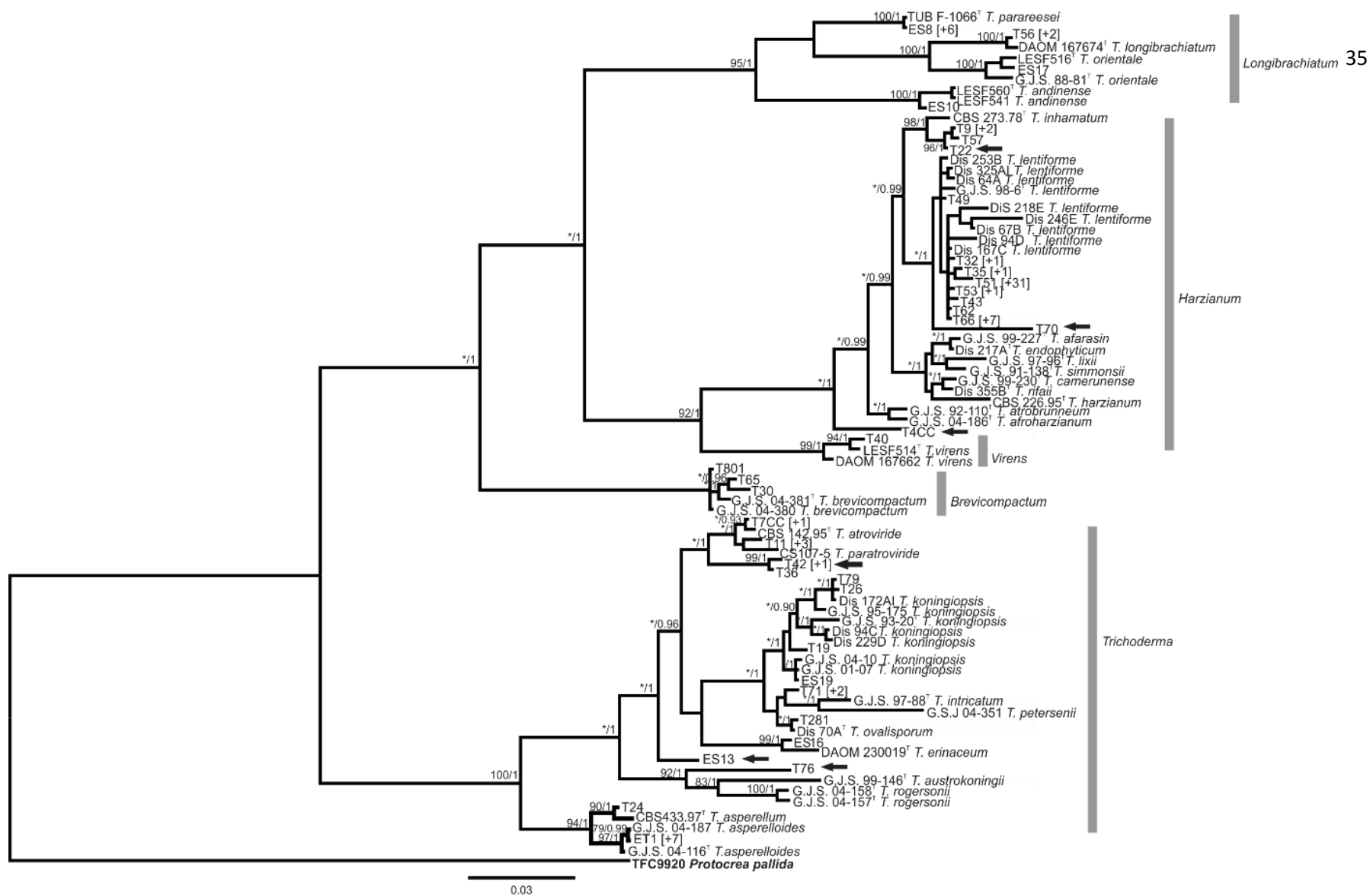


Figura 1 Bayesian phylogram representing the diversity of *Trichoderma* spp. isolated from sapwood and dead branches of cacao trees. The combined tree was inferred from the alignment of 896 nucleotides of the ITS plus *tef* regions. Posterior probabilities above 0.94 and bootstrap values above of 70% derived from BI and ML analyses respectively, are shown in the appropriate nodes. *Protocrea pallid* was defined as outgroup. Additional number of isolates with identical sequences are shown between brackets. The scale shows the number of substitutions per site.

Table 1 Number of isolates according to the species and isolation tissue.

| Species | Living tissue | Dead tissue |
|----------------------------|----------------------|--------------------|
| <i>T. lentiforme</i> | 47 | 0 |
| <i>T. inhamatum</i> | 3 | 1 |
| <i>T. longibrachiatum</i> | 3 | 0 |
| <i>T. parareesei</i> | 0 | 7 |
| <i>T. andinense</i> | 0 | 1 |
| <i>T. brevicompactum</i> | 3 | 0 |
| <i>T. orientale</i> | 0 | 1 |
| <i>T. atroviride</i> | 2 | 0 |
| <i>T. paratroviride</i> | 1 | 3 |
| <i>T. virens</i> | 1 | 0 |
| <i>T. koningiopsis</i> | 3 | 1 |
| <i>T. ovalisporum</i> | 4 | 0 |
| <i>T. erinaceum</i> | 0 | 1 |
| <i>T. asperellum</i> | 1 | 0 |
| <i>T. asperelloides</i> | 7 | 1 |
| <i>Trichoderma</i> sp. nov | 8 | 1 |
| Total | 83 | 17 |

CAPÍTULO 3 OBTENÇÃO E FUSÃO DE PROTOPLASTOS DE *Trichoderma* spp.

RESUMO

A utilização de fungos do gênero *Trichoderma* como agentes de biocontrole tem sido cada vez mais frequente devido às vantagens ambientais e econômicas proporcionadas por esse tipo de manejo. Entretanto, a eficácia desses biocontroladores é condicionada a fatores ambientais como baixas temperaturas. O objetivo desse trabalho foi melhorar a tolerância de isolados de *Trichoderma* spp. utilizados no biocontrole de doenças de plantas a baixas temperaturas por meio de fusão de protoplastos. Inicialmente, dez isolados de *Trichoderma* spp. foram testados quanto à capacidade de crescimento a 15°C, 10°C e 6°C e, posteriormente, submetidos a teste de resistência a fungicidas para obtenção de mutantes. Os isolados 427 (*T. harzianum*) e 691PR (*T. asperellum*) que apresentaram o maior diâmetro de crescimento a 10°C e resistência ao fungicida carbendazim + tiram, foram selecionados para os experimentos de obtenção e fusão de protoplastos. A maior liberação de protoplastos foi obtida após duas horas de digestão enzimática utilizando MgSO₄ como estabilizador osmótico. As concentrações obtidas pelos isolados 427 e 691PR foram de 5,75x10⁵ protoplastos/mL e 8x10⁵ protoplastos/mL, respectivamente. Após a fusão, as placas foram armazenadas a 10°C e 25°C. Foram obtidas oito colônias de recombinantes em meio BDA modificado com o fungicida carbendazim + tiram na temperatura de 25°C. No entanto, após a repicagem para uma nova placa de Petri nas condições supracitadas, a resistência ao fungicida foi perdida por todas as colônias.

Palavras-chave: recombinantes, protoplastos, resistência a fungicidas, *Trichoderma*.

ABSTRACT

The use of *Trichoderma* species as biocontrol agents have been increasingly frequent due to environmental and economic advantages offered by this type of management. However, the efficacy of these biocontrol agents may be lost under adverse conditions such as low temperatures. The aim of this work was to improve the tolerance of isolates *Trichoderma* spp. to low temperatures by protoplast fusion. Initially, the isolates were tested for their ability to grow at 15°C, 10°C and 6°C and subsequently subjected to increasing fungicide concentrations to obtain mutants. The isolates 427 (*T. harzianum*) and 691PR (*T. asperellum*) showed the largest growth diameter at 10°C and resistance to the fungicides carbendazim + thiram and were selected to obtain protoplasts. The greatest release of protoplasts was observed after two hours of enzyme digestion using MgSO₄ as osmotic stabilizer. The concentrations obtained for isolates 427 and 691PR were 5.8x10⁵ and 8x10⁵ protoplasts/mL, respectively. Eight recombinant colonies were obtained, however, without success in haploidization thereof. New experiments are being carried out to obtain stable recombinants.

Key-words: recombinants, protoplast, fungicide resistance, *Trichoderma*.

1 INTRODUÇÃO

A técnica de fusão de protoplastos é uma importante ferramenta para a manipulação genética de microrganismos de interesse biotecnológico. Protoplastos são células sem parede celular, removidas pela ação de enzimas ou outros métodos e que possuem a capacidade de retornar ao seu estado original. Vários estudos demonstram a utilização dessa técnica para potencializar a produção de enzimas celulolíticas, aumentar a capacidade de competência na rizosfera, obter isolados com resistência a fungicidas e para melhorar a capacidade de biocontrole (DILLON et al., 2008; HASSAN, 2014; FAHMI; AL-TALHI; HASSAN, 2012; STASZ et al., 1988).

Trichoderma é o agente mais utilizado para o controle de diversas doenças causadas por fungos como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* e oomycetos como *Pythium* sp. e *Phytophthora* sp. (HARMAN et al., 2004). Entretanto, o sucesso do biocontrole é altamente dependente de fatores abióticos (KREDICS et al., 2003).

Nesse trabalho, nós utilizamos a técnica de fusão de protoplastos com o objetivo de melhorar a tolerância de isolados de *Trichoderma* sp. utilizados em formulações comerciais a baixas temperaturas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados

Dez isolados de *Trichoderma* spp. provenientes de diferentes regiões do Brasil foram estudados quanto à tolerância a baixas temperaturas e resistência a fungicidas. Cinco isolados provenientes do Rio Grande do Sul são naturalmente tolerantes a temperaturas mais baixas. Os isolados 422, 427 e 409 (URM 5911) foram cedidos pelo Laboratório Farroupilha – Lallemand, sendo que os dois primeiros estão em fase de teste para aplicação

no campo e o último é a base da formulação comercial do biofungicida Quality WG. Já os isolados 2047 e 2048 foram incluídos nesse estudo devido ao rápido crescimento e capacidade de biocontrole de doenças de plantas (Tabela 1).

Tabela 1 Identificação e origem dos isolados utilizados nesse estudo.

| Isolados | Espécie | Origem |
|-----------------|-------------------------|---------------|
| 697 | <i>T. asperellum</i> | RS, Brasil |
| 691 | <i>T. asperellum</i> | RS, Brasil |
| 150 | <i>T. asperellum</i> | RS, Brasil |
| 996 | <i>T. asperellum</i> | RS, Brasil |
| 2047 | <i>T. atroviride</i> | AM, Brasil |
| 1370 | <i>T. asperellum</i> | RS, Brasil |
| 2048 | <i>Trichoderma</i> sp. | AM, Brasil |
| 422 | <i>T. asperelloides</i> | SP, Brasil |
| 409 = URM 5911 | <i>T. asperellum</i> | BA, Brasil |
| 427 | <i>T. harzianum</i> | SP, Brasil |

2.2 Crescimento em diferentes temperaturas

Os isolados foram cultivados em meio batata dextrose ágar (BDA) por três dias a 25°C, no escuro. Discos de micélio de 5mm foram recortados e dispostos no centro de placas de Petri com 9cm de diâmetro contendo aproximadamente 20mL de meio BDA. As placas foram armazenadas em câmara BOD a 15, 10 e 6°C por 2-14 d, no escuro. Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

Todos os experimentos foram repetidos uma vez. As avaliações foram realizadas pela medição dos diâmetros ortogonais das colônias fúngicas a cada 24 h até que um dos isolados atingisse os bordos da placa. Os dados de crescimento foram submetidos à análise de variância no programa Sisvar v. 5.6 (FURTADO, 2011).

2.3 Obtenção de mutantes resistentes a fungicidas

Os isolados foram submetidos a doses crescentes dos fungicidas fluazinam (Frownicide 500 SC), carbendazim + tiram (Protreat), carboxin + tiram (Vitavax-Thiram 200 SC.), tiofanato metílico + fluazinam (Certeza). As doses testadas foram: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mL de produto comercial por litro de meio de cultivo. Após a esterilização do meio, os fungicidas nas doses estudadas foram adicionados a uma temperatura de aproximadamente 50°C. Alíquotas de 100µl com a concentração de 1×10^6 conídios/mL de cada isolado foram plaqueadas em meio BDA modificado e espalhadas até a completa absorção da suspensão. As placas foram incubadas a 25°C durante 10-15 d até o surgimento de colônias resistentes. As suspensões de conídios foram preparadas a partir da colônia crescida na dose anterior até a inibição do crescimento das colônias resistentes.

2.4 Obtenção de protoplastos

Os isolados pré-selecionados nos testes de crescimento em baixas temperaturas e resistência a fungicidas foram utilizados para os experimentos de obtenção e fusão de protoplastos. Estes foram cultivados em meio BDA de 4-7 d até a esporulação e armazenados em BOD a 25°C, no escuro. Após esse período, suspensões de conídios de cada isolado foram preparadas e a concentração ajustada para $1-2,0 \times 10^8$ conídios/mL. Em seguida, uma alíquota de 1 mL da suspensão de conídios foi inoculada em 100 mL de meio GYCM (Glicose – 15g L⁻¹; extrato de levedura – 4g L⁻¹;

caseína ácida hidrolisada – 5g L⁻¹ e ágar – 15g L⁻¹) e os frascos submetidos à agitação de 150 rpm, a 25°C durante 20-24 h.

O micélio resultante foi filtrado em dupla camada de gaze estéril e lavado com estabilizador osmótico e água destilada estéril em triplicata. Três estabilizadores osmóticos foram testados quanto à liberação de protoplastos: 0,7M NaCl, 0,7M KCl e 1,2M MgSO₄. O pH de todos os estabilizadores foi ajustado para 5,8.

A solução lítica foi preparada na proporção de 100 mg de micélio úmido para cada 3 mL de solução lítica (10 mg de Glucanex/3mL de estabilizador osmótico). A suspensão micelial (micélio + solução lítica) foi homogeneizada em vórtex e, subsequentemente, os frascos foram submetidos à agitação de 100 rpm, a 25-28°C, durante 1-4 h para digestão da parede celular e liberação dos protoplastos (SIQUEIRA et al., 2014). O experimento foi realizado em triplicata. A liberação dos protoplastos e a concentração foram verificadas a cada hora em microscópio de luz em câmara de Neubauer.

2.5 Fusão e regeneração dos protoplastos

Protoplastos de ambos os isolados foram filtrados em dupla camada de Miracloth 20-22 µm e coletados em tubos de 14 mL. Foram adicionados 2 mL de solução ST buffer (1M Tris-HCl, pH 8; 0,6M sorbitol) à suspensão de protoplastos e em seguida centrifugada por 5 min, 4300 rpm a 4°C.

Após a centrifugação, os protoplastos foram removidos da superfície com uma ponteira e colocados em novo tubo. Estes foram ressuspensos em 5 mL de STC buffer (1M Tris-HCl, pH 8; 1M sorbitol; 50mM CaCl₂) e novamente centrifugados a 4300 rpm a 4°C por 5 min. O sobrenadante foi descartado e esta etapa foi repetida por três vezes. Após as lavagens, os protoplastos foram ressuspensos em 500 µl de STC buffer e a concentração estimada em câmara de Neubauer.

Antes da fusão, protoplastos do isolado 691PR resistente a carbendazim + tiram (Protreat), foram submetidos a tratamento térmico a uma temperatura de 70°C em banho-maria, por 20 min, condição que leva a incapacidade de formação de colônias em meio sólido. Após isso, 1 mL da suspensão de protoplastos do isolado 691PR foi adicionado ao tubo contendo 1 mL da suspensão de protoplastos do isolado 427, sensível ao fungicida carbendazim + tiram (Protreat). A mistura das suspensões de ambos os isolados foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 1 mL de solução de polietilenoglicol (PEG 40 % p/v). Os frascos foram armazenados em BOD a 28°C por 30 min (DILLON et al., 2008).

Posteriormente, os protoplastos foram vertidos em meio de regeneração RM semi-sólido (extrato de levedura – 0,5g L⁻¹; 0,8M sacarose; agarose 0,5%) a uma temperatura de aproximadamente 35°C para não afetar a viabilidade destes e posteriormente vertidos em placa de Petri contendo meio RM sólido modificado com 2mL/L do fungicida carbendazim + tiram utilizado como agente de seleção. As placas foram armazenadas em BOD por até 15 d para verificar o aparecimento de recombinantes nas temperaturas de 10°C e 25°C. Uma alíquota de 100 µl da suspensão contendo protoplastos do isolado (691PR) inativado pelo calor foi plaqueada como controle para certificar a inativação das células e o crescimento de colônias não recombinantes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Crescimento em diferentes temperaturas

Na temperatura de 15°C não houve diferença significativa no crescimento micelial dos isolados pelo teste de Tukey (p=0,05) (Figura 1). No entanto, quando submetidos à temperatura de 10°C por sete dias, o

isolado 427 apresentou o maior diâmetro de crescimento, seguido do isolado 409. Os isolados 697, 691 e 150 apresentaram os menores diâmetros médios em relação aos demais isolados (Figura 1).

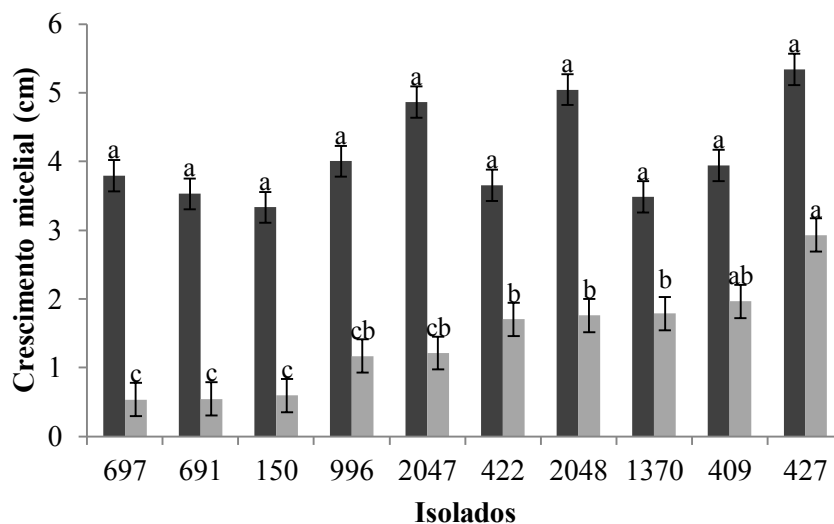


Figura 1 Diâmetro médio de crescimento micelial na temperatura de 15°C e 10°C durante 4-7 d. Médias seguidas da mesma letra não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p=0,05$).

Na temperatura de 6°C, nenhum dos isolados apresentou crescimento micelial a ponto de medir o diâmetro, embora o isolado 427 tenha apresentado um crescimento inicial. As placas foram observadas por 14 d e nenhum progresso no crescimento foi verificado. Após os 14 d, as placas foram retiradas da temperatura de 6°C e armazenadas a 25°C, e então o crescimento foi iniciado por todos os isolados (dados não mostrados).

A maioria das espécies de *Trichoderma* tem seu ótimo de crescimento de 25-30°C e baixas temperaturas podem prejudicar o seu crescimento. Kredics et al. (2003) listaram uma série de fatores que podem

interferir no desempenho de *Trichoderma* como agente de biocontrole e dentre eles a baixa temperatura.

Paula Júnior et al. (2012) avaliaram o efeito da aplicação de quatro formulações comerciais a base de *Trichoderma* para controlar *Sclerotinia sclerotiorum* sob condições de inverno (15-18°C) e alta pressão de inoculo e verificou que nenhum dos antagonistas foi capaz de controlar o patógeno nessas condições. Antal et al. (2000) testaram 360 isolados de *Trichoderma* spp. quanto à tolerância a baixa temperatura (5°C) e encontraram espécies do grupo *T. viride* como as mais tolerantes. Além disso, os autores verificaram que as enzimas envolvidas no micoparasitismo não são afetadas nessa temperatura. *Trichoderma* spp. tolerantes a baixas temperaturas são necessários para o controle de patógenos mais adaptados a essas condições como *Pythium debaryanum*, *Rizhoctonia solani*, *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (ANTAL et al. 2000).

3.2 Obtenção de mutantes resistentes a fungicidas

Dos dez isolados estudados foram obtidos seis mutantes, resistentes a três fungicidas: fluazinam (Frownicide 500 SC), tiofanato metílico + fluazinam (Certeza) e carbendazim + tiram (Protreat) em diferentes doses. O fungicida carboxin + tiram (Vitavax-Thiram 200 SC) inibiu o crescimento de todos os isolados na menor dose testada (Tabela 2).

Tabela 2 Obtenção de mutantes resistentes a fungicidas.

| Isolados | Doses (mL/L) | | | |
|----------|--------------|-----|--------|-------|
| | CBZ+T | FLU | TM+FLU | CBN+T |
| 697 | - | - | - | - |
| 691 | 2 | 8 | 2 | - |
| 150 | - | 4 | - | - |
| 996 | - | 4 | - | - |
| 2047 | - | - | - | - |
| 2048 | - | - | - | - |
| 1370 | - | 4 | - | - |
| 409 | - | - | - | - |
| 427 | - | - | - | - |
| 422 | - | - | - | - |

CBZ+T= Protreat, FLU= Frownicide, TM+FLU= Certeza, CBN+T= Vitavax-Thiram

Três mutantes foram obtidos do isolado 691: 691PR resistente ao fungicida Protreat, 691CR resistente ao fungicida Certeza e 691FR resistente ao fungicida Frownicide 500 SC na dose de 8mL/L de produto comercial.

Em vista disso, os experimentos de obtenção e fusão de protoplastos foram realizados com os isolados 691PR (*T. asperellum*) resistente ao fungicida Protreat (carbendazim + tiram) e o isolado 427 (*T. harzianum*) sensível ao fungicida de interesse e que apresentou maior diâmetro de crescimento micelial na temperatura de 10°C (Figura 2).

A resistência à fungicida tem sido usada como um dos principais marcadores utilizados em experimentos de fusão de protoplastos (DILLON et al., 2008; OGAWA et al., 2000). Além disso, a resistência de agentes de biocontrole a fungicidas é uma característica desejável bem como a sua compatibilidade com outros métodos de controle de doenças.

3.3 Obtenção de protoplastos

Protoplastos de ambos os isolados foram obtidos utilizando-se uma solução padrão de 100 mg de micélio úmido e 3 mL de solução enzimática (10 mg enzima/3mL de estabilizador MgSO_4) (Figura 2).

Dos três estabilizadores osmóticos testados, o MgSO_4 foi o que propiciou a maior liberação para ambos os isolados, estimada em 8×10^5 protoplastos/mL para o isolado 691PR e $5,75 \times 10^5$ protoplastos/mL para o isolado 427. Nos dois casos, a maior liberação foi observada após duas horas de digestão (Figura 3A-B). Os estabilizadores NaCl e KCl propiciaram uma liberação de $2,0 \times 10^5$ protoplastos/mL para ambos os isolados e $1,5 \times 10^5$ protoplastos/mL para o isolado 691PR e $1,35 \times 10^5$ protoplastos/mL para o isolado 427, respectivamente (Figura 3A-B).

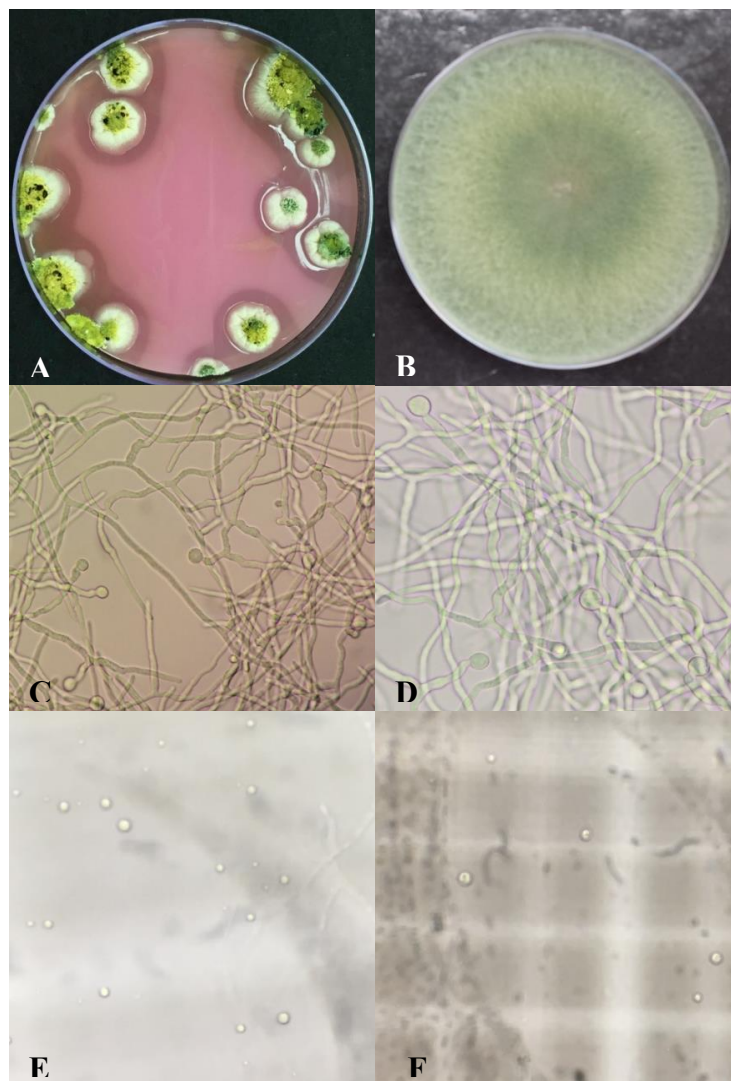
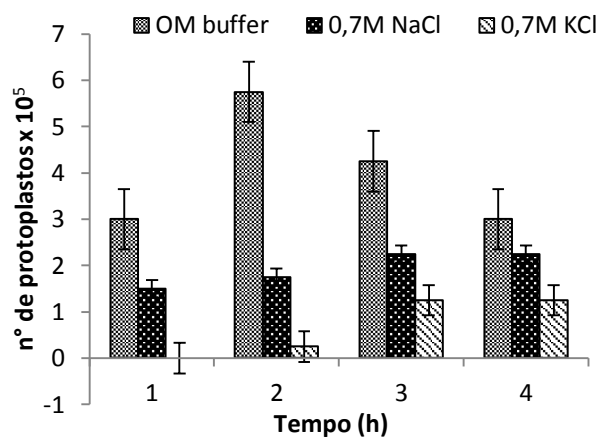
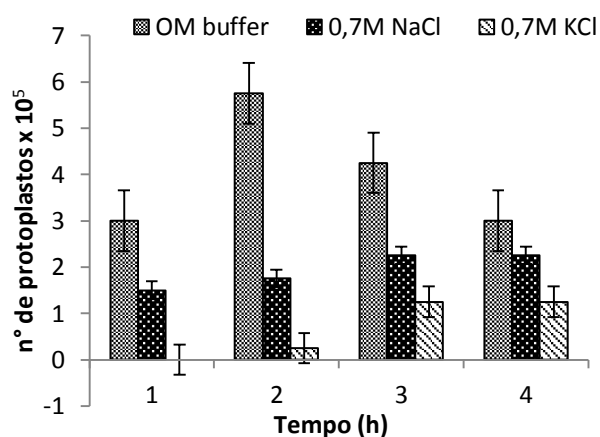


Figura 2 (A) Isolado 691PR em meio BDA modificado com fungicida, (B) isolado 427 em meio BDA, C-D) micélio dos isolados 691PR e 427 após 20 e 24 h de agitação, respectivamente, E-F) protoplastos dos isolados 691PR e 427 liberados após 2 h de digestão enzimática.



A



B

Figura 3 Liberação de protoplastos no período de 1-4 h de digestão enzimática utilizando três soluções tamponantes: 1,2M MgSO₄, 0,7M NaCl e 0,7M KCl; (A) isolado 691PR (B) isolado 427.

Estabilizadores osmóticos a base de MgSO₄ têm proporcionado bons resultados de liberação de protoplastos (DIAS et al., 1996). Embora outros trabalhos tenham alcançado resultados satisfatórios utilizando NaCl e KCl em diferentes molaridades (ARMESTO et al., 2011; ISHIKAWA et al., 2010).

3.4 Fusão e regeneração dos protoplastos

Foram obtidas oito colônias de recombinantes em meio BDA modificado com o fungicida carbendazim + tiram (Figura 4). No entanto, todos os recombinantes foram obtidos na temperatura de 25°C, sendo sensíveis a 10°C. As colônias foram imediatamente transferidas para novos meios contendo o fungicida e armazenadas a 10°C e 25°C, entretanto, após a repicagem a característica de resistência ao fungicida foi perdida.

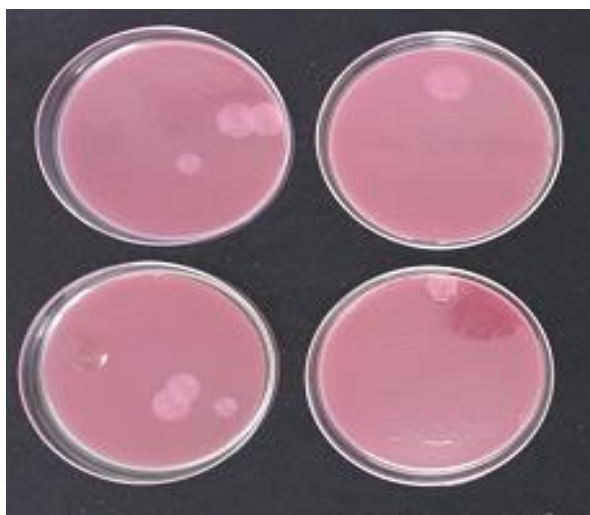


Figura 4 Colônias de recombinantes obtidos após a fusão de protoplastos dos isolados 427 (*T. harzianum*) e 691PR (*T. asperellum*) a 25°C.

Vários fatores estão relacionados ao sucesso da fusão de protoplastos tais como a viabilidade dos protoplastos, temperatura idade do micélio, que está relacionada com mudanças na composição e estrutura da parede celular; o estabilizador osmótico, pH, temperatura, tempo de digestão e concentração de enzima variam conforme a espécie ou até isolado (Peberdy, 1979).

Nesse estudo nós tentamos fusionar protoplastos de duas espécies diferentes: *T. asperellum* (691PR) e *T. harzianum* (427) com tempo de crescimento e esporulação distintos. Segundo Peberdy et al. (1976), as condições de obtenção e fusão de protoplastos podem variar inter e até intraespecificamente devido às características fisiológicas de cada espécie ou isolado. Ainda de acordo com este autor, a concentração de conídios e a condição fisiológica da cultura são os principais fatores determinantes da produtividade de protoplastos (PEBERDY, 1979).

Almeida et al. (2008) estabeleceram as seguintes condições para obtenção de protoplastos de *Aspergillus ochraceus*: 24 h de crescimento micelial; 0,8M NH₄Cl como estabilizador osmótico pH 5,5 e 20 mg/mL de *lysing enzyme*. Nessas condições os autores obtiveram uma liberação de 3,0x10⁸ protoplastos/mL. Dillon et al. (2008) realizaram a fusão de protoplastos entre *Penicillium echinulatum* e *T. harzianum* utilizando 1x10⁶ protoplastos/mL de ambos os isolados e obtiveram 17 colônias de recombinantes. No entanto, todas perderam a característica de interesse após 5 ciclos de haploidização. Em nosso trabalho, nós obtivemos uma concentração máxima de 5-8x10⁵ protoplastos/mL para os dois isolados, condição que pode justificar a ausência de recombinantes já que a relação desses fatores é direta (PEBERDY 1976, DIAS et al.1996).

4 CONCLUSÃO

Embora a fusão de protoplastos seja uma técnica já bastante difundida e vários trabalhos tenham obtido sucesso na obtenção de recombinantes é fato que as condições ideais para cada espécie ou isolado necessitam ser estudadas caso a caso. Portanto, novos experimentos serão realizados com o objetivo de se conseguir melhorar a tolerância de isolados utilizados para o controle de doenças de plantas a baixas temperaturas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. P. M. M. et al. Production of protoplasts from the filamentous fungus *Aspergillus ochraceus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1460-1462, ago. 2008.

ANTAL, Z. et al. Colony growth, in vitro antagonism and secretion of extracellular enzymes in cold-tolerant strains of *Trichoderma* species. **Mycological Research**, v. 104, n. 5, p. 545-549, May 2000.

ARMESTO, C. et al. Produção e regeneração de protoplastos de *Colletotrichum gloeosporioides* em diferentes condições de cultivo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 4, p. 597-602, jul./ago. 2011.

DIAS, E. et al. Production and regeneration of protoplasts from the mycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 12, p. 625-628, Nov. 1996.

DILLON, A. J. P. et al. Generation of recombinants strains to cellulases production by protoplast fusion between *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 6, p. 403-409, July 2008.

FAHMI, A. I.; AL-TALHI, A. D.; HASSAN, M. M. Protoplast fusion enhances antagonistic activity in *Trichoderma* spp. **Nature and Science**, v. 10, n. 5, p. 100-106, 2012.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43-56, Jan. 2004.

HASSAN, M. M. Influence of protoplast fusion between two *Trichoderma* spp. on extracellular enzymes production and antagonistic activity. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 28, n. 6, p. 1014-1023, July 2014.

ISHIKAWA, F. H. et al. Factors affecting the production and regeneration of protoplasts from *Colletotrichum lindemuthianum*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 74-79, jan./fev. 2010.

KREDICS, L. et al. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 37-42, Jan. 2003.

OGAWA, K. et al. Hybridization and breeding of the benomyl resistant mutant, *Trichoderma harzianum* antagonized to phytopathogenic fungi by protoplast fusion. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, n. 4, p. 833-836, Dec. 2000.

PAULA JÚNIOR, T. J. et al. Limitations in controlling white mold on common beans with *Trichoderma* spp. at the fall-winter season. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 4, p. 337-340, ago. 2012.

PEBERDY, J. F. et al. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 67, n. 1, p. 23-26, 1976.

PEBERDY, J. F. Protoplast fusion: isolation, reversion, and fusion. **Annual Review of Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 21-39, Oct. 1979.

SIQUEIRA, C. S. et al. Colonization of maize seeds by two species of *Stenocarpella* transformed with fluorescent proteins and assessed through scanning electron microscopy. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 2, p. 168-177, abr./jun. 2014.

STASZ, T. E.; HARMAN, G. E.; WEEDEN, N. F. Protoplast preparation and fusion in two biocontrol strains of *Trichoderma harzianum*. **Mycologia**, Lawrence, v. 80, n. 1, p. 141-150, Mar./Apr. 1988.