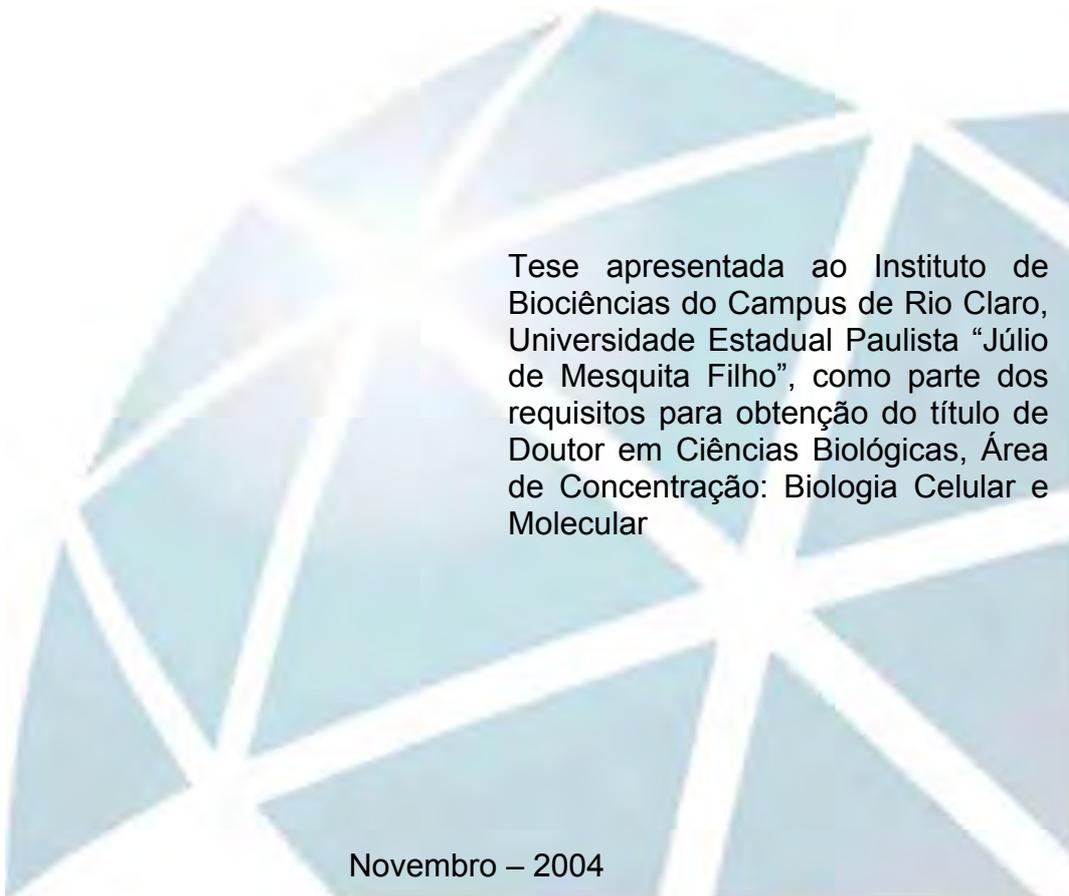


**Biodiversidade do gênero *Trichoderma*
(HYPOCREALES – FUNGI) mediante técnicas
moleculares e análise ecofisiográfica**

CARLO CORABI-ADELL



Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Novembro – 2004

**BIODIVERSIDADE DO GÊNERO *Trichoderma*
(HYPOCREALES – FUNGI) MEDIANTE TÉCNICAS
MOLECULARES E ANÁLISE ECOFISIOGRÁFICA**

CARLO CORABI-ADELL

Orientador: Prof. Dr. LEE TSENG SHENG GERALD

**Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro,
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas, Área de Concentração:
Biologia Celular e Molecular**

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Novembro de 2004

Ao leitor anônimo, que possa encontrar neste modesto trabalho algo que lhe provoque perguntas, cujas respostas não pude dar. No final, talvez elas sejam a coisa mais valiosa.

C.

“The beauty of freedom is that you do not leave a mark. The eagle in its flight does not leave a mark; the scientist does. Inquiring into this question of freedom there must be, not only the scientific observation, but also the flight of the eagle that does not leave a mark at all; both are required; there must be both the verbal explanation and the nonverbal perception – for the description is never the actuality that is described; the explanation is obviously never the thing that is explained; the word is never the thing.”

*J. Krishnamurti, The flight of the eagle,
(Harper & Row, New York, 1971)*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro, e à Coordenação de Pós-Graduação do Instituto de Biociências pela oportunidade de realização do curso.

Ao orientador e amigo Prof. Dr. Lee Tseng Sheng Gerald, do Departamento de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, campus de Araras, pelo apoio e confiança desde o início do curso.

Ao Dr. Mário Barreto Figueiredo, pesquisador do Laboratório de Micologia Fitopatológica do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal do Instituto Biológico de São Paulo, pela orientação, confiança e amizade.

Às Prof^{as}. Dr^a. Carminda da Cruz Landim, Dr^a. Sâmia Maria Tauk Tornisielo e aos professores do curso de Pós-Graduação do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Rio Claro, pelos ensinamentos oferecidos.

À Dr^a. Elza Maria Frias Martins, ex-pesquisadora chefe do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Centro de Pesquisa de Desenvolvimento de Sanidade Vegetal do Instituto Biológico de São Paulo, pela utilização do laboratório para o desenvolvimento de parte do trabalho experimental e pelo constante estímulo na fase inicial do projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo e recursos para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Ricardo Harakava, pesquisador do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo, pelo auxílio inestimável na etapa de seqüenciamento.

Às pesquisadoras Dr^a. Cleusa Maria Mantovanello Lucon e Dr^a. Sylvia Guzzo, ao técnico Celso Bezerra de Jesus e às estagiárias e bolsistas deste laboratório, pelo apoio operacional, convívio e amizade durante o período de trabalho.

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Cristina Souza Motta e Maria Auxiliadora Q. Cavalcanti pelo fornecimento de linhagens de referência e orientações quando da visita à Micoteca URM, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.

À Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello – Campinas - SP, e EMBRAPA – Meio Ambiente, Jaguariúna – SP, pelo fornecimento de diversas linhagens de referência.

Ao Dr. Gary J. Samuels, do *Systematic Botany and Mycology Laboratory, United States Department of Agriculture*, Beltsville, Md, pelas orientações e remessa de material bibliográfico fundamental para a discussão do trabalho.

Ao engenheiro químico Dr. Brazílio Seraphim de Oliveira, ex-pesquisador do Instituto Biológico de São Paulo, pela amizade, compreensão e ensinamentos, fundamentais na minha formação e modo de interpretar os fenômenos naturais.

Ao médico Prof. Dr. João Zerillo de Andrade Adell, meu pai, quem primeiro me despertou o interesse pela *História Natural*, e cuja habilidade técnica manual me é uma referência constante.

À Dr^a. Iracema H. Schöelein-Crusius, pesquisadora da Seção de Micologia e Liqueologia do Instituto de Botânica de São Paulo, pelo estímulo e amizade.

Ao biólogo Prof. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda, do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Mogi das Cruzes, pelo auxílio nas análises computacionais de filogenia, e amizade.

Ao Prof. Dr. Fernando Portella de Luna Marques, do Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela utilização do programa PAUP, pelo apoio e fornecimento de extenso material bibliográfico sobre filogenia.

Ao Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira, pesquisador do Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da USP, campus Luiz de Queiroz, Piracicaba, pela utilização dos programas NTSYSpc e Winboot.

Ao pesquisador Marco Aurélio Nalon, da Divisão de Dasonomia do Instituto Florestal de São Paulo, pelo fornecimento do mapa de cobertura vegetal natural e reflorestamento do Estado (base cartográfica digital – Projeto Sinbiota) e plotagem dos pontos de coleta.

Aos funcionários, colegas e amigos do Curso de Pós-Graduação do Instituto de Biociências e do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da UNESP, campus de Rio Claro, pelo convívio e amizade durante o curso.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, renomada instituição de pesquisa, muitas vezes esquecida nos dias atuais, o qual, nestes e em tempos passados, desde o meu primeiro estágio fora da universidade em janeiro de 1980, colaborou, direta e indiretamente, em minha formação.

À minha querida esposa Sarah e nossa pequena Giovanna, por me fazerem crer, mais uma vez e sempre, que a única justificativa de nossa breve passagem por aqui, é preencher o espaço que nos cabe, da melhor maneira possível, ao nosso alcance, não importando sua dimensão ou mesmo o futuro. Tudo o mais parece ser em vão e sem sentido.

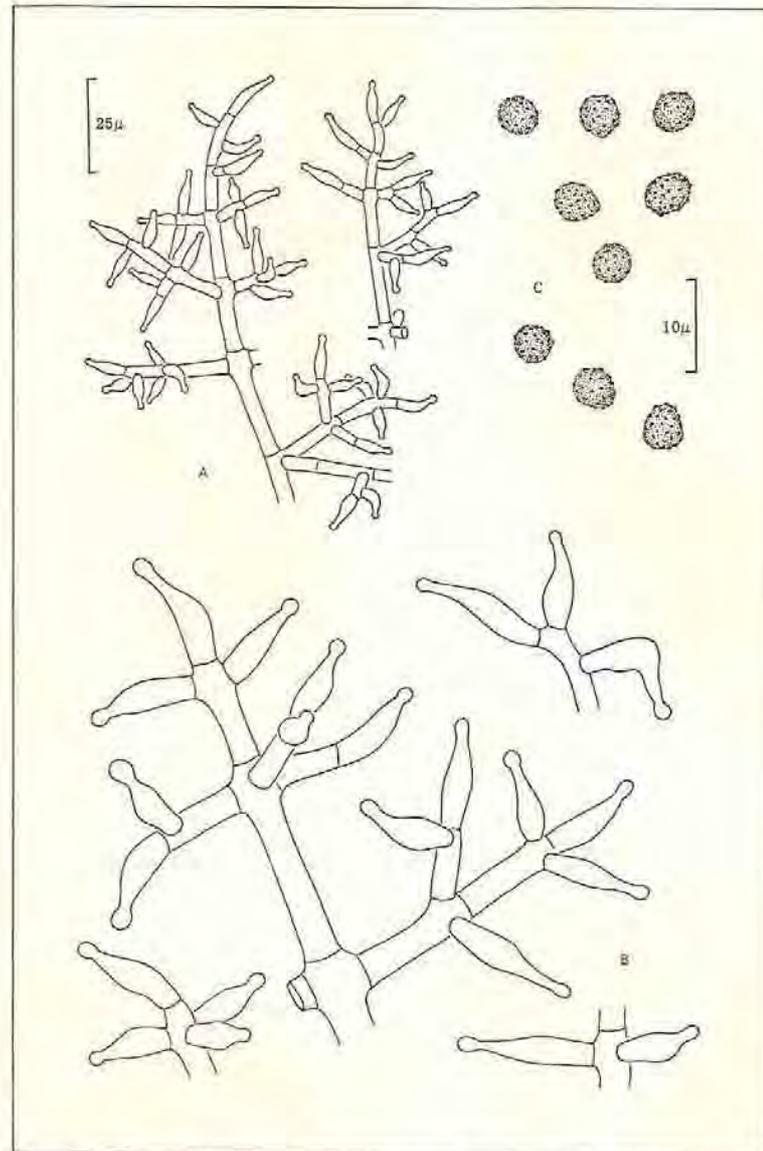


FIG. 19. *Trichoderma viride*. A, conidiophores; B, phialides; C, phialospores (from SHD-M 2611).

Trichoderma viride Pers. – Ilustração feita por Rifai (1969), digitalizada a partir do artigo original. SHD-M = codificação do Herbário Micológico, Universidade de Sheffield, Inglaterra

“... E contudo, nesta imensidade, para cada um de nós e em cada instante, só há um lugar possível, a saber, aquele onde nos coloca a fidelidade constante aos deveres naturais e sobrenaturais da vida. Neste ponto, onde não nos encontraremos no momento querido, senão quando exercermos em todos os campos a nossa mais industriosa actividade, Deus comunicar-se-á a nós em sua plenitude.”

(*T. de Chardin – O Meio Divino, Editorial Presença, Lisboa*)

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE QUADROS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Justificativa do Estudo.....	4
2 OBJETIVOS.....	5
2.1 Gerais.....	5
2.2 Específicos.....	5
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	6
3.1 Sistemática e Morfologia.....	7
3.2 Sistemática Molecular e Aspectos Filogenéticos.....	12
3.3 Biologia.....	14
3.3.1 Comportamento <i>in vitro</i>	14
3.3.2 Crescimento.....	15
3.3.3 Esporulação.....	16
3.3.4 Germinação.....	17
3.3.5 Produção de metabólitos.....	18
3.3.6 Antagonismo e biocontrole.....	19
3.4 Ecologia.....	20
3.4.1 Ocorrência e Distribuição.....	20
3.4.2 Isolamento, Classificação e Quantificação.....	21
3.4.3 Dinâmica Populacional no Solo.....	22
3.4.4 A Fungistase do Solo.....	23
3.4.5 Monitoração Ambiental.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Coletas das Amostras.....	25
4.2 Procedimento de Amostragem.....	25
4.3 Mapeamento.....	27
4.4 Isolamento.....	27
4.5 Meios de Cultura para Isolamento.....	28
4.6 Coleção de Referência.....	30
4.7 Caracterização dos Isolados de Referência.....	31
4.8 Manutenção e Preservação dos Isolados.....	34
4.9 Avaliação da Atividade Celulolítica.....	35
4.9.1 Meios de Cultura.....	35
4.9.2 Condições experimentais.....	35
4.10 Avaliação do Potencial de Biocontrole.....	37
4.10.1 Avaliação <i>in vitro</i> da ação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre o crescimento de <i>Pythium aphanidermatum</i>	37
4.10.2 Avaliação da produção de metabólitos tóxicos.....	37

4.10.3	Avaliação <i>in vivo</i> da ação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	38
4.11	Análise Molecular.....	38
4.11.1	Extração do DNA genômico.....	38
4.11.2	Amplificação do DNA.....	39
4.11.3	Purificação para a <i>PCR</i> de seqüenciamento.....	40
4.11.4	Seqüenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2.....	41
4.11.5	Análise das seqüências obtidas.....	41
4.11.6	Análise da utilização de iniciadores RAPD na triagem das amostras.....	41
4.12	Análise Taxonômica.....	42
4.13	Análise Filogenética.....	46
4.14	Análise da Biodiversidade.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1	Mapeamento e Coletas.....	48
5.2	Condições de Isolamento.....	49
5.3	Coleção de Referência.....	56
5.3.1	Caracterização das Linhagens de Referência.....	57
5.4	Manutenção e Preservação dos Isolados.....	66
5.5	Avaliação da Atividade Celulolítica.....	70
5.5.1	Meios de Cultura e Condições Experimentais.....	70
5.5.2	Triagem de Isolados Celulolíticos.....	73
5.6	Avaliação do Potencial de Biocontrole.....	76
5.6.1	Avaliação <i>in vitro</i> da Ação dos Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre o Crescimento de <i>Pythium aphanidermatum</i>	76
5.6.2	Análise <i>in vitro</i> da Produção de Metabólitos Tóxicos.....	78
5.6.3	Análise <i>in vivo</i> do Potencial de Biocontrole.....	79
5.7	Análise Molecular.....	81
5.7.1	Análise da Extração do DNA Genômico.....	81
5.7.2	Amplificação e Purificação do DNA para o Seqüenciamento.....	82
5.7.3	Análise das Seqüências da região ITS1-5,8S-ITS2.....	83
5.7.4	Utilização de Marcadores RAPD na Triagem de Isolados.....	86
5.8	Análise Taxonômica.....	90
5.8.1	Análise Taxonômica a partir de Dados Moleculares.....	90
5.8.2	Análise Taxonômica Numérica.....	93
5.8.2.1	Análise de Agrupamento.....	93
5.8.2.2	Análise de Ordenação.....	99
5.9	Análise Filogenética.....	105
5.9.1	Caracteres Morfológicos.....	105
5.9.2	Caracteres Moleculares.....	105
5.9.3	Análise de Evidência Total.....	107
5.10	Análise da Biodiversidade.....	111
6	CONCLUSÃO.....	117
7	LITERATURA CITADA.....	126
	ANEXOS.....	144

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Mapa do Estado de São Paulo indicando os 52 pontos de coleta realizados no período de outubro a novembro de 2001.....	26
Figura 2 – Cultura em lâmina realizada com a variação do método de Riddell.....	59
Figura 3 – Fotomicrografia digital de conidióforo típico da seção <i>Longibrachiatum</i> e de <i>Trichoderma virens</i>	60
Figura 4 – Detalhe dos fialoconidiosporos de isolado IB-23 e IB-26 em campo adequado para medição digital (microscópio confocal).....	60
Figura 5 – Isolados crescidos em meio BD evidenciando a formação de halos concêntricos e conidiação radial homogênea, não ocorrendo pressão ambiental que altere o aspecto concêntrico.....	67
Figura 6 – Isolados crescidos em meio BD através de semeadura lateral.....	67
Figura 7 – Isolados IB-11 (=QM9414, referência) e IB-03/04 com diferentes níveis de atividade celulolítica, com halos de hidrólise revelados por solução de vermelho do Congo.....	72
Figura 8 – Atividade celulolítica dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. dispostos em seqüência crescente de atividade. São indicados no gráfico os isolados IB-39-07 e o padrão IB-11.....	78
Figura 9 – Resultado da extração de DNA de 30 isolados obtida através do protocolo descrito por Cennis(1992).....	84
Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose evidenciando os <i>amplicons</i> obtidos de 5 amostras de DNA (IB-04/09; IB-04/10; IB-04/11; IB-07/11 e IB-08/06) utilizando-se os iniciadores ITS1 e ITS4.....	85
Figura 11 – Gel de agarose mostrando os produtos da amplificação das amostras 31 (IB-16/01); 32 (IB-16/04); 33 (IB-16/05); 34 (IB-16/08) com os iniciadores universais OPF-1 e 3; OPC-4 e 9; OPY-11; e OPX-12.....	87
Figura 12 – Fenograma das espécies de <i>Trichoderma</i> obtido pelo método de	

	método do pareamento igualmente ponderado (UPGMA).....	98
Figura 13 –	Árvore filogenética obtida pelo método do vizinho mais próximo (<i>Neighbor Joining</i>) com <i>T. virens</i> (VN) como grupo externo.....	98
Figura 14 –	Análise de Coordenadas Principais – Plotagem tridimensional das amostras.....	102
Figura 15 –	Análise de Coordenadas Principais – Plotagem bidimensional das amostras.....	102
Figura 16 –	Plotagem das amostras discriminadas por seção – vista de topo.....	103
Figura 17 –	Plotagem das amostras discriminadas por seção – vista lateral.....	103
Figura 18 –	Análise de Componentes Principais – Plotagem bidimensional dos descritores analisados.....	104
Figura 19 –	Dendrograma filogenético de consenso estrito dos caracteres morfológicos com seções discriminadas.....	109
Figura 20 –	Dendrograma filogenéticos de consenso semi-estrito dos caracteres moleculares.....	109
Figura 21 –	Cladograma de consenso semi-estrito obtido pela análise de evidência total com seções discriminadas.....	110

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 – Seções do gênero <i>Trichoderma</i> e representantes típicos.....	12
Quadro 2 – Coleção de Referência, codificação e características adicionais das linhagens de <i>Trichoderma</i> spp. mantidas no Instituto Biológico de São Paulo.....	32
Quadro 3 – Isolados de trabalho e referência submetidos aos diferentes métodos de preservação.....	34
Quadro 4 – Iniciadores empregados para a amplificação da região ITS do rDNA.....	40
Quadro 5 – Iniciadores nucleotídicos decaméricos empregados no ensaio de triagem de amostras.....	42
Quadro 6 – Relação das seqüências e codificação das espécies utilizadas na análise taxonômica e filogenética de <i>Trichoderma</i> spp.....	46
Quadro 7 – Avaliação de viabilidade de linhagens preservadas à temperatura ambiente (1 ^a . avaliação).....	51
Quadro 8 – Avaliação de viabilidade de linhagens preservadas à temperatura ambiente (2 ^a . avaliação).....	68
Quadro 9 – Avaliação de viabilidade de linhagens preservadas à temperatura ambiente (3 ^a . avaliação).....	68
Quadro 10 – Avaliação da viabilidade do isolados preservados em câmara fria	69
Quadro 11 – Genealogia de diferentes linhagens mutantes de <i>T. reesei</i> com alta produção de celulase.....	75
Quadro 12 – Variáveis associadas às componentes principais CP1 e CP2.....	104

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	– Coletas realizadas no Estado de São Paulo (2001), localização, georeferenciamento e dados de vegetação.....	29
Tabela 2	– Meios de cultura testados para isolamento de <i>Trichoderma</i> a partir de amostras de solo.....	30
Tabela 3	– Meios de cultura utilizados rotineiramente no trabalho para reavivamento, preservação, manutenção e observações micro e macroscópicas.....	30
Tabela 4	– Meios de cultura utilizados para avaliar a atividade celulolíticas dos isolados de <i>Trichoderma</i> a partir de amostras de solo.....	36
Tabela 5	– Soluções tampão utilizadas na extração do DNA genômico.....	39
Tabela 6	– Composição da reação de amplificação do DNA genômico utilizando-se os iniciadores ITS1 e ITS4.....	40
Tabela 7	– Descritores qualitativos e respectivas classes utilizados no estudo de <i>Trichoderma</i> spp.....	44
Tabela 8	– Matriz binária obtida após homogeneização dos parâmetros morfo-fisiológicos da Tabela 1.....	45
Tabela 9	– Fisionomia vegetal típica nos 52 pontos amostrados, identificadas em base cartográfica digital obtida via satélite.....	49
Tabela 10	– Coleção de Trabalho – Relação de isolados mantidos em câmara fria e pelo método de Castellani no Inst. Biológico, obtidos das 52 coletas realizadas no estado de São Paulo.....	50
Tabela 11	– Recuperação de isolados fúngicos em diferentes meios de cultura semi-seletivos obtidos em duas diluições das amostras de solo.....	55
Tabela 12	– Medições dos conidiosporos de 6 isolados da Coleção de Referência.....	57
Tabela 13	– Crescimento da colônia das linhagens da Coleção de Referência em diferentes temperaturas em meios BD e ME com semeadura realizada no centro da placa.....	63
Tabela 14	– Crescimento das linhagens da Coleção de Referência submetidos	

a 2 temperaturas em meio BD com semeadura lateral e central.....	65
Tabela 15 – Efeito da concentração do redutor de colônia sobre diferentes linhagens de <i>Trichoderma</i> (Coleção de Referência).....	72
Tabela 16 – Efeito do redutor de colônia sobre o desenvolvimento e atividade celulolítica de isolados submetidos às temperaturas de 20 e 27°C..	74
Tabela 17 – Efeito do meio de cultura de origem na resposta à atividade de degradação de celulose em meio CA1 contendo concentrações distintas do redutor de colônia Triton X100.....	74
Tabela 18 – Resultado dos ensaios de pareamento de cultura dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e antibiose <i>in vitro</i> sobre <i>P. aphanidermatum</i>	77
Tabela 19 – Eficiência dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no controle de <i>P.aphanidermatum</i> em condições de casa de vegetação.....	79
Tabela 20 – Identificação dos isolados através da análise no <i>GenBank</i> e frequência relativa das espécies sequenciadas.....	81
Tabela 21 – Seqüências com maior <i>score</i> e menor <i>e-value</i> obtidas a partir da análise no <i>GenBank</i> dos isolados da coleta 13.....	85
Tabela 22 – Resultados das seqüências IB-16/01, IB-16/04, IB-16-05 e IB-16/08, submetidas para análise de similaridade no <i>GenBank</i>	86
Tabela 23 – Atividade celulolítica dos isolados IB-16/01 e IB-16/04.....	88
Tabela 24 – Matriz de similaridade das espécies de <i>Trichoderma</i> analisadas.....	96
Tabela 25 – Análise de Componentes Principais – autovalores percentuais e acumulados.....	97
Tabela 26 – Contribuição das variáveis nas componentes principais.....	97
Tabela 27 – Frequência das espécies identificadas por ecossistema.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS

μ l = microlitro
 μ M = micromolar
ACP = análise em componentes principais
AC = análise em coordenadas principais
AFLP = polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados
AP-PCR = PCR com iniciadores arbitrários
ATCC = *American Type Culture Collection*
BDA = batata dextrose agar
bp = pares de bases
CBS = *Centraalbureau voor Schimmelcultures*
CCM = *Czech Collection of Microorganisms*
CCT = Coleção de Culturas Tropical
cm = centímetro
DGGE = *denaturing gradient gel electrophoresis*
DGPS = *Differential Global Positioning System*
DNA = ácido desoxirribonucleico
DSM = *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen*
EDTA = etilenodiaminotetraacetato
Ft = *feet*
GPS = *global positioning system*
h = hora
IMI = *International Mycological Institute*
ITCC = *Indian Type Culture Collection*
ITS = seqüência espaçadora interna transcrita do rDNA
kpb = pares de quilobases
l = litro
m = metro
MEA = *malt extract agar*
mg = miligrama
min = minuto
ml = mililitro
 μ l = microlitro
mm = milímetro
mM = milimol
 μ M = micromol
MTCC = *Microbial Type Culture Collection*
NCBI = *National Center for Biotechnology Information*
nrDNA = ác. desoxirribonucleico nuclear ribossomal
NTSYS-pc = *Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System for PC*
°C = graus Celsius
PAUP = *Phylogenetic Analysis Using Parsimony*
PCR = reação em cadeia da polimerase
PVC = cloreto de polivinil

QM = *U.S. Army Quartermaster Research and Development Center* (ref. MANDELS & REESE, 1957)

RAPD = amplificação arbitrária de polimorfismos do DNA

rDNA = ác. desoxirribonucleico ribossômico

RFLP = polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição

RNase = ribonuclease

RPM = rotações por minuto

SDS = sódio dodecil sulfato

seg = segundo

SINBIOTA = Sistema de Informação Ambiental do Biota

TBE = tris borato EDTA

TRIS = hidroximetilaminometano

UPGMA = *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*

USCG = *United States Coast Guard*

USDA = *United State Department of Agriculture*

UTM = *Universal Tranverse Mercator*

V/cm = volts por centímetro

WinBoot = programa para análise de *bootstrap* em ambiente Windows

WDCM = *World Data Centre for Microorganisms*

WFCC = *World Federation for Culture Collections*

RESUMO

CORABI-ADELL, C. *Biodiversidade do gênero Trichoderma (HYPOCREALES – FUNGI) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica*. Rio Claro, 2004. 220p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

Palavras-chave: celulase; rapd; ITS; filogenia; taxonomia, sistemática

A diversidade do gênero *Trichoderma* no estado de São Paulo (BRASIL) foi analisada sob diferentes aspectos. Foi estabelecida uma coleção de 539 linhagens obtidas a partir de 52 pontos de coleta, distribuídos pelo estado, e uma coleção de referência com 30 linhagens. Durante o período de trabalho avaliou-se a viabilidade das culturas de acordo com os métodos de preservação utilizados – Castellani e câmara fria. As avaliações do potencial de biocontrole pelas técnicas de pareamento e difusão de metabólitos inibidores não apresentaram uma correspondência clara com os testes em casa de vegetação. Para as observações microscópicas de culturas de lâminas foi desenvolvida uma técnica que permitiu visualizar mais facilmente o sistema de ramificação dos conidióforos. A avaliação celulolítica dos isolados permitiu identificar linhagens com atividade superior a da linhagem de referência, indicando alto potencial biotecnológico. A análise molecular dos isolados a partir do seqüenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 mostrou a ocorrência de 17 espécies distribuídas no estado, sobretudo nas áreas de mata e capoeira. As espécies mais freqüentes, *T. harzianum*, *T. spirale* e *T. koningii* ocorreram em quase todos os ecossistemas avaliados, enquanto a ocorrência da seção *Longibrachiatum* foi pouco expressiva. A técnica de RAPD se mostrou eficiente na identificação de linhagens redundantes indicando seu potencial de uso durante procedimentos de triagem. A aplicação de métodos de taxonomia numérica permitiu gerar fenogramas e gráficos multidimensionais coerentes com os dados morfológicos e moleculares em diversos casos. É sugerida a aplicação de métodos topológicos para a melhor descrição do sistema de ramificação e diferenciação de hifas e da teoria de sistemas não-lineares para a compreensão do seu comportamento morfológico *in* e *ex vitro* (estados anamórfico, teleomórfico e sinanomórfico). É reportada pela primeira vez a utilização da análise de evidência total (morfológica e molecular) na sistemática filogenética de *Trichoderma*.

ABSTRACT

CORABI-ADELL, C. *Biodiversity of the genus Trichoderma (HYPOCREALES – FUNGI) through molecular and ecophysiological analysis*. Rio Claro, 2004. 220p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

Keywords: cellulase; rapd; ITS; phylogeny; taxonomy, systematic

The diversity of the genus *Trichoderma* in São Paulo State (BRAZIL) was analysed under different views. A collection of 539 strains was isolated from 52 different areas and a reference collection of 30 strains was established from different brazilian culture collections. The preservation techniques of Castellani and cold storage were evaluated during the course of the study. The biocontrol potential was evaluated through pairing cultures methodology and inhibitory metabolites production. There was no clear evidence of correspondence between the data obtained *in vitro* and under greenhouse conditions. For microscopic observation a new technique of slide culture was developed in order to visualise the branching system easily. Cellulolytic activity assay identified several high-producing cellulase strains comparing to the reference QM9414 indicating a biotechnological potential. The molecular analysis from the sequencing of ITS1-5,8S-ITS2 region indicated the occurrence of 17 different species all over the state with predominance in forest and ‘capoeira’ ecosystems. The most frequently species were *T.harzianum*, *T.spirale* and *T.koningii*, occurring in almost all environmental conditions sampled, while the presence of section *Longibrachiatum* was inexpressive. The RAPD technique in separate redundant strains was demonstrated indicating its potential for using in screening procedures. Numerical taxonomy methods produced phenograms and multidimensional graphics consistent with molecular and morphological data in some cases. The use of topological methods in describing the branching system and the non-linear system theory in the comprehension of its morphological behaviour *in* and *ex vitro* (anamorphic, teleomorphic and synanomorphic states) is suggested. For the first time the total evidence analysis was applied to the genus, showing consistent results with those reported in literature.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Trichoderma* Pers., ordem Hypocreales, pertencente à classe dos hifomicetos, reúne espécies que se encontram entre os fungos de solo mais comumente encontrados (ROIGERS et al., 1991). Além de uma capacidade adaptativa elevada apresentam também grande potencial de dispersão.

Enquanto alguns deles são utilizados em controle biológico de fitopatógenos foliares e radiculares (e.g. PAPAVIDAS, 1985; MORRELL, 1990; ROIGERS & JEFFERS, 1991; LUMSDEN et al., 1993), outros têm sido intensamente aplicados em processos biotecnológicos (e.g. HARKKI et al., 1991; KUBICEK-PRANZ et al., 1991).

Sobre sua importância como agente de controle biológico, Kommedahl & Windels (1981) relatam que mais da metade dos antagonistas aplicados em mudas e solo são hifomicetos e cerca de metade destes pertencem aos gêneros *Trichoderma*, *Gliocladium* e *Penicillium*.

A taxonomia do grupo mostra-se bastante complexa e artificial, devido à falta de parâmetros mais consistentes na interpretação dos limites interespecíficos. Os caracteres morfológicos tradicionais se apresentam insuficientes para uma descrição estrita e objetiva das espécies incluídas no gênero, enquanto que somente mais recentemente análises complementares vêm sendo utilizadas para esclarecer estas questões. Trabalhos recentes (OSPINA-GIRALDO et al., 1998; LEUCHTMAN et al., 1996; KUHLS et al., 1996, KULLNIG et al., 2000) apontam para a viabilidade de métodos moleculares, especificamente a utilização de marcadores do tipo RAPD, seqüências específicas do genoma (ITS) e de sistemas enzimáticos (isoenzimas) na análise de relações filogenéticas entre os diferentes agrupamentos ou ‘agregados’, conforme designação de Rifai (1969).

A classificação proposta por Rifai (1969), responsável pela primeira revisão taxonômica desde a sua descrição realizada por Persoon em 1794, serviu como ponto de referência para diversos autores (BISSET, 1984, 1991abc; SAMUELS et al., 1994).

Em termos ecológicos poucos estudos vêm sendo realizados sobretudo em relação à diversidade da espécie, biologia (ciclo vital) e de seu papel na microbiota dos diversos ecossistemas onde sua ocorrência tem sido registrada. Em trabalho recente,

Hagn et al. (2003) realizaram interessante abordagem analisando a diversidade através de técnicas moleculares e cultivo *in vitro* em relação aos diferentes sistemas de produção. Foi também avaliado o potencial de biocontrole apresentado pelos isolados de *Trichoderma*, sendo demonstrado que esta atividade apresenta um padrão sítio-específico bastante evidente. Num aspecto geral caracteriza-se por ser um fungo de solo, tipicamente sapróbio, embora também possa ser encontrado parasitando outros fungos (micoparasitismo), denotando, portanto, grande capacidade adaptativa. Utiliza um amplo espectro de compostos como fonte única de carbono e nitrogênio e, normalmente, coloniza solos ácidos, embora também ocorra em solos úmidos e levemente básicos.

As interações parasitárias ou inibitórias que ocorrem entre *Trichoderma* e diversos fungos fitopatogênicos têm sido largamente estudadas e demonstram que vários isolados têm a capacidade de excretar enzimas hidrolíticas como quitinases e β -1,3-glicanases em meios suplementados com laminarina ou quitina (SIVAN & CHET, 1989; ELAD et al., 1982). Como quitina e β -1,3-glicanas são os principais componentes estruturais das paredes celulares dos fungos, foi sugerido que as hidrolases produzidas pelo *Trichoderma* estão envolvidas na degradação das células de fungos patogênicos, através da alteração nos componentes da parede (SIVAN & CHET, 1986). Estudos mais recentes (LORITO et al., 1993) confirmaram através de bioensaios que as enzimas quitinolíticas endoquitinase e quitobiosidase, extraídas de *T. harzianum*, apresentam atividade anti-fúngica, verificadas pela inibição da germinação de esporos e do alongamento do tubo germinativo. Além de mecanismos bioquímicos foi demonstrado por Chang et al. (1997) que genes de plantas relacionados à patogênese podem ser afetados pela presença de seu extrato micelial.

Na área industrial as espécies *T. reesei* e *T. viride* têm sido largamente utilizadas na produção da enzima celulase (SCHAFFNER & TOLEDO, 1991; ROS-BARCELÓ et al., 1996). Como agente de biocontrole, algumas companhias privadas de pequeno porte vêm se estabelecendo de forma pontual em algumas regiões produtoras. Entretanto, a ausência de informações mais precisas sobre sua biologia e comportamento em diferentes condições ecofisiográficas dificulta uma padronização de produção em escala bem como a elaboração de normas de qualidade. Além disso, devido ao conhecimento restrito sobre seu comportamento nas áreas aplicadas, dados precisos sobre seu

estabelecimento, viabilidade, eficiência de atuação e dosagem se tornam de difícil acesso. De modo geral isolados de *T. harzianum* e *T. virens* (= *Gliocladium virens*) têm sido predominantes nestas formulações, embora outras espécies afins possam também estar presentes.

Outros metabólitos secundários, produzidos por diferentes espécies e isolados, como é o caso de vários antibióticos, também apresentam potencial biotecnológico expressivo, embora não se conheçam suas funções *in situ* (MELO, 1998).

Além destas substâncias, diversas pesquisas comprovaram a atividade de diferentes isolados como estimuladores de crescimento de plantas (OUSLEY et al., 1994a). Embora o mecanismo de ação ainda não esteja esclarecido, há indícios de que não seja somente devido ao antagonismo com outros patógenos, mas também possa ser decorrente de metabólitos que atuam diretamente na planta ou em função da remoção de substâncias tóxicas presentes no solo, que possam estar inibindo seu crescimento.

Ainda que alguns aspectos sobre a biologia intrínseca de *Trichoderma* venham sendo intensamente pesquisados, sobretudo *in vitro*, poucos estudos são relatados sobre sua ecologia. Apesar do grande potencial demonstrado no controle biológico de fitopatógenos de culturas com expressão econômica, aspectos como a caracterização de sua variabilidade genética, comportamento em solos com diferentes propriedades, dinâmica populacional em microbiotas diversificadas, interação com outros microrganismos etc., têm sido relativamente pouco pesquisados.

Em nosso país, onde a agricultura em sua maior parte caracteriza-se pela utilização massiva e indiscriminada de agroquímicos, é um fato notório a urgência de intensificação das pesquisas relacionadas ao biocontrole, as quais vêm ocorrendo de forma lenta e fragmentada.

Numa perspectiva integrada, sugere-se que essas pesquisas deveriam ser iniciadas pela capacitação dos centros de pesquisa, em áreas-chave básicas para seu estudo, tais como a sistemática do gênero e sua biologia. Esta capacitação poderia, num espaço de tempo relativamente curto, fazer com que o Brasil além de otimizar o aproveitamento e conhecimento destes importantes organismos, tivesse uma autonomia maior em relação a empresas e instituições estrangeiras.

1.1 Justificativa do Estudo

No âmbito mundial verifica-se que as pesquisas com *Trichoderma* se intensificam rapidamente, contrariamente ao que ocorre no âmbito nacional. Além da importância que vem sendo dada, em função das diversas aplicações citadas, trata-se de um fungo de fácil manipulação, e seu cultivo *in vitro* para fins experimentais, ou em escala comercial, não apresenta fatores críticos limitantes. Outro fator positivo refere-se à estabilidade das culturas preservadas adequadamente em coleções, além de um ciclo clonal relativamente curto.

Em termos metodológicos e industriais, a ampliação da biotecnologia na última década favoreceu o desenvolvimento tanto de metodologias mais avançadas como equipamentos de extração e cultivo mais funcionais. Dessa forma a análise de viabilidade econômica da produção de determinada substância em larga escala pode ser realizada de maneira mais rápida, precisa e consistente.

No Brasil as pesquisas com *Trichoderma* spp. limitam-se a pequenos grupos isolados, sobretudo em instituições de pesquisa, direcionadas principalmente à área de controle biológico. Dentre elas destacam-se o Instituto Biológico de São Paulo, unidades da EMBRAPA (CNPMA – Jaguariúna – SP, CNPUV – Bento Gonçalves – RS) e CEPLAC (Itabuna – BA).

Embora algumas coleções brasileiras, oficiais e não-oficiais, possuam alguns exemplares para estudo, o material disponível apresenta uma classificação incompleta, duvidosa ou mesmo desatualizada. Atualmente, a ausência de especialistas nesse grupo faz com que os isolados de interesse sejam enviados a centros de referência mundiais para uma classificação mais segura (i.e. *American Type Culture Collection*, E.U.A.; *International Mycological Institute*, Inglaterra). Entretanto, o alto custo desses serviços e do fornecimento de isolados de referência, dificulta bastante o aprofundamento e especialização técnica na sua taxonomia.

Um outro aspecto fundamental na escolha deste grupo é sua importância ecológica na ciclagem de carbono em diferentes agroecossistemas e no meio ambiente num sentido amplo. Papavizas (1985) enfatiza ainda que a compreensão dos fatores ecofisiográficos que afetam a distribuição de *Trichoderma* no seu habitat original pode levar a um melhor entendimento tanto da dinâmica populacional deste antagonista nos

solos e em outros habitats, como a sua sobrevivência e proliferação no solo e na rizosfera. Como consequência desses estudos, seu potencial biotecnológico poderia ser melhor desenvolvido e aproveitado.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem os seguintes objetivos:

2.1 Gerais

1 – Aprofundar os conhecimentos do gênero *Trichoderma* no que diz respeito aos aspectos ecofisiográficos (ocorrência e distribuição no Estado de São Paulo; atividades fisiológicas *in vitro* e potencial de biocontrole) e aspectos taxonômicos e filogenéticos, fundamentados em análises morfológicas e moleculares.

2. Estabelecer uma coleção de referência de isolados de *Trichoderma* spp. e uma coleção de trabalho para o desenvolvimento dos estudos propostos. A elaboração de ambas deve seguir os padrões das Coleções de Cultura oficiais e Bancos de Germoplasma internacionais, uma vez que poderão ser oficializadas, conforme o interesse das entidades envolvidas diretamente na realização deste trabalho (Instituto Biológico de São Paulo –SP e EMBRAPA – CNPMA, Jaguariúna – SP), visando sobretudo preservar o material para futuros estudos e intercâmbio científico.

2.2 Específicos

1 – Analisar a biodiversidade do gênero *Trichoderma* tendo como material de estudo isolados obtidos de amostras de solo, provenientes de diferentes regiões do Estado de São Paulo

2 – Adequar as diferentes metodologias microbiológicas para o gênero em questão, incluindo condições de isolamento, métodos de preservação de culturas e observações microscópicas

3 – Analisar a atividade celulolítica e de controle biológico dos isolados obtidos.

4 – Analisar a utilização da região ITS1-5,8S-ITS2 do nrDNA na identificação dos isolados e estudos de biodiversidade

5 – Testar a utilização da metodologia de RAPD na triagem de isolados obtidos a partir de amostras de solo

6 – Investigar as relações filogenéticas entre os táxons atualmente reconhecidos baseando-se nas seqüências da região ITS1-5,8S-ITS2 (nrDNA) e aspectos morfológicos, utilizando as matrizes obtidas (isoladas e conjuntamente) para a análise cladística combinada (análise de evidência total)

7 – Verificar a utilização de métodos de taxonomia numérica na identificação e validação de espécies de *Trichoderma* pertencentes a seções distintas tendo por base a revisão taxonômica mais recente (SAMUELS, 2004)

3 REVISÃO DA LITERATURA

A literatura disponível sobre *Trichoderma*, bastante extensa e abrangente, vem aumentando significativamente nos últimos anos pelos motivos descritos anteriormente. Diversas e excelentes revisões sobre os vários aspectos deste fungo podem ser facilmente acessadas pelos meios tradicionais (PAPAVIZAS, 1985; KUBICEK, et al.,1990; CHET, 1987, 1993, LUMSDEN, 1992; SAMUELS, 1996, KUBICEK & HARMAN, 1998, HARMAN & KUBICEK, 1998). Desse modo, a revisão apresentada, enfoca apenas os aspectos fundamentais, suficientes para situar os pontos abordados neste trabalho dentro de uma perspectiva interligada.

3.1 Sistemática e Morfologia

A taxonomia de *Trichoderma*, apesar da notória importância econômica e ecológica deste, ainda não está completamente elucidada. Os estudos clássicos, realizados até então, baseados na morfologia não resultaram numa revisão compreensiva e satisfatória (KUHLS et al., 1997). A utilização da morfologia na identificação tem sido efetiva ao nível de gênero, entretanto a diferenciação intra-específica é mais complexa devido à sobreposição de diversos caracteres distintivos, resultando numa chave bastante artificial e, portanto, sujeita a certo subjetivismo.

O grupo tratado parece encontrar-se num processo ativo de especiação, também chamada explosão evolutiva (cf. CORABI-ADELL, 1999), o que talvez explique a difícil interpretação do conceito de espécie dos indivíduos que o compõem. Esse fato parece ser recorrente na natureza, onde se observa com frequência “espécies” com várias características comuns e com interrupções pouco nítidas do *continuum* fenotípico das mesmas.

A complexidade observada resulta da própria conceituação de espécie conforme aponta Alexopoulos et al. (1996). Enquanto o conceito morfológico de espécie baseia-se apenas na similaridade de caracteres e nas descontinuidades dos mesmos, o conceito filogenético de espécie considera as relações genealógicas, portanto evolutivas, entre os organismos do grupo em questão. Os avanços no campo da biologia molecular sobretudo na análise direta do DNA vêm abrindo novas discussões e levantando questionamentos sobre a maneira como a taxonomia era vista até então. Em função disso, aproximações polifásicas têm sido cada vez mais frequentes no estudo dos diferentes grupos fúngicos.

A classificação proposta por Wittaker (1969), que considera a existência de cinco Reinos, foi um importante início no sentido de estabelecer grupos monofiléticos e desenvolver uma classificação hierárquica que refletisse a relação entre os grupos. A posição sistemática do gênero conforme o autor é descrita a seguir:

Reino:	<i>Fungi</i>	
Divisão (2):	<i>Eumycota</i>	(<i>eumycetes</i>)
Subdivisão (4):	<i>Deuteromycotina</i>	(<i>deuteromycetes</i>)
Classe (2):	<i>Hyphomycetes</i>	
Ordem:	<i>Hyphales</i>	(<i>Moniliales / Hyphomycetales</i>)
Família:	<i>Moniliaceae</i>	
Gênero:	<i>Trichoderma</i>	

Essa classificação, entretanto, vem sofrendo alterações constantes, como é o caso da subdivisão *Deuteromycotina*, praticamente em desuso atualmente.

A fase teleomórfica é incluída na Subdivisão *Ascomycotina* (*ascomycetes*), Classe *Ascomycetes*, Ordem *Hypocreales*, Família *Hypocreaceae*, Gênero *Hypocrea*.

Uma classificação mais recente ao nível de Reino, proposta por Alexopoulos et al. (1996), fundamenta-se nas relações filogenéticas onde os *taxa* correspondem a linhagens monofiléticas. Assim, os organismos reconhecidos como fungos são classificados dentro de três grupos distintos: os Reinos monofiléticos *Fungi* e *Stramenopila* e quatro Filos protistas. Segundo esta proposta o gênero *Trichoderma* seria incluído no Filo *Ascomycota* (Reino *Fungi*). Hawksworth et al. (1995) também concorda com a existência de três grandes grupos, entretanto o Reino *Stramenopila* estaria incluído no Reino *Chromista*.

De acordo com o banco de dados virtual *GenBank* (NCBI), que utiliza o *Index Fungorum* (ver www.indexfungorum.org) como fonte de referência, a classificação a seguir é utilizada como base para o acesso às espécies ou resultados de pesquisas submetidas: Domínio *Eucaryota*, “Grupo” *Fungi/Metazoa*, Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Subfilo *Pezizomycotina*, Classe *Sordariomycetes*. Subclasse *Hypocreomycetidae*, Ordem *Hypocreales*, “Família” *Hypocreales* mitospóricos, Gênero *Trichoderma* (ou Família *Hypocreaceae*, Gênero *Hypocrea* na forma teleomórfica).

Este *Index*, organizado por diferentes e renomadas instituições (*CAB Biosciences* – Inglaterra, *CBS* - Holanda, e *Landcare Research* – Nova Zelândia), é constantemente revisado e atualizado, constituindo uma fonte de referência bastante confiável e útil para fins acadêmicos.

O gênero *Trichoderma*, introduzido por Persoon (1794, apud RIFAI, 1969), foi revisado muito tempo depois por Rifai (1969). Este autor menciona que a primeira delimitação genética precisa foi realizada por Harz, em 1871, o qual enfatizou a importância das características macroscópicas na delimitação do gênero. Em seu

trabalho, Rifai reconheceu agregados de espécies ou complexos, cada um deles compreendendo mais de uma espécie biológica (SAMUELS et al., 1994). Isolados foram agrupados conforme os caracteres morfológicos comuns, não tendo sido definido em seu trabalho espécies individuais típicas. Para Rifai (1969) a chave para a compreensão da classificação das espécies de *Trichoderma* residiria na conexão entre estas e o gênero *Hypocrea* Fr. (ascomiceto), correspondente à sua fase sexuada. É importante observar que a descrição de várias espécies de seu trabalho foram baseadas em culturas obtidas a partir de ascosporos.

Os teleomorfos conhecidos de *Trichoderma* estão incluídos em três gêneros afins de ascomicetos: *Hypocrea* Fr., *Podostroma* Karst. e *Sarawakus* Boedijn (DOI & DOI, 1979; GAMS & BISSET, 1998). Samuels (2004), entretanto, baseado em evidências moleculares, considera o gênero *Hypocrea* (*Ascomycota*) como sua única conexão teleomórfica.

Muitas espécies de *Hypocrea* produzem uma forma anamórfica típica de *Trichoderma* em cultura, enquanto outras espécies produzem anamorfos com padrões de dicotomização de conidióforos mais irregulares não se enquadrando exatamente como *Trichoderma*, mas sim caracterizados diversas vezes como *Gliocladium* Corda; *Verticillium* Nees, ou *Acremonium* Link:Fr. (BISSET, 1991a).

Os teleomorfos não são conhecidos para a maioria dos isolados de *Trichoderma*, e possivelmente não existam para muitas das espécies deste gênero (BISSET, 1991b). Domsch et al. (1980) concluiu, a partir de uma revisão de literatura, que de maneira geral não é possível correlacionar as formas anamórficas de *Trichoderma* com um único teleomorfo, referindo-se a como os agregados de Rifai foram conectados com algumas espécies teleomórficas, uma vez que o estado imperfeito deles dificilmente pode ser distinguido em cultura. Atualmente essa conexão pode ser melhor compreendida e com maior precisão através de técnicas moleculares como a comparação de seqüências de regiões do DNA.

Do ponto de vista da biologia de seu ciclo vital, a restrita ocorrência ou inexistência de sua fase sexuada, responsável pela geração de novos genótipos, em certa medida, é suprida na fase clonal por outros mecanismos naturais de recombinação

gênica como no caso dos ciclos parasexual e parameiótico (SAMUELS, 2004; FURLANETTO & PIZZIRANI-KLEINER, 1992).

Os nove agregados de espécies, relacionados a seguir, descritos por Rifai (1969), foram diferenciados primariamente pelo padrão de ramificação dos conidióforos e pela morfologia do conídio. Entretanto, o próprio autor considerou sua revisão como sendo um estudo preliminar da variação infragenérica, e que uma variação mais significativa permanece por ser definida. Ressalta-se que estes agregados também podem ser denominados como “complexos” ou “alianças” na terminologia sistemática.

Agregados de Espécies de *Trichoderma* (cf. RIFAI, 1969):

Trichoderma piluliferum

T. hamatum

T. polysporum

T. koningii

T. aureoviride

T. pseudokoningii

T. harzianum

T. longibrachiatum

T. viride

Como característica geral o conidióforo apresenta-se bastante ramificado, normalmente de uma forma regular dendrítica, ou seja, ramificam-se indefinidamente em vários níveis, onde as divisões primárias originam secundárias menores, as quais, por sua vez, também podem se ramificar e assim por diante. A ramificação primária é longa, subdividida sucessivamente em vários níveis, apical e distalmente, progressivamente menores e com ramificações e fiálides divergentes em todos os níveis. As fiálides são ampuliformes a lageniformes, normalmente com constrição na base, mais ou menos espessadas no meio, e abruptamente atenuadas próximo ao ápice, num curto segmento subcilíndrico. Elas se encontram dispostas em verticilos terminais sobre as ramificações do conidióforo ou, menos freqüentemente, de forma singular ou em verticilos originando-se diretamente abaixo do septo ao longo do conidióforo e suas ramificações (BISSET, 1991a).

Isolados de *Trichoderma* podem ser reconhecidos, normalmente, através de características macroscópicas, as quais incluem crescimento rápido em cultura, rede

micelial aérea hialina, septada, bastante ramificada e esparsa e produção de pústulas conidiógenas diferenciais (brancas ou verdes). Os conídios, que são produzidos abundantemente, podem ser soltos ou muito compactados em tufos.

A estrutura e tamanho dos conidióforos são utilizados para a diferenciação de espécies bem como a determinação de suas relações. Os conídios subglobosos, ovóides elipsóides ou elíptico-cilíndricos, são produzidos em série e acumulados no ápice das fiálides formando uma estrutura globosa ou subglobosa com menos de 15µm de diâmetro. Podem ser lisos ou ligeiramente rugosos, hialinos ou com coloração variando do amarelo ao verde-escuro.

As espécies pertencentes a um mesmo grupo, entretanto, apresentam características sobrepostas que dificultam a classificação dos isolados. Além desse aspecto, Bisset (1984) cita a degeneração das características diagnósticas como outro fator que prejudica a identificação, quando essas observações são realizadas a partir de áreas de conidiação abundante. Uma aparente perda de observações reprodutíveis em *Trichoderma* pode ser atribuída a uma tendência de uma conidiação mais profusa após alguns subcultivos massais. Para superar essa tendência, o autor sugere uma transferência monospórica e uma manipulação cuidadosa da cultura.

Bisset (1984, 1991abc), em extensa revisão sobre o gênero elevou alguns dos agregados de Rifai (1964) ao rank de seção (*Longibrachiatum*, *Pachybasium*, e *Trichoderma*), reconheceu a seção *Saturnisporum* Doi (DOI et al., 1987), e acrescentou a seção *Hypocreanum* Bisset (BISSET, 1991abc). A espécie *Gliocladium virens* passou a *Trichoderma virens*, sendo incluída na mesma seção que *T. harzianum*, e a espécie *T. reesei* foi considerada como sinônimo de *T. longibrachiatum* com base em comparações morfológicas. Posteriormente, Meyer et al. (1992), através da técnica de DNA-*fingerprint*, e Samuels et al. (1994), combinando perfis morfométricos e isoenzimáticos separaram as duas espécies.

Apesar do extenso estudo de Bisset, e sua classificação servir de fundamento para todos os estudos que se seguiriam, o autor admitiu seu caráter preliminar. A taxonomia proposta considerou cerca de 30 espécies, muitas delas descritas como novas, que são distribuídas entre as cinco seções descritas por ele (ver Quadro 1).

Quadro 1 - Seções do gênero *Trichoderma* e representantes típicos conforme Bisset (1984, 1991abc)

Seção	Espécies
1 <i>Pachybasium</i>	<i>T. hamatum</i> ; <i>T. polysporum</i> ; <i>T. piluliferum</i> ; <i>T. harzianum</i> , <i>T. virens</i>
2 <i>Trichoderma</i>	<i>T. koningii</i> ; <i>T. aureoviride</i> ; <i>T. viride</i> ; <i>T. atroviride</i>
3 <i>Saturnisporum</i>	<i>T. saturnisporum</i>
4 <i>Longibrachiatu</i> <i>m</i>	<i>T. longibrachiatum</i> (= <i>T. reesei</i>); <i>T. pseudokoningii</i>
5 <i>Hypocreanum</i>	<i>Hypocrea anam.</i>

3.2 Sistemática Molecular e Aspectos Filogenéticos

A análise do DNA ribossômico vem sendo cada vez mais utilizada em estudos micológicos e filogenéticos, apresentando resultados bastante confiáveis e esclarecendo diferentes questões, antes limitadas pela estrita utilização da morfologia e análises bioquímicas nas relações intra e interespecíficas (BRUNS et al., 1991). Diversos trabalhos demonstraram o potencial do uso das seqüências do rDNA na análise da correspondência anamorfo-teleomorfo ao nível de gênero em *Hypocreales* (GUADET et al., 1989; REHNER & SAMUELS 1994, 1995; DODD et al., 2003; CHAVERRI et al., 2003b; KUHLS et al., 1996).

Embora certas regiões específicas como ITS1, ITS2 e 5.8S sejam predominantes em diversos estudos taxonômicos e filogenéticos, observou-se que devido à alta conservação desta região, em alguns casos sua análise comparativa não discriminou espécies muito próximas. Em função disto, atualmente, certos genes codificadores de proteínas como o fator EF1 (*translation-elongation*), calmodulina, actina, e a subunidade II da RNA polimerase, também têm sido utilizados, isolada ou conjuntamente, em trabalhos de reconstrução filogenética (Samuels, 2004). É importante ressaltar que as ferramentas computacionais utilizadas, incluindo algoritmos específicos, procedimentos e coeficientes estatísticos bem como critérios de alinhamento de seqüências e inferências, estão em constante atualização e refinamentos.

Portanto, os resultados apresentados nestes estudos nem sempre são analisados e questionados dentro de uma perspectiva integrada e relativa, comparando entre si a congruência e sensibilidade de cada uma destas metodologias.

A primeira tentativa de utilizar a análise de seqüências do rDNA combinada com a técnica PCR-*fingerprinting* (*Polimerase Chain Reaction*) para provar a conexão entre uma espécie sexual anamórfica estrita e um ascomiceto foi realizada por Kuhls et al. (1996) em *Hypocrea*. Posteriormente (1997), este autor e colaboradores fizeram uma revisão da seção *Longibrachiatum* incluindo os teleomorfos afins baseados na análise das seqüências ITS 1 e 2 e 5.8S do rDNA. Os resultados não revelaram nenhuma variabilidade dentro do gene 5.8S, muito pouca no ITS-2 e pouca, mas bastante informativa, no ITS-1. A análise filogenética mostrou fortes evidências da seção ser monofilética. A análise permitiu incluir a espécie *T. saturnisporum* na referida seção, considerando a seção *Saturnisporum* ser artificial e que a mesma deveria ser fundida na seção *Longibrachiatum*. Confirmaram que as espécies *T. reesei* e *T. longibrachiatum* tratam-se de espécies distintas filogeneticamente, contrariamente ao proposto por Bisset (1991a), e demonstraram que a espécie *T. reesei* pode ser considerado como uma linhagem clonal derivada a partir de uma população do ascomiceto tropical *Hypocrea jecorina*. Ambos originaram seqüências idênticas, sugerindo uma alta similaridade genética ou mesmo tratar-se da mesma espécie. Através da subunidade maior do rDNA (srRNA) Rehner e Samuels (1994) demonstraram que *Gliocladium virens* trata-se de uma espécie de *Trichoderma*, embora apresente morfologia típica do gênero *Gliocladium*.

Mais recentemente as formas teleomórficas *Hypocrea lixii*, e *H. atroviridis*, de *T. harzianum* e *T. atroviride*, respectivamente, foram descobertas e comprovadas através da análise do DNA. (CHAVERRI et al., 2003a; DODD et al., 2003). Do ponto de vista aplicado estas pesquisa abrem novas perspectivas de melhoramento, sobretudo no caso de *T. harzianum*, largamente utilizado como agente de biocontrole na agricultura.

As análises utilizando as técnicas de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) têm sido usadas com relativo sucesso para identificar espécies e discriminar populações de *Trichoderma* (MEYERS et al., 1992; ZIMAND et al., 1994; FUJIMORI & OKUDA, 1994, GÓES et

al., 2002, KULLNIG et al., 2000; TURNER et al., 1997), entretanto Burns et al. (1991), indicam a análise das seqüências de espaçadores (ITS) ser a mais indicada na sistemática de fungos, oferecendo maior precisão ao nível de espécie.

Pode-se verificar que as técnicas da biologia molecular sinalizam como sendo uma ferramenta auxiliar bastante útil na sistemática filogenética. Entretanto, cabe ressaltar a necessidade de uma mudança fundamental no enfoque sistemático. Gams & Meyer (1998) além de afirmarem a importância de se utilizar um grupo padronizado de isolados (*standard*) em cada estudo, indicam a necessidade de uma aproximação integrada entre morfologistas e biólogos moleculares. Ou seja, para uma delimitação mais precisa de entidades taxonômicas do ponto de vista filogenético, genético e funcional e de sua correta identificação e descrição, os dados morfológicos, bioquímicos e moleculares devem ser combinados. Trata-se da mesma aproximação sugerida por Kuhls et al. (1997) na delimitação de uma espécie, que denominaram como sendo uma aproximação “multifásica” ou “polifásica”. Neste enfoque, Lieckfeldt et al. (1998) acrescenta que essa investigação combinada, da forma anamórfica (*Trichoderma*) e teleomórfica (*Hypocrea*), é a chave para o conceito filogenético de espécie dentro do gênero *Trichoderma*.

3.3 Biologia

3.3.1 Comportamento *in vitro*

Em laboratório, os isolados originam colônias com crescimento rápido em temperatura ótima ao redor de 28°C, apresentando inicialmente superfície lisa e quase translúcida sobre o meio de cultura, tornando-se posteriormente flocosas ou compactas como tufos. A compactação parece estar relacionada à estrutura dos conidióforos. Pode apresentar halos concêntricos de conidiação ou pústulas condiógenas, esparsamente distribuídas na superfície do meio de cultura. Devido à síntese e difusão de diferentes metabólitos, produzido por algumas espécies em certos meios de cultura, o agar pode apresentar colorações que vão do amarelo ao marrom. Enquanto que a cor da colônia é normalmente devida à pigmentação dos conídios e sua densidade, podendo ser ainda

influenciada pelos componentes do meio como o pH. Algumas espécies podem produzir um odor característico de côco devido à síntese de alquil-pironas. Essa propriedade pode auxiliar na distinção de algumas espécies.

3.3.2 Crescimento

Espécies de *Trichoderma* utilizam uma ampla variedade de compostos como fonte de carbono e nitrogênio, característica típica de fungos saprofitos de solo. O requerimento de carbono e energia pode ser suprido por monossacarídeos e dissacarídeos (DANIELSON & DAVEY, 1973a); polissacarídeos complexos, purinas, pirimidinas e aminoácidos (TYE & WILLETS, 1973); taninos condensados e catequinas (ARRIETA-ESCOBAR & BELIN, 1982); aldeídos e ácidos orgânicos, particularmente ácidos graxos de cadeia longa; e mesmo metanol, metilamina e formato (TYE & WILLETS, 1977).

Embora a amônia aparentemente seja a fonte de nitrogênio mais prontamente utilizada por *Trichoderma* spp. em meios tamponados (DANIELSON & DAVEY, 1973a), outras fontes de nitrogênio como aminoácidos, uréia, nitrato ou mesmo nitrito, promovem abundante crescimento vegetativo (DANIELSON & DAVEY, 1973a). Curiosamente não tem sido dada muita atenção ao papel dos sais, fontes de enxofre e compostos, tais como vitaminas, como substâncias estimuladoras de crescimento (PAPAVIZAS, 1985).

Alguns artigos, evidenciam claramente, que sais inorgânicos podem ser muito importantes para o crescimento. Certos sais, como os de magnésio, aumentam o crescimento de *T. viride* (SHUKLA & MISHRA, 1970). Em contraste, o crescimento e o desenvolvimento de pigmento de sete espécies agregadas foram reduzidos quando cloreto de sódio 5% foi adicionado ao meio de cultura (GINDRAT, 1977).

Também tem havido considerável interesse nos efeitos do CO₂ sobre o crescimento *in vitro* e as implicações de tais efeitos sobre a ecologia deste antagonista no solo. Muitos pesquisadores concordam que a resposta ao CO₂ varia com a espécie agregada testada (DANIELSON & DAVEY, 1973b; MACAULEY & GRIFFIN, 1969). Outros verificaram que *Trichoderma* não é afetado relativamente pelo nível de CO₂ até

10% (BURGES & FENTOM, 1953). O crescimento rápido, em alta concentração de CO₂, em meio alcalino pode explicar porque *Trichoderma*, um habitante de solos tipicamente acidofílicos, cresce abundantemente em habitats muito úmidos e levemente básicos (PUGH & VAN EMDEN, 1969). Desde que o efeito do CO₂ sobre o crescimento é mais pronunciado em pH alto, ele pode ser atribuído ao íon bicarbonato (HCO₃⁻) mais do que diretamente ao CO₂. De fato, alguns pesquisadores presumem que HCO₃⁻ tem um efeito muito maior sobre o crescimento do que o CO₂ realmente (DANIELSON & DAVEY, 1973b; MACAULEY & GRIFFIN, 1969).

3.3.3 Esporulação

Muitas espécies de *Trichoderma* são fotosensíveis, esporulando imediatamente em diversos substratos naturais e artificiais, num padrão concêntrico de anéis alternados, em resposta à variação diária de luz e escuro, sendo os conídios gerados na presença de luz (GRESSEL & HARTMANN, 1968). Culturas em ágar expostas por 20-30 segundos à luz, com intensidade entre 85 e 90 lux, normalmente, é suficiente para induzir alguma esporulação. A melhor fotoindução para que ocorra a fialoconidiogênese foi obtida com uma exposição à luz do dia por três minutos ou próximo à radiação do ultravioleta (366nm) por 10-30 segundos (BETINA & SPISIAKOVÁ, 1976). Uma pronunciada síntese de DNA, RNA e proteínas também foi observada após a fotoindução. Alguns pesquisadores observaram uma atividade máxima de fotoindução ao redor de 380nm e à 440nm, com supressão da esporulação abaixo de 254nm ou acima de 1.100nm (GRESSEL & HARTMANN, 1968). A conidiação fotoinduzida pode ser inibida quimicamente. Compostos como a azaguanina, 5-fluorouracil, actinomicina D, cicloheximida, fenetil álcool e brometo de etídio inibem parcialmente a esporulação fotoinduzida ou completamente em colônias crescendo na superfície e em culturas submersas de *T. viride* sem inibição do crescimento. Inibidores das funções de membrana não apresentam tais efeitos (BETINA & SPISIAKOVÁ, 1976; GRESSEL & RAU, 1983).

Um importante aspecto da esporulação de *Trichoderma* é a habilidade de produzir clamidosporos. Embora estes sejam mencionados rotineiramente em artigos de

cunho taxonômico, muito pouco tem sido relatado sobre a formação e importância ecológica destas estruturas ou sobre seu potencial de uso no biocontrole (PAPAVIZAS, 1985). Lewis & Papavizas (1983,1984) demonstraram a formação de clamidosporos por *T. hamatum*, *T. harzianum* e *T. viride*, tanto em meio líquido como em meio sólido de fermentação; em solo estéril ou extrato de solo; e em resíduos vegetais e solos naturais alterados.

3.3.4 Germinação

Os processos bioquímicos e moleculares envolvidos na germinação ainda são desconhecidos, provavelmente devido à facilidade com que os conídios germinam em vários substratos (PAPAVIZAS, 1985). Os poucos trabalhos publicados sobre o assunto, indicam que o conídio de *Trichoderma* requer uma fonte externa de nutrientes para sua germinação *in vitro*. Normalmente conídios lavados não germinam em água destilada. Conídios ou ágar não lavados contribuem com uma quantidade suficiente de nutrientes para iniciar e manter a germinação. A resposta dos conídios aos nutrientes é afetada pela concentração do íon H^+ , sendo a germinação maior em condições mais ácidas do que neutras (DANIELSON & DAVEY, 1973c).

A germinação de clamidosporos *in vitro* é menos conhecida ainda. Embora clamidosporos novos germinem bem (aproximadamente 75%) em ágar nutriente (LEWIS & PAPAVIZAS, 1983), somente 13 a 31% dos clamidosporos de preparações secas ao ar germinam, apesar de sua aparente viabilidade verificada através do teste do brometo de tetrazólio. Isto sugere que clamidosporos secos (que se espera obter em preparações para biocontrole) possam estar em dormência, recuperando seu poder germinativo em condições apropriadas. Maiores pesquisas são necessárias em vários aspectos da biologia dos clamidosporos, incluindo sua importância ecológica e período de viabilidade além dos fatores que estimulam sua formação. Papavizas (1985) sugere que estes propágulos sejam os responsáveis pela persistência do fungo em solos sujeitos a condições adversas não suportadas pelos pequenos, efêmeros e unicelulares conídios.

3.3.5 Produção de metabólitos

As primeiras referências sobre a produção de metabólitos, no caso tóxicos, produzidos por *Trichoderma* sp. são de Weindling (1934). Desde então várias substâncias de natureza diversa têm sido extraídas e identificadas a partir de isolados específicos.

Espécies de *Trichoderma* produzem um grande número de antibióticos os quais apresentam efeitos variados sobre fungos e bactérias, tanto de interesse agrícola como na medicina. Entre os principais efeitos estão atividades do tipo antifúngica, antibacteriana, antiviral, imunossupressores, citostática e inibidora de ATP (MELO, 1998).

As enzimas líticas compõem um outro grupo de substâncias bastante analisadas em virtude do potencial de utilização deste microrganismo na área de controle biológico. Por tratar-se de um micoparasita necrotrófico, apresenta grande eficácia no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos, sobretudo aqueles com estruturas de resistência consideradas difíceis de serem atacadas por microrganismos. Este controle pode ser realizado tanto por inibição como pela destruição dos propágulos (MELO, 1998).

Um dos fatores atribuídos a essa alta capacidade de biocontrole deve-se à produção de enzimas líticas extracelulares degradadoras da parede celular de muito fungos, tais como quitinases, celulases, β -1,3-D-glicanases, β -1,4-glicosidases e proteases. Sabe-se, atualmente, que estas enzimas estão envolvidas diretamente no processo de parasitismo (RIDOUT et al., 1986; ELAD et al., 1982). Estes últimos autores sugeriram ainda que linhagens de *Trichoderma* spp. podem ser selecionadas como agentes de biocontrole, com base na atividade de β -1,3-D-glicanase e quitinase, considerando a quitina e os glicanos como sendo os substratos mais prováveis de ataque nas paredes celulares de fungos fitopatogênicos.

Algumas espécies com alta produção de celulase, como *T. reesei*, são cultivadas em escala industrial no setor químico. Além disso, diferentes estratégias vêm sendo desenvolvidas para otimizar a produção *in vitro* de metabólitos, como aquela desenvolvida por Schaffner & Toledo (1991), que obtiveram uma maior produção de celulase através da suplementação do meio de cultura com xilose e sorbose.

Diversos autores relatam efeitos estimuladores de crescimento de plantas, germinação e emergência de sementes (OUSLEY et al., 1994a,b; KLEIFELD & CHET, 1992; BAKER, 1989; WINDHAM et al., 1986), entretanto o mecanismo ou a natureza química desse efeito ainda não é conhecido.

Embora sejam considerados num sentido geral como sapróbios benéficos, algumas espécies como *T. koningii* e *T. longibrachiatum*, produzem substâncias alergênicas voláteis que podem afetar severamente seres humanos, enquanto outros produzem micotoxinas como tricotecenos, que podem afetar mamíferos (SAMUELS, 2004). Algumas espécies, sobretudo da seção *Longibrachiatum*, podem infectar animais (FOREYT & LEATHERS, 1985) e seres humanos susceptíveis, além de ocasionar infecções fatais em pacientes imunodeprimidos (LOEPPKY et al., 1983; MUNOZ et al., 1997; GUARRO, et al., 1999; RICHTER et al., 1999).

3.3.6 Antagonismo e biocontrole

Como agente de biocontrole *T. harzianum* tem sido a espécie mais estudada, embora outras como *T. koningii*; *T. viride*; *T. hamatum*; *T. virens* e *T. pseudokoningii* também venham sendo isoladas e analisadas com esse propósito. O sucesso maior com o uso de *Trichoderma* tem sido documentado para patógenos de solo, como: *Rhizoctonia solani*; *Sclerotium rolfsii*; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Fusarium* spp. e *Pythium* spp. No entanto, diversos trabalhos têm relatado o parasitismo num grande e diversificado grupo de fungos fitopatogênicos: *Armillaria*; *Colletotrichum*; *Verticillium*; *Venturia*; *Endotia*; *Phytophthora*; *Rhizopus*; *Diaporthe*; *Fusicladium*; *Botrytis*; *Poria monticola* e *Stereum purpureum* (Melo, 1998). Alguns basidiomicetos superiores, como *Agaricus* spp., cultivados com finalidade comestível, também são susceptíveis, ao ataque de *Trichoderma*, ocasionando a doença denominada de “mofo verde” (*green mold*). Atualmente, considera-se quatro os fatores preponderantes na eficiência do biocontrole: a) competência rizosférica; b) seleção de isolados; c) umidade relativa periférica e d) disponibilidade de nutrientes (SAMUELS, 2004).

Quanto ao modo de ação, isolados de *Trichoderma* spp. podem atuar através de um ou da associação de mecanismos distintos como parasitismo, antibiose e

competição. Revisões sobre estes mecanismos e exemplos de biocontrole podem ser encontradas em Cook & Baker (1983); Papavizas (1985); Chet (1987); Wells (1988); Knudsen & Eschen (1991); Orlikowsky (1995); Dumas et al. (1996); Melo & Faull (2000).

Técnicas mais modernas também têm sido testadas no sentido de ampliar o potencial antagônico dos isolados de *Trichoderma*. É o caso da produção de híbridos entre linhagens distintas a partir da fusão de protoplastos (MIGHELI et al., 1995). Trabalhando com isolados de *T. harzianum*, os autores obtiveram um elevado grau de variabilidade no biocontrole e na atividade micoparasítica dos produtos de fusão.

Uma outra estratégia de biocontrole foi utilizada por Chang et al. (1997), promovendo a indução de resistência em plântulas de fumo a *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (raça 0) mediante aplicação do extrato micelial de *T. longibrachiatum*. Neste caso, a resistência obtida, foi resultante da indução da expressão dos genes PR-1b (*pathogenesis-related*) e *osmotin* (PR-5).

3.4 Ecologia

3.4.1 Ocorrência e Distribuição

Trichoderma possui uma distribuição bastante ampla ocorrendo no mundo inteiro em quase todos os tipos de solos e outros habitats naturais, especialmente naqueles que contém ou consistem de matéria orgânica. Agregados (ou complexos) de espécies (cf. BISSET, 1984) podem estar restritos a uma determinada área, entretanto são escassas as informações sobre sítios preferenciais ou fatores críticos para seu estabelecimento e persistência em diferentes ecossistemas. Embora pareça ser um colonizador secundário, como indica seu isolamento freqüente a partir de matéria orgânica bastante decomposta (DANIELSON & DAVEY, 1973d), é bastante agressivo na competição por nutrientes e exudatos vegetais (SAMUELS, 2004). É encontrado também na superfície de raízes de diversas plantas (PARKINSON et al., 1963); sobre cascas caídas, especialmente quando estão lesadas por outros fungos (DANIELSON & DAVEY, 1973d); ou sobre esclerócios ou outros propágulos de outros fungos (WELLS

et al., 1972). As preferências ecológicas foram revistas com maior profundidade por DANIELSON & DAVEY (1973bcd).

Estudos qualitativos sobre a distribuição e a ocorrência dos agregados individuais foram dificultados devido a imprecisões taxonômicas e pelas limitações metodológicas na caracterização morfológica e intrínseca das amostras. Observou-se que quando as condições do solo são mantidas secas por um longo período a população como um todo decai (DAVET, 1979). Danielson & Davey (1973d) concluíram que certos isolados de *T. hamatum* e *T. pseudokoningii* estão adaptados a condições de excessiva umidade de solo e que *T. viride* e *T. polysporum* estão restritos a áreas onde baixas temperaturas prevalecem, enquanto *T. harzianum* é mais comumente encontrado em regiões de clima quente. Já as espécies *T. hamatum* e *T. koningii* são amplamente distribuídos em áreas de condições climáticas diversas. Estes autores, ainda sugerem, como determinantes físicos e químicos, a heterogeneidade dos agregados de espécies (ou complexos), pH do solo, propriedades químicas, concentração de CO₂ e HCO₃⁻, conteúdo de matéria orgânica e saís ou ausência de microrganismos no solo. O conteúdo de ferro no solo pode também ser um determinante importante na preferência de microsítios por *Trichoderma* (HUBBARD et al., 1983). Em termos taxonômicos, devido ao grande avanço das técnicas moleculares e o acesso a bancos genômicos mundiais (e.g. *GenBank*), as informações disponíveis deverão ser reavaliadas mediante a nomenclatura atualmente reconhecida para uma melhor interpretação dos dados ecológicos obtidos até então.

3.4.2 Isolamento, Classificação e Quantificação

A técnica de isolamento mais adotada para a manipulação destes fungos utiliza é a diluição seriada em meios de cultura seletivos ou semi-seletivos para isolamento e posterior caracterização. Entre as substâncias utilizadas com sucesso neste processo estão o alil-álcool, o fungicida vinclozolin (DAVET, 1979), e o rosa de Bengala, utilizados juntamente com pentaclonitrobenzeno (PCNB) e captan (ELAD & CHET, 1983). Abd-El Moity & Papavizas (1982) e Papavizas (1981) utilizaram o fungicida benomyl com sucesso em solos que não continham fungos que se alastram rapidamente

como *Mucor* e *Rhizopus*. A adição de alquilaril polieter álcool ao meio descrito mostrou-se eficiente para recuperar os fungos *Trichoderma* e *Gliocladium* do solo, rizosfera e de outros habitats através do método de diluição por plaqueamentos sucessivos (PAPAVIZAS & LUMSDEN, 1982).

3.4.3 Dinâmica Populacional no Solo

A abundância de *Trichoderma* em vários solos conjugada com sua habilidade de degradar vários tipos de substratos orgânicos no solo, sua versatilidade metabólica, e sua resistência a inibidores microbianos, sugerem que ele tenha a habilidade de sobreviver em muitos nichos ecológicos, dependendo das condições preponderantes e da espécie ou linhagem envolvida. Esta hipótese pode dificultar a distinção entre sobrevivência passiva e a habilidade sapróbica competitiva ativa, incluindo a colonização dinâmica da rizosfera. Papavizas (1985) sugere que estas questões poderão ser elucidadas mais facilmente com a introdução de isolados de modo controlado do que com a avaliação da população natural estática de *Trichoderma*.

Sobre esta questão, Davet (1986) demonstrou que a densidade da microbiota do solo teve um efeito adverso sobre a capacidade sapróbica potencial de *Trichoderma* spp., concluindo que a atividade parasitária de vários clones num solo natural variou de acordo com sua habilidade sapróbica competitiva. Cardoso (1992), referindo-se ocorrência de interações microbianas, ressaltou que nem sempre um fenômeno observado é consequência direta da atividade fisiológica de um único tipo de microrganismo. Especialmente em habitats que apresentam alta densidade de populações, como no caso da rizosfera, podendo ocorrer aí interações positivas ou negativas entre essas populações. Da mesma forma, a densidade de uma determinada população no solo pode sofrer flutuações decorrentes de uma alteração nos nichos disponíveis devido à intervenção nas características físico-químicas ou biológicas do ecossistema (e.g. práticas agrícolas). Assim, a cada modificação profunda corresponde uma renovação da pressão de seleção, favorecendo alguns componentes da microbiota e eliminando outros, remanejando, dessa forma, o estado de equilíbrio entre as populações (homeostase).

Muito pouco se sabe sobre o destino dos conídios e clamidosporos de *Trichoderma* inoculados no solo ou em qualquer outro ambiente. Papavizas (1981) observou que alguns dos conídios de *T. harzianum* adicionados ao solo, sem acréscimo de nutrientes, sobreviveram entre 110 e 130 dias, mas o período de sobrevivência dependeu do isolado utilizado. A maioria dos conídios foi provavelmente lisada antes de germinar, ou germinaram em resposta a alguns nutrientes liberados pela matéria orgânica e foram subsequenteiramente lisados devido à ausência dos requerimentos mínimos necessários para levar adiante seu crescimento e esporulação. Em outros estudos, conídios adicionados ao solo decresceram inicialmente, estabilizando-se em seguida por dois anos em cerca de 10% da quantidade original inoculada (DAVET, 1979). As hifas também sobreviveram no solo.

Em relação aos clamidosporos, atualmente atribuí-se grande importância à função ecológica relacionada à sobrevivência do fungo no solo. Caldwell (1958) foi um dos primeiros a observar que os clamidosporos sobreviviam mais do que os conídios no solo. Já em 1984, Lewis & Papavizas demonstraram o potencial de vários agregados de espécies em produzir clamidosporos prontamente e em grande número, em solos naturais ou em fragmentos de matéria orgânica, após a introdução do fungo no solo no estado conidial. Eles sugeriram que isolados introduzidos no solo têm o potencial e agressividade para colonizar e se estabelecerem em matéria orgânica em ambientes naturais. Em relação a sua persistência por longos períodos no solo, caso seja confirmada, a importância ecológica destas estruturas se tornarão bastante significativas.

3.4.4 A Fungistase do Solo

A natureza fungistática do solo pesquisado é um fator fundamental a ser avaliado no levantamento e compreensão da dinâmica populacional de *Trichoderma*. Seus conídios podem se comportar tanto muito sensíveis a esse efeito (LOCKWOOD, 1977) como relativamente insensíveis (MITCHELL & DIX, 1975). A sensibilidade a fungistase foi constatada ser mais pronunciada em solos neutros ou alcalinos que em ácidos (DANIELSON & DAVEY, 1973c).

Vários substratos orgânicos adicionados ao solo podem reverter parcialmente ou completamente a fungistase, com a reversão sendo mais acentuada em solos ácidos que em alcalinos (LOCKWOOD, 1977). Este autor também relatou que parece existir uma relação entre o tipo e tamanho do propágulo de *Trichoderma* e sua sensibilidade a fungistase: conídios são mais sensíveis do que os grandes clamidosporos, enquanto as hifas são menos sensíveis que os conídios. A sensibilidade dos clamidosporos é somente uma conjectura, uma vez que ainda se conhece muito pouco sobre seu comportamento no solo. As hipóteses mais aceitas para explicar porque esporos de fungos não germinam em solo natural são: a) presença de substâncias voláteis inibitórias, provenientes do metabolismo de outro microrganismo do solo ou de origem abiótica, ou b) deficiência de nutrientes ou dreno de nutrientes do propágulo em questão, por outros microrganismos do solo.

A fungistase é de vantagem ecológica para os fungos em geral, visto que impede a germinação de propágulos em habitats desprovidos de nutrientes que garantam a sua sobrevivência e reprodução do indivíduo (CARDOSO, 1992). Normalmente o efeito fungistático é anulado na rizosfera pela presença de exsudatos de raízes (PAPAVIZAS & KOVACS, 1972). Entre os principais componentes detectados nesses exsudatos estão: açúcares, compostos aminados, ácidos orgânicos, ácidos graxos e esteróis, fatores de crescimento, nucleotídeos, flavononas, enzimas e compostos miscelâneos como auxinas, glicosídeos, compostos orgânicos de fósforo, saponinas, e outros (CURL & TRUELOVE, 1986).

No ambiente do solo diversos fatores como a temperatura, acidez, umidade, fatores nutricionais e indutores, concorrem concomitantemente para que um estado de fungistase se caracterize. O estudo integrado destes fatores, identificando os principais limitantes (críticos) e seus respectivos pontos de mínimo, poderia esclarecer como as espécies são moduladas em diferentes ambientes ao qual o solo está submetido, permitindo prever seu comportamento

3.4.5 Monitoração Ambiental

Embora seja verificada a inexistência de referências sobre a utilização de *Trichoderma* spp. como espécie potencial para monitoramento ambiental, suas

propriedades ecofisiológicas, descritas anteriormente, apontam para a necessidade de um estudo mais aprofundado sobre seu comportamento no habitat natural. Informações mais precisas e associadas sobre a população indígena, sua dinâmica de dispersão e fluxo populacional, flutuação da variabilidade, níveis de atividades de biodegradação e biocatalítica e plasticidade metabólica, poderão fornecer subsídios para uma avaliação objetiva sobre este uso potencial e, eventualmente, sua aplicação na recuperação de áreas degradadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coletas das Amostras

Para a obtenção dos isolados, para compor a coleção de trabalho, amostras de solo foram coletadas em diferentes regiões do estado de São Paulo. Os locais de coleta, mostrados na Figura 1, constaram, predominantemente, de locais preservados (vegetação nativa), como é o caso da mata atlântica ou de manchas de vegetação típicas do ecossistema local. Embora a devastação seja grande no estado e as áreas preservadas cada vez mais reduzidas, buscou-se identificar locais de reduzido efeito antrópico, ainda que de vegetação secundária.

4.2 Procedimento de Amostragem

As amostras compostas consistiram de pelo menos 5 sub-amostras coletadas entre espaços de 3 até 10m, homogeneizadas e não peneiradas, resultando numa amostra final de 100-150g. O solo foi coletado à 5cm de profundidade, no horizonte O₁ e, em alguns casos, O₂, em função da variação na camada de serapilheira, onde o processo de ciclagem de matéria orgânica é bastante intenso. Normalmente coletou-se algumas sub-amostras na região do colo das árvores mais antigas na tentativa de obter material de uma micro-região mais conservada.

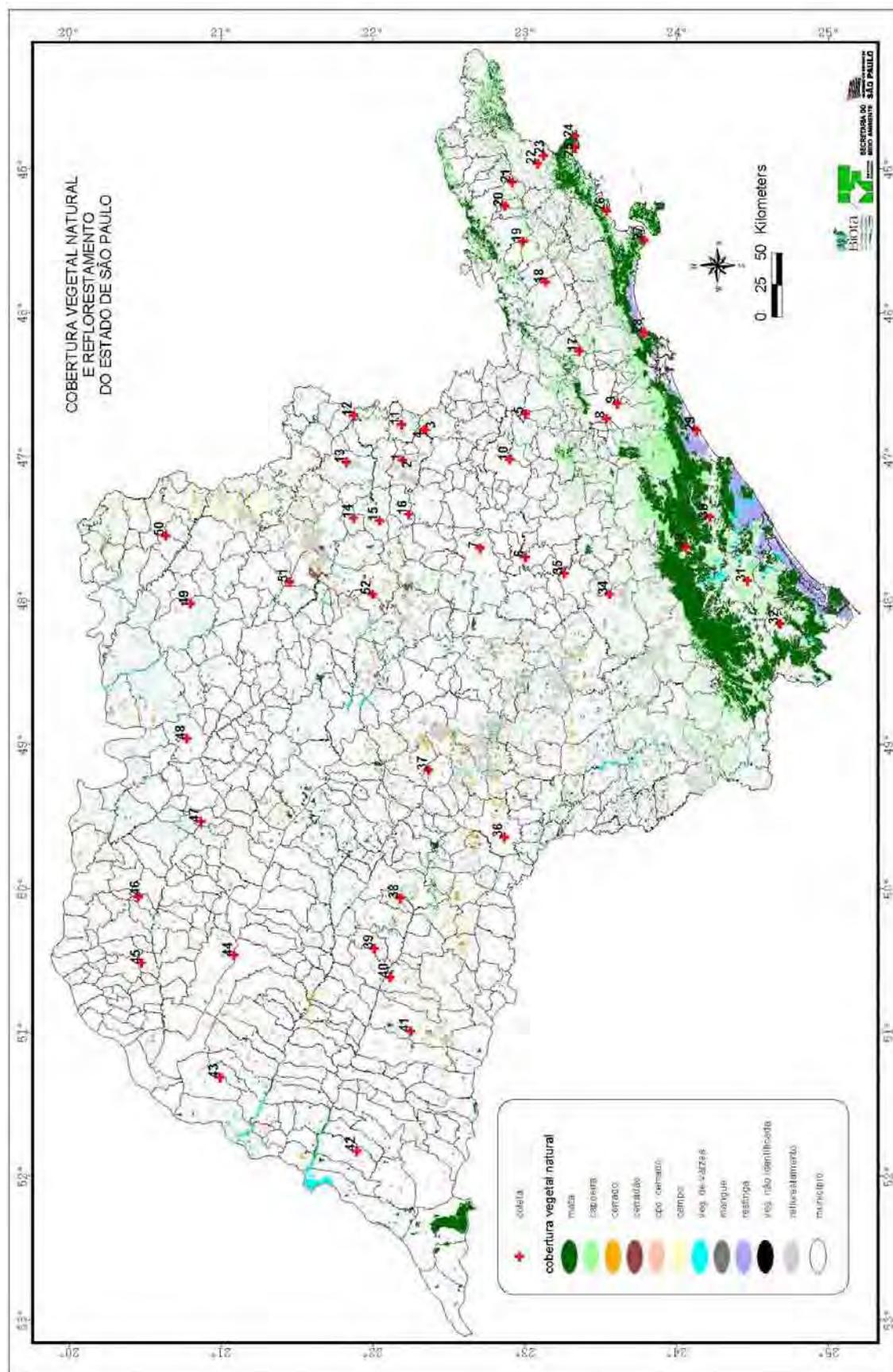


Figura 1 – Mapa do Estado de São Paulo indicando os 52 pontos de coleta realizados no período de outubro a novembro de 2001

Foram utilizadas pás metálicas ou plásticas esterilizadas a cada coleta, e sacos plásticos para acondicionar as amostras, mantendo-as em recipientes de isopor durante as viagens. Durante a noite, nos locais de pernoite, eram mantidas resfriadas em geladeiras convencionais. Retornando ao laboratório, quando o isolamento imediato não foi possível, o material foi preservado em câmara fria (10°C) até o momento adequado.

4.3 Mapeamento

A distribuição das coletas obedeceu a um critério geográfico de 52 pontos, em sua maioria equidistantes, no estado de São Paulo, mantendo uma distância média de 80 a 200km entre eles.

Todos os pontos de coletas foram georeferenciados (equipamento *GPS* – Garmin mod, *Etrex Vista*) e registrados em ficha desenhada para essa finalidade (Anexo 1). Os dados de altitude e precisão das coordenadas (correção DGPS/USGC até 15m) também foram coletados e constam no Tabela 1. Nas fichas de campo optou-se por manter a unidade *foot* (= 0,3048m), ao invés da unidade metro, para maior precisão. Essa precisão sofreu alguma variação devido às condições ambientais ou matas mais densas.

Os locais de coletas foram numerados e plotados sobre um mapa de *Cobertura Vegetal Natural e Reflorestamento* (I. Florestal/SINBIOTA, Figura 1). Após conversão das respectivas coordenadas para o sistema UTM, identificou-se a vegetação típica em cada ponto baseado no mapeamento realizado por satélite e a fisionomia geral de cada ponto.

4.4 Isolamento

Utilizou-se a técnica clássica da diluição seriada seguida de plaqueamento (TUIITE, 1969). 25g de cada amostra composta, previamente pulverizada e homogeneizada manualmente, foram adicionadas em erlenmeyer contendo 225ml de água estéril com algumas gotas de Tween 80 (Sigma, E.U.A.), para facilitar o desprendimento das estruturas do fungo das partículas de solo. O material foi mantido sob agitação constante por 30 minutos. As diluições subseqüentes foram realizadas de

maneira asséptica em capela de fluxo laminar, transferindo 10ml da suspensão para 90ml de água estéril, agitando-se manualmente por 1 minuto a cada transferência.

Após as diluições, 1,0ml das suspensões 10^3 e 10^4 foram distribuídos e espalhados nos meios de isolamento. As placas foram mantidas no escuro à 27°C e após 7 dias iniciava-se o isolamento das colônias mais características do fungo para posterior confirmação.

4.5 Meios de Cultura para Isolamento

Os meios testados foram: a) MMT, meio de Martin (1950) modificado conforme Homechin (1987); b) MC, pequena adaptação do MMT, que também inclui em sua composição a substância metalaxyl, que apresenta efeito supressor sobretudo sobre *Oomycetes* (ASKEW & LAING, 1993); c) TSMC, *Trichoderma Selective Medium* (ELAD et al., 1981) modificado; d) TSMM, TSM modificado conforme Smith et al. (1990) e e) DAVC, meio de Davet, (1979) modificado. A composição dos respectivos meios é relacionada na Tabela 2. Nos demais ensaios foram utilizados, rotineiramente, o meio batata dextrose (BDA) e, em alguns casos específicos, o meio de extrato de malte (GALLOWAY & BURGESS, 1952) ambos na forma de meios pré-preparados e desidratados (*Potato Dextrose Agar*, cód. 213400, Difco Labs., U.S.A., e *Malt Extract Agar*, cód. CM59, Oxoid, England, respectivamente). A composição destes meios consta na Tabela 3.

Em todos os meios foi acrescentado um redutor de crescimento (rosa de Bengala ou Triton X100) facilitando a identificação e o isolamento das colônias de *Trichoderma*.

O trabalho foi conduzido utilizando-se placas de Petri descartáveis estéreis 90x15mm, as quais, após a distribuição do meio, eram seladas e mantidas em temperatura ambiente por pelo menos 3 dias antes de sua utilização. A esterilização dos materiais e meios de cultura, sempre que necessária, foi feita através de autoclavagens a 121°C por 20 minutos, homogeneizando-se o meio fundido previamente à distribuição.

O volume de meio utilizado por placa em todos os experimentos foi de 20ml (aprox.) e as sementeiras, nos diferentes ensaios, salvo indicação contrária, foi realizada

com fio de platina (em cabo de Kolle) estéril “espetando-se” no meio de origem e em seguida no meio testado ou de transferência .

Tabela 1 – Coletas realizadas no Estado de São Paulo (2001), localização, georeferenciamento e dados de vegetação

COLETA	MUNICÍPIO	LATITUDE	LONGITUDE	ALTITUDE (m)	PRECISÃO (ft)	Ecosistemas
01	Aguai	S 22° 10' 34,3"	W 047° 01' 04,8"	-	-	Cerrado *
02	Aguai	S 22° 10' 34,3"	W 047° 01' 04,8"	-	-	Cerrado *
03	Itapira	S 22° 19' 56,3"	W 046° 48' 25,3"	-	-	Mata *
04	Itapira	S 22° 19' 11,6"	W 046° 48' 27,5"	-	-	Mata *
05	Jarinú	S 23° 00' 56,8"	W 046° 41' 44,2"	-	-	Capoeira *
06	Jarinú	S 23° 00' 56,0"	W 047° 41' 37,0"	-	-	Capoeira
07	Piracicaba	S 22° 42' 21,9"	W 047° 37' 48,0"	540	29	Mata
08	São Paulo	S 23° 33' 57,5"	W 046° 43' 43,5"	749	44	Capoeira
09	São Paulo	S 23° 38' 34,9"	W 046° 37' 29,8"	746	37	Mata
10	Campinas	S 22° 54' 20,9"	W 047° 00' 53,5"	671	45	Capoeira
11	Esp.Sto. Pinhal	S 22° 10' 09,5"	W 046° 46' 10,7"	838	30	Capoeira
12	S. Roque Fartura	S 21° 50' 39,1"	W 046° 42' 26,9"	1504	28	Capoeira
13	Casa Branca	S 21° 47' 36,6"	W 047° 01' 53,3"	725	34	Várzea
14	Porto Ferreira	S 21° 50' 31,7"	W 047° 25' 04,5"	659	29	Cerradão
15	Pirassununga	S 22° 01' 18,6"	W 047° 26' 12,8"	687	32	Capoeira
16	Leme	S 22° 13' 04,4"	W 047° 23' 35,7"	676	29	Mata
17	Arujá	S 23° 22' 54,6"	W 046° 15' 39,4"	678	40	Mata
18	S.J. Campos	S 23° 09' 07,8"	W 045° 46' 57,2"	610	25	Mata
19	Taubaté	S 22° 59' 56,5"	W 045° 29' 50,5"	594	27	Mata
20	Aparecida	S 22° 52' 21,6"	W 045° 15' 04,5"	596	29	Capoeira
21	Guaratinguetá	S 22° 55' 24,9"	W 045° 05' 08,0"	1012	23	Mata
22	Cunha	S 23° 05' 50,7"	W 044° 57' 21,4"	1067	28	Capoeira
23	Tabuão	S 23° 08' 19,1"	W 044° 54' 01,7"	1294	28	Capoeira
24	Picinguaba	S 23° 21' 14,0"	W 044° 45' 56,5"	269	29	Restinga
25	Ubatuba	S 23° 21' 16,7"	W 044° 51' 00,8"	9	25	Mata
26	Caraguatatuba	S 23° 34' 01,8"	W 045° 17' 07,2"	19	25	Mata
27	Maresias	S 23° 49' 31,4"	W 045° 29' 13,5"	209	35	Mata
28	Bertioga	S 23° 49' 18,8"	W 046° 07' 46,7"	6	25	Restinga
29	Itanhaém	S 24° 10' 50,6"	W 046° 48' 38,2"	6	27	Restinga
30	Pedro Barros	S 24° 16' 26,8"	W 047° 24' 54,7"	53	29	Capoeira
31	Registro	S 24° 31' 43,2"	W 047° 51' 26,1"	15	25	Capoeira
32	Cajati	S 24° 45' 07,3"	W 048° 09' 20,8"	53	27	Mata
33	Juquiá	S 24° 06' 28,0"	W 047° 37' 27,5"	172	25	Mata
34	Itapetininga	S 23° 35' 13,8"	W 047° 57' 00,7"	632	26	Capoeira
35	Tatuí	S 23° 16' 48,5"	W 047° 48' 26,2"	603	25	Capoeira
36	Ourinhos	S 22° 52' 09,8"	W 049° 38' 10,7"	504	27	Mata
37	Piratininga	S 22° 21' 15,1"	W 049° 10' 11,9"	496	26	Capoeira
38	Marília	S 22° 09' 43,9"	W 050° 03' 36,4"	621	24	Mata
39	Herculândia	S 21° 59' 06,7"	W 050° 24' 41,5"	493	26	Mata
40	Quatá	S 22° 05' 27,0"	W 050° 36' 39,2"	450	25	Capoeira
41	Martinópolis	S 22° 13' 52,7"	W 050° 59' 07,1"	544	28	Cerradão
42	Pte. Venceslau	S 21° 51' 55,3"	W 051° 49' 08,9"	363	28	Mata
43	Andradina	S 20° 55' 54,5"	W 051° 18' 26,4"	404	26	Mata
44	Araçatuba	S 21° 01' 32,6"	W 050° 27' 33,8"	356	25	Mata
45	Jales	S 20° 23' 50,6"	W 050° 30' 43,6"	452	25	Capoeira
46	Votuporanga	S 20° 22' 30,8"	W 050° 02' 57,9"	483	24	Mata
47	S.J. do Rio Preto	S 20° 47' 56,3"	W 049° 31' 44,6"	560	25	Mata
48	Olímpia	S 20° 42' 18,1"	W 048° 57' 11,9"	521	31	Mata
49	Morro Agudo	S 20° 43' 46,0"	W 048° 01' 01,7"	551	29	Capoeira
50	Buritzinho	S 20° 33' 33,6"	W 047° 32' 26,6"	890	25	Mata
51	Cravinhos	S 21° 24' 24,3"	W 047° 51' 47,6"	536	25	Capoeira
52	São Carlos	S 21° 58' 13,4"	W 047° 57' 01,6"	837	25	Cerrado

Tabela 2 – Meios de cultura testados para isolamento de *Trichoderma* a partir de amostras de solo. Os campos em destaque indicam as alterações em relação ao meio original e as substâncias marcadas com asterisco não foram incluídas, embora constem na descrição original dos respectivos meios

Componente	MEIOS DE CULTURA (g/l)				
	TSMC	TSM	DAVC	MMT	MC
KH ₂ PO ₄	-	0,12	0,125	1,00	1,00
K ₂ HPO ₄	0,90	-	-	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20	0,26	0,25	0,50	0,50
KNO ₃	-	0,26	0,25	-	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	-	1,00	1,00	-	-
Ca(NO ₃) ₂	-	1,00	1,00	-	-
KCl	0,15	-	-	-	-
NH ₄ NO ₃	1,00	-	-	-	-
Cloranfenicol	0,25	-	-	-	0,25
Clortetraciclina *	-	0,05	-	-	-
sulfato de estreptomicina	-	-	0,03	-	-
Agrimicina 100	-	-	-	0,18	0,18
Dexon (fenaminosulf) *	0,30	-	-	-	-
quintozene (pcnb)	0,20	-	-	0,07	0,20
rosa de Bengala	0,15	-	-	0,033	0,033
Captan	0,02	0,04	-	-	-
vinclozolin *	-	0,0025	0,0025	-	-
Metalaxyl	-	-	-	0,20	0,20
Igepal 630 (Alltech)(ml) *	-	1,00	-	-	-
álcool alílico (ml) *	-	-	0,50	-	-
ácido cítrico *	-	0,05	0,05	-	-
peptona	-	-	-	5,00	5,00
dextrose	-	-	-	10,00	10,00
glicose	3,00	-	-	-	-
sacarose	-	2,00	2,00	-	-
agar	20,00	20,00	25,00	20,00	15,00

Tabela 3 – Meios de cultura utilizados rotineiramente no trabalho para reavivamento, preservação, manutenção e observações micro e macroscópicas

COMPONENTE	MEIOS DE CULTURA (g/l)	
	BDA	ME
batata (infuso)	200,00	-
dextrose	20,00	-
extrato de malte	-	30,00
peptona	-	5,00
pH	5,6 ± 0,2	5,4 ± 0,2
agar	15,00	15,00
H ₂ O dest. (q.s.p.)	1000ml	1000ml

4.6 Coleção de Referência

A coleção de referência foi composta por linhagens oriundas de diversas procedências e codificadas por **IB** (=Instituto Biológico). A relação de isolados, procedências, dados de identificação segundo instituições de origem, e informações

específicas constam do Quadro 2. Tanto a coleção de referência como a coleção de trabalho (539 isolados) foram depositadas no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal (Instituto Biológico de São Paulo) e na EMBRAPA (Meio Ambiente, Jaguariúna – SP), para ser incorporada na coleção oficial desta instituição (WDCM712, código “CG”).

4.7 Caracterização dos Isolados de Referência

Os isolados da Coleção de Referência foram avaliados quanto ao crescimento nos meios de cultura BD e ME, nas temperaturas de 15; 20; 25; 30 e 35°C e, quanto às variações das colônias. Nestes ensaios discos com estruturas dos fitopatógenos de referência são depositados no centro das placas e próximo a lateral da placa (20mm).

A avaliação foi realizada em intervalos de 24h, pela medida do diâmetro médio (3 medições por ponto semeado) de crescimento micelial do fungo, o qual foi semeado em 3 pontos equidistantes. No experimento onde a semeadura foi realizada no setor lateral da placa, foi medido o maior raio da colônia (média de 3 medições).

As observações e análise dos diferentes aspectos das colônias foram realizadas e registradas através de fotomicrografias digitais com o auxílio de microscópio ótico convencional (*Nikon Eclipse E200*) e confocal (*Zeiss Axiovert 100TS*) com sistema analisador de imagens (*BioRad*). As medições dos fialoconídios das espécies de referência foram realizadas com este último equipamento e o critério para a observação e medição considerou 4 contagens de 5 conídios cada (dimensões médias de 20 unidades) em campos colhidos aleatoriamente.

As culturas em lâmina dos isolados para observações morfológicas foram realizadas através de uma variação da técnica de Ridell (1950), desenvolvida durante o procedimento das observações e divulgada recentemente (CORABI-ADELL, 2003, ver Anexo 2).

Para auxiliar a análise, identificação e comparação dos isolados foi elaborado um Atlas amplamente ilustrado (114p.) com a descrição das 27 espécies atualmente reconhecidas como válidas (SAMUELS, 2004).

Quadro 2 – Coleção de Referência, codificação e características adicionais das linhagens de *Trichoderma* spp. mantidas no Instituto Biológico de São Paulo – Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal

CODIGO L.Biologico	ESPÉCIE (cf. <i>classificação de origem</i>)	OBSERVAÇÕES (<i>dados de registro, classificação e coleta</i>)	PROCEDÊNCIA (<i>instituição</i>)	Código de Origem
IB 01	<i>Trichoderma hamatum</i> (Bon.) Bain		EMBRAPA/CNPMA	---
IB 02	<i>Trichoderma polysporum</i> (Link: Fr.) Rifai		EMBRAPA/CNPMA	---
IB 03	<i>Trichoderma aureoviride</i> Rifai		EMBRAPA/CNPMA	---
IB 04	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai	IMI 302407	EMBRAPA/CNPMA	302407
IB 05	<i>Trichoderma</i> sp.	IMI 373509	EMBRAPA/CNPMA	CG-47
IB 06	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	IMI 373512. Dr. H.Rolph.	EMBRAPA/CNPMA	CG-75
IB 07	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	IMI 373510. This is an example of the anamorphic state of the ascomycete genus <i>Hypocrea</i> (Domsch <i>et al.</i> , 1980), <i>Compendium of Soil Fungi</i> , v.1 797-9 pp.). It has a very common occurrence worldwide, being isolated from a wide range of substrates, specially soils; it has been shown to cause lesions in corn seedlings, Mcfadden & Sutton (1975) <i>Relationships of populations of Trichoderma</i> spp. in soil disease in maize, <i>Can.J.Pl.Sci.</i> 5:579-586) and causes extreme damage to <i>L.edodes</i> , Komatsu (1976) <i>Studies on Hypocrea, Trichoderma and allied fungi antagonistic to Shitake, L.edodes</i> , Rept. Tottori Mycol. Inst. (Japan) 131-113. Dr. H.Rolph.	EMBRAPA/CNPMA	CG-81
IB 08	<i>Trichoderma koningi</i> Oud.	IMI 361084. Dr. B.C. Sutton.	EMBRAPA/CNPMA	TISS-3
IB 09	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai		EMBRAPA/CNPMA	TISS-9
IB 10	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	IMI 361092. But the phialides are much more globose than is usual, like <i>Trichoderma piluliferum</i> Webster & Rifai. The green colony colour shows that it is not this species which is white. Dr. B.C. Sutton. DSM 769=ATCC 26921=CCMF-522 (= <i>T.longibrachiatum</i>)	EMBRAPA/CNPMA	TISS-13
IB 11	<i>Trichoderma reesei</i> E.G. Simmons		EMBRAPA/CNPMA	QM-9414
IB 12	<i>Trichoderma pseudokoningii</i> Rifai		EMBRAPA/CNPMA	TISS
IB 13	<i>Trichoderma koningi</i> Oud.	IMI 373516. This is an example of the anamorphic state of the ascomycete genus <i>Hypocrea</i> (Domsch <i>et al.</i> , 1980, <i>Compendium of Soil Fungi</i> v.1, pp. 799-801. Teleomorphs are <i>H. ceramica</i> (Ellis & Everh. 1982) and <i>H. brassicae-lutea</i> (Dot 1975). It has an extremely common occurrence in a wide variety of soils, many types of leaf litter, crop roots and other substrates (Domsch <i>et al.</i> 1980). Dr. H.Rolph. Vilhena, Rondônia.	EMBRAPA/CNPMA	TAM-1

Quadro 2 – Coleção de Referência, codificação e características adicionais das linhagens de *Trichoderma* spp. mantidas no Instituto Biológico de São Paulo – Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal

(continua)

CÓDIGO I.Biológico	ESPÉCIE (cf. <i>classificação de origem</i>)	OBSERVAÇÕES (<i>dados de registro, classificação e coleta</i>)	PROCEDÊNCIA (<i>instância</i>)	Código de Origem
IB 14	<i>Trichoderma stromaticum</i> Samuels & Pardo-Schultheiss	IMI 373517, Dr. H. Rolph.	EMBRAPA/CNPMA	TVC-1
IB 15	<i>Trichoderma</i> sp.	IMI 361079.	EMBRAPA/CNPMA	T-26
IB 16	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	IMI 314381. Polyester polyurethane foam.	Coleção de Culturas Tropical	CCT 1202
IB 17	<i>Trichoderma virens</i> (J.Müller, Giddens & Foster) von Arx	IMI 45553=CCT 1888=QM 365=ATCC 9645 (<i>Gliocladium virens</i>) NRRL 2314=CBS 430.54=IFO 6355, Soil, Md, USA. Degradation of plastics. Fungus resistance testing (ASTM Std. G21, 1980, USA).	Coleção de Culturas Tropical	CCT 1211
IB 18	<i>Trichoderma inhamatum</i> Veerkamp & W.Gans	Pfennig, L., 01/94; =CBS 546.89. Root under on primary forest (Amazonian forest). Belém, Brazil.	Coleção de Culturas Tropical	CCT 3825
IB 19	<i>Trichoderma</i> sp.	liofil., cogumelo, Mogi das Cruzes/SP – CEPECC, Anibal.	Micoteca I.Biológico SP	289-H
IB 20	<i>Trichoderma</i> sp.	liofil., cogumelo, Botujuru, Mogi das Cruzes/SP, sr. Lee, Anibal.	Micoteca I.Biológico SP	283-H
IB 21	<i>Trichoderma viride</i> Pers.:Fr.	Liofil., solo, Okayama Tobacco Exp. Station, cult. original 1188, Sumishi Oshyama (<i>T.lignorum</i> ?) Japão, Dr. M.F. Figueiredo.	Micoteca I.Biológico SP	5/76
IB 22	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	atividade em <i>Crispella perniciosa</i> . Alan Pomela.	Cia. Almirante Cacau – BA	FAGG
IB 23	<i>Trichoderma virens</i> (J.Müller, Giddens & Foster) von Arx	Amazonas, Brasil, solo petrolífero, 1991; OM, liof.	Univ. Fed. Pernambuco	URM 3307
IB 24	<i>Trichoderma viride</i> Pers.: Fr.	UFPRPE, Pernambuco, Brasil, 1992, OM.	Univ. Fed. Pernambuco	URM 3344
IB 25	<i>Trichoderma hamatum</i> (Bon.) Bain.	Pernambuco, Brasil, excremento de aves, 1994; OM.	Univ. Fed. Pernambuco	URM 3492
IB 26	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai	São Paulo, Brasil, rizosfera de <i>Viguiera discolor</i> , 1994; OM, liof.	Univ. Fed. Pernambuco	URM 3522
IB 27	<i>Trichoderma pseudokoningii</i> Rifai		Univ. Fed. Pernambuco	URM 4467
IB 28	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai		Univ. Fed. Pernambuco	URM 4475
IB 29	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai		CENA/USP	1151 UNB
IB 30	<i>Trichoderma stromaticum</i> Samuels & Pardo-Schultheiss		CENA/USP	UNB

A referência para consulta de rotina, foi elaborada a partir de material proveniente do *USDA*, E.U.A. (Internet) e consta de detalhes descritivos e ilustrativos dos conídios, fiálides, conidióforos, presença ou ausência de prolongamentos de hifas férteis ou estéreis, clamidósporos, e detalhes da fase teleomórfica (*Hypocrea* sp.) quando disponíveis. O Anexo 3 exemplifica parte do atlas, apresentando a descrição das espécies *T. spirale*; *T. stromaticum* e *T. viride*, sendo o original posteriormente incorporado ao acervo do Laboratório de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo.

4.8 Manutenção e Preservação dos Isolados

Durante o período de pesquisa os isolados da coleção de referência (Quadro 2) e da Coleção de Trabalho (Tabela 1, referente às coletas) foram mantidos pelos métodos de Castellani (1967) e em câmara fria à 10°C (periodicamente subcultivados).

Alguns isolados, relacionados no Quadro 3, foram liofilizados em solução de sacarose ou leite desnatado (5%), e também mantidos em solução de glicerol a 20% para avaliações periódicas quanto à sua viabilidade. As suspensões de conídios das amostras foram colocadas em ampolas de vidro estéreis de 5ml, contendo pequena quantidade de algodão. O reavivamento e verificação da viabilidade das culturas foram feitos nos meios BD ou ME (1-2 subcultivos), mediante deposição unitária no centro da placa de bloco de agar e/ou estruturas do fungo. As placas foram mantidas a 27°C no escuro e avaliadas após 72h.

Quadro 3 – Isolados de trabalho e referência submetidos aos diferentes métodos de preservação

ISOLADOS			
01-01	IB-01	IB-14	IB-27
01-02	IB-02	IB-15	IB-28
01-15	IB-03	IB-16	
02-03	IB-04	IB-17	
02-05	IB-05	IB-18	
02-10	IB-06	IB-19	
02-14	IB-07	IB-20	
03-04	IB-08	IB-21	
04-01	IB-09	IB-22	
04-04	IB-10	IB-23	
04-09	IB-11	IB-24	
09-04	IB-12	IB-25	
10-03	IB-13	IB-26	

4.9 Avaliação da Atividade Celulolítica

4.9.1 Meios de Cultura

A atividade celulolítica dos isolados foi verificada *in vitro* através da capacidade de degradação da celulose incluída na composição do meio de cultura. Este ensaio pode ser considerado como sendo uma avaliação semi-quantitativa da celulase e, embora não tenha sido realizada a etapa quantitativa, possibilita a comparação de produção entre os isolados testados (TEATHER & WOOD, 1982; HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975, 1977).

Ensaio preliminares foram realizados avaliando-se: a) a fonte de celulose mais facilmente degradada e visualizada *in vitro*, seja ela na forma microcristalina ou como carboximetilcelulose; b) concentração do agente redutor de colônia; e c) procedência nacional (Prolab, Brasil) e importado (Sigma, E.U.A.); d) temperatura mais adequada (20 e 27°C); e) meio de cultura de origem – MEA ou BDA; f) período ideal para avaliação do halo de degradação.

Comparou-se os seguintes meios descritos em literatura cuja a única fonte de carbono é a celulose: a) meio de celulose asparagina (CA) (EGGINS & PUGH, 1962); b) meio de carboximetilcelulose (CMC) (CAPELLINI & PETERSON, 1965), e c) meio CA1 (CA modificado).

A composição dos mesmos consta no Tabela 4. A carboximetilcelulose (Merck, Brasil) foi dissolvida separadamente dos outros componentes, adicionando-se ao restante do meio após completa homogeneização por aquecimento.

4.9.2 Condições experimentais

A capacidade de degradação de celulose foi verificada *in vitro* através da medição do halo de degradação produzido pelos isolados celulolíticos. Após a padronização das condições de ensaio, foram selecionados, aleatoriamente, 4 a 6 isolados de cada coleta para avaliação da atividade celulolítica totalizando 257 isolados

amostrados. O isolado de referência IB-11 (*T. reesei* = QM9414 = ATCC26921 = CCMf-522 = DSM769) foi utilizado em todos os ensaios como padrão de atividade.

Tabela 4 – Meios de cultura utilizados para avaliar a atividade celulolítica dos isolados de *Trichoderma* a partir de amostras de solo (* = na fórmula original sulfato de magnésio cristalino cf. EGGINS & PUGH, 1962)

COMPONENTE	MEIOS DE CULTURA (g/l)		
	CMC	CA	CA1
KH ₂ PO ₄	1,00	1,00	1,00
MgSO ₄ .7H ₂ O *	0,50	0,20	0,50
CaCl ₂	-	0,10	0,10
KCl	-	0,50	0,50
NH ₄ NO ₃	1,00	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	0,50	0,50
L-asparagina	-	0,50	0,50
extrato de levedura	1,00	0,50	0,50
carboximetilcelulose	15,00	-	10,00
celulose (microcristalina)	-	10,00	-
agar	20,00	20,00	15,00
H ₂ O dest. (q.s.p.)	1000ml	1000ml	1000ml

Os isolados, crescidos em meio BD, já em estágio de conidiação, foram semeados em 3 pontos equidistantes (triplicata) nos meios testados da mesma maneira descrita no ensaio de isolamento (item 4.4). Em seguida as placas foram incubadas à 27°C no escuro. A revelação foi feita após 7 dias, cobrindo-se as colônias com uma solução aquosa de vermelho do Congo (1mg/mL), por 15 minutos. Após a retirada da solução corante a superfície do meio é lavada com solução de NaCl 1M, por 15min. (TEATHER & WOOD, 1982). As zonas de hidrólise da carboximetilcelulose foram medidas com auxílio de régua milimetrada sobre um negatoscópio.

O meio de cultura utilizado foi o CA1 (ver item anterior), sendo realizadas 3 repetições (em alguns casos mais) tomando-se 3 medidas (mm) de cada colônia/halo. A modulação de atividade celulolítica entre as amostras foi estimada através do cálculo de média simples e o respectivo desvio padrão. O componente Triton X100 (Prolab, Brasil) foi incluído em todos os meios (0,1%) visando reduzir o tamanho das colônias e facilitar, assim, a observação do halo de degradação.

4.10 Avaliação do Potencial de Biocontrole

4.10.1 Avaliação *in vitro* da ação dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento de *Pythium aphanidermatum*

A atividade de biocontrole (antibiose/parasitismo) de 50 isolados obtidos de 10 pontos de coleta foi verificada primeiramente *in vitro* e subseqüentemente em condições de casa de vegetação. Utilizou-se o método do pareamento de culturas no qual discos de meio BDA (Ø6mm), com estruturas dos isolados testados e do patógeno *Pythium aphanidermatum*, são retirados de culturas reavivadas e crescimento ativo e, em seguida, são depositados em lados opostos de placas de Petri contendo mesmo meio conforme descrito por Bell et al. (1982). As placas ficaram incubadas por cinco dias a 27°C no escuro. Após esse período, foi feita a leitura do tipo de interação, atribuindo-se notas para os isolados conforme a escala de Bell et al. (1982) apresentada a seguir:

Nota (1) - *Trichoderma* completamente crescido sobre o patógeno preenchendo toda a placa;

Nota (2) - *Trichoderma* com crescimento de pelo menos 2/3 da superfície do meio;

Nota (3) - *Trichoderma* e patógeno ocupando cerca de 1/2 da superfície do meio cada um, não havendo nenhum domínio de um sobre o outro;

Nota (4) - patógeno colonizando pelo menos 2/3 da superfície do meio e aparentemente sendo impedido de crescer devido ao *Trichoderma*;

Nota (5) - patógeno crescido sobre o *Trichoderma* preenchendo a superfície do meio.

Todos os isolados foram submetidos ao ensaio de antibiose e em casa de vegetação no sentido de verificar uma possível correspondência entre as respostas apresentadas.

4.10.2 Avaliação da produção de metabólitos tóxicos

A produção de substâncias que podem inibir ou matar o patógeno foi verificada através do ensaio de antibiose. Após o cultivo dos 48 isolados em meio líquido BD (1ml), incubados por 72h a 27°C no escuro, alíquotas desse meio (100µl) foram depositadas em perfurações eqüidistantes, feitas assepticamente com auxílio de furador

de rolas (\varnothing 4mm) em meio BDA, 3 repetições por tratamento. Um disco do patógeno foi colocado no centro dessas placas e incubadas a 27°C. A avaliação foi realizada após 5 dias pela medida (mm) do halo de inibição do patógeno provocada pela presença de princípio ativo difundido no meio que foi adicionado aos pequenos poços.

4.10.3 Avaliação *in vivo* da ação dos isolados de *Trichoderma* spp.

O efeito biocontrolador desses isolados foi avaliado pelo tombamento de plântulas de pepino (*damping-off*) em condições de casa de vegetação, aplicando-se simultaneamente uma suspensão do patógeno e dos isolados de *Trichoderma* spp. próximo à região do colo das plântulas. A aplicação foi realizada 7 dias após a germinação das sementes (5 repetições), utilizando-se como veículo desses microrganismos um substrato comercial para hortaliças (*Vida Verde* – Mogi Mirim - SP). A avaliação foi feita 7 dias depois pelo cálculo da porcentagem de plantas mortas em relação às plantas controle inoculadas apenas com o patógeno

4.11 Análise Molecular

4.11.1 Extração do DNA genômico

Em ensaio preliminar utilizou-se o TNES como solução de lise (250mM Tris pH 7,5, 2 M NaCl, 100mM EDTA e 2,5% SDS em 20ml H₂Odd). A partir de placas com isolados apresentando profusa conidiação foi realizada uma raspagem superficial dos conídios. Em seguida o material foi tratado com proteinase K (3 μ l, 20mg/ml) e com RNase A (3 μ l, 4mg/ml). A precipitação das proteínas foi feita com NaCl 5M (200 μ l) e do DNA com isopropanol 100%, seguindo o procedimento convencional. No passo final os tubos foram secos em centrífuga de vácuo e o DNA hidratado com 30-40 μ l de DNA *Hydration Solution*. A eletroforese em gel de agarose (corrida em TBE) feita com o produto resultante não revelou nenhuma banda.

Adotou-se o protocolo descrito por Cennis (1992) devido à praticidade, eficiência satisfatória e menor número de passos. Neste procedimento as culturas são

colocadas para crescer em meio líquido estacionário (BD) ou sob leve agitação por 72 horas no escuro a 27°C. Após esse período observa-se profuso crescimento de hifas vegetativas na superfície do meio. Este material é utilizado para a extração após ser devidamente filtrado em condições estéreis (capela de fluxo laminar).

A avaliação da eficiência e pureza da extração foi verificada rotineiramente por eletroforese em gel de agarose 1,5% (TAE 1X) e revelada na presença de brometo de etídio adicionado ao gel fundido. As quantidades de amostras aplicadas foram padronizadas em 8µl da solução de DNA e 4µl do tampão indicador (carregamento). O marcador molecular (*ladder*) utilizado foi de 1Kb (Promega, E.U.A.) e a voltagem de corrida variou em função da cuba utilizada (5V/cm → 80 – 100V). A leitura do gel obtido foi realizada e digitalizada na presença de UV em equipamento específico (BioRad, Inglaterra).

Com o objetivo de melhorar a qualidade (pureza) do DNA extraído em relação ao protocolo citado, testou-se variações nos constituintes do tampão de extração conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5 - Soluções tampão utilizadas na extração do DNA genômico

Componentes	TEa	TEb
Tris HCl (mM)	200	250
EDTA (mM)	25	100
NaCl (M)	0,25	2,00
SDS	0,5%	2,5%
pH	8,5	7,5

4.11.2 Amplificação do DNA

O DNA obtido foi diluído 1:50 em água milliQ estéril seguindo-se a amplificação da região *ITS1=5.8S rDNA=ITS2* em termocicladores (PE2400, Perkin Elmer e PT100, MJ Research, E.U.A). Os iniciadores utilizados são descritos no Quadro 4 e a composição de cada reação (25µl) na Tabela 6.

O programa de amplificação utilizado inicialmente foi: a) 94°C/3'; b) 94°C/30"; c) 56°C/30"; d) 72°C/1,5', repetindo-se os passos b), c) e d) 35 vezes (ciclos). Segue-se para a extensão final e) 72°C/7', e f) 4°C/∞, até a retirada da amostra para análise.

Quadro 4 – Iniciadores empregados para a amplificação da região ITS do rDNA

Iniciador	Seqüência	Autores
ITS 1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White <i>et al.</i> (1990)
ITS 4	5'-TCCTTCCGCTTATTGATATGC-3'	White <i>et al.</i> (1990)

Tabela 6 – Composição da reação de amplificação do DNA genômico utilizando-se os iniciadores ITS1 e ITS4

Componente	Quantidade (µl)
DNA amostra	1,00
iniciador ITS1	0,50
Iniciador ITS4	0,50
tampão 10x	2,50
MgCl ₂ (50mM)	1,25
DNTPs (10mM)	0,50
Taq polimerase	0,25
H ₂ O milliQ est.	18,50
Total	25,00

Na tentativa de aumentar a eficiência da amplificação da região *ITS* (concentração e especificidade) para os iniciadores *ITS1* e *ITS4*, diferentes programas foram testados, variando-se o tempo e temperatura de alguns passos: 1) 95°C/2'; 50-55°C/1'; 72°C/45"; 95°C/1'; 72°C/10'; 4°C/∞; 30-35 ciclos (KINDERMANN *et al.*, 1998); 2) 94°C/2'; 94°C/1'; 52°C/1'; 72°C/1'; 72°C/5'; 4°C/∞; 35 ciclos; 3) 94°C/2'; 94°C/10"; 58°C/30"; 72°C/1,5'; 72°C/7'; 4°C/∞; 35 ciclos; e 4) 94°C/3'; 94°C/30"; 56°C/30"; 72°C/1,5'; 72°C/7'; 4°C/∞; 35 ciclos.

4.11.3 Purificação para a *PCR* de seqüenciamento

O produto da amplificação inicial foi purificado inicialmente através de microcolunas com o *kit* Concert (Gibco BRL, E.U.A.). Por questões de custo foi testado um protocolo que utiliza a precipitação com isopropanol 75%. Ele consistiu dos seguintes passos: 40µl de isopropanol 75%, homogeneização por inversão e incubação por 15' em temperatura ambiente no escuro e centrifugação 12.000rpm/20'. Em seguida o sobrenadante é removido (preferencialmente com auxílio de bomba de vácuo) e acrescenta-se mais 150µl do isopropanol. Repete-se a homogeneização e o sobrenadante

é descartado. As amostras são então secas no aparelho SpeedVac (Eppendorf, E.U.A.) (30°C, 2 x 5') e mantidas no *freezer* até o momento do seqüenciamento, quando então são ressuspendidas para a amplificação seguinte.

4.11.4 Seqüenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2

Para as reações de seqüenciamento (*PCR*) foram feitas reações de 10µl, contendo 5,0 µl do produto da reação, 2,0µl de *ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, E.U.A.), e 2,5 pmoles de cada iniciador senso (*forward*) e anti-senso (*reverse*). Os produtos das reações de seqüenciamento foram resolvidos e lidos por seqüenciador automático modelo ABI 377 (Applied Biosystems, E.U.A.), acoplado a um computador Macintosh (E.U.A.). O seqüenciamento das amostras foi realizado nos dois sentidos de leitura para maior garantia e fidelidade da análise.

4.11.5 Análise das seqüências obtidas

As seqüências obtidas foram comparadas com a sua fita complementar e em alguns casos foi gerada uma seqüência de consenso processada pelo programa BioEdit 5.0.9 (HALL, 1999) e submetidas através do programa BLASTN (ALTSCHUL *et al.*, 1997) para comparação com outras já depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para identificação das espécies conforme a similaridade genética.

4.11.6 Análise da utilização de iniciadores RAPD na triagem das amostras

Amostras de isolados provenientes de amostra escolhida aleatoriamente (ponto de coleta no. 16) foram avaliados pela metodologia RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) (WILLIAMS *et al.* 1990) quanto à sua similaridade genética. Foram testados os isolados 16-01; 16-04; 16-05 e 16-08, com os iniciadores oligonucleotídicos decaméricos universais OPC-4; OPC-9; OPF-1; OPF-3; OPY-11 e OPX-12 (Operon Technologies, E.U.A.), relacionados no Quadro 5. Como protocolo de base

consideramos aquele descrito por Fujimori & Okuda (1993) como algumas modificações baseadas em nossa experiência anterior. A reação RAPD foi feita num volume total de 25µl contendo 0,5 u *Taq* DNA polimerase, 1,0µl do iniciador (sol. 10µm), 1,0µl de dNTP mix 10µm; 1,0µl MgCl₂ 50mM, 2,5µl PCR buffer 50x; e 5µl da solução de DNA molde. As amostras foram amplificadas em termociclador (Perkin Elmer 2400, E.U.A.), e o programa conduzido inicialmente a 92°C por 1', e 45 ciclos de desnaturação a 92°C/45", anelamento a 34°C/1', extensão a 72°C/90", extensão final a 72° por 10'. A avaliação foi feita com 8µl do produto do PCR e 4µl de tampão de corrida. As condições de eletroforese e leitura seguiram como descrito no item anterior. Foi utilizado 4µl do marcador molecular de 100Kb para comparação das bandas dos fragmentos amplificados. A eletroforese foi feita em gel de agarose diferentemente do trabalho citado que utilizou acrilamida 5%.

Quadro 5 – Iniciadores nucleotídicos decaméricos empregados no ensaio de triagem de amostras

Iniciador (OP)	Seqüência	Amostras Testadas
C-4	5'-CCGCATCTAC-3'	16-01; 16-04; 16-05; 16-08
C-9	5'-CTCACCGTCC-3'	
F-1	5'-ACGGATCCTG-3'	
F-3	5'-CCTGATCACC-3'	
X-12	5'-TCGCCAGCCA-3'	
Y-11	5'-AGACGATGGG-3'	

4.12 Análise Taxonômica

As características morfo-fisiológicas de 27 táxons foram submetidas a análises multivariadas com o objetivo de verificar a validade de métodos de taxonomia numérica na identificação de padrões de afinidades entre eles e análise de variáveis. Os caracteres utilizados foram reunidos a partir da revisão mais recente do grupo (SAMUELS et al., 2004), incluindo os principais representantes das 4 seções anamórficas consideradas por Gams & Bisset (1998).

A subdivisão em classes de variáveis observou relativa equiponderação a fim de atribuir pesos iguais às diversas classes, conforme Valentin (2000). Na Tabela 7 são apresentados os caracteres considerados e as respectivas classes, e a Tabela 8 mostra os

dados homogeneizados através de codificação binária originando uma matriz (27 x 114) que foi utilizada para as análises de grupamento e de ordenação. 2 amostras (*T. aureoviride* = AU, *T. crassum* = CR) e 24 variáveis foram subtraídas devido à ausência de alguns dados (*missing data*). A matriz de similaridade (25x90) foi obtida utilizando-se o índice de similaridade genética desenvolvido por Nei & Li (1979, NEI, 1987), equivalente ao índice de Dice (1945) no programa utilizado. Considerando que combinações diferentes entre índices de similaridade (distância) genética e algoritmos de agrupamento podem derivar fenogramas diferentes, o ensaio foi padronizado com o coeficiente de Dice. A partir de matriz de similaridade estandarizada aplicou-se o método *neighbor-joining* (NJ, SAITOU & LI, 1987) e, paralelamente o método UPGMA, no programa SAHN (*Seqüencial, Agglomerative, Hierarquical, and Nested Clustering Method*, SNEATH & SOKAL, 1973) para obtenção do índice cofenético, construção dos fenogramas e plotagem bi e tri dimensional. Para o processamento dos dados utilizou-se o programa NTSYS-pc, v. 2.0 (ROLFH, 1998). A codificação das espécies é discriminada no Quadro 6.

Como método multidimensional de ordenação utilizou-se a análise em componentes principais, que considera as distâncias geométricas entre as amostras como sendo as distâncias genéticas entre elas. Os autovalores e autovetores, obtidos a partir da matriz de correlação padronizada, foram plotados (objetos e variáveis) através do programa gráfico MaxPlot.

Para testar a estabilidade dos agrupamentos formados, a análise de *bootstrap* foi aplicada através de 2000 amostragens, utilizando o programa WinBoot (YAP & NELSON, 1996).

Tabela 7 – Descritores qualitativos e respectivas classes utilizados no estudo de *Trichoderma* spp.

Caracteres		Classes / Estados
Conídio	1 Formato	1: subgloboso 2: elipsoidal 3: oblongo 4: subgloboso-obovóide 5: oblongo-elipsoidal 6: elipsoidal-ovóide 7: globoso-subgloboso/ovóide 8: oblongo-subelipsoidal/subgloboso
	2 Comprimento(µm)	1: <3 2: ≥3-3,9 3: ≥4-4,9 4: ≥5
	3 Média (compr.)	1: <3 2: 5-6 3: 7-9 4: 10-12 5: 13-15
	4 Desvio (compr.)	1: <6 2: 6-10 3: >10
	5 Largura (µm)	1: <2,0 2: 2,0-2,5 3: 3,0-3,9 4: >3,9
	6 Média (larg.)	1: 1-2 2: 3-4 3: 5-6 4: 7-8 5: >9
	7 Desvio (larg.)	1: <3 2: 3-6 3: >6
	8 Larg./Compr.	1: <1 2: 1,2-1,4 3: 1,5-1,7 4: 1,8-2,0 5: >2,0
	9 Ornamentação	1: liso 2: levemente espiculado 3: tuberculado-conspicuamente tuberculado
	10 Pigmentação	1: verde-verde escuro 2: branco-amarelo 3: branco-amarelo-verde
Conidióforo	11 Ramificação	1: cotomoso 2: típico do gênero <i>Gliocladium</i>
	12 Prolongamento de hifas estéreis	1: ausente 2: presente sinuosa 3: presente reta
	13 Prolongamento de hifas férteis originadas dos conidióforos ou póstulas	1: ausente 2: presente
Fialide	14 Pústulas em <i>corn meal</i> agar	1: ausente 2: presente
	15 Disposição dos conídios	1: secos 2: suspensos em gotas
	16 Comprimento (µm)	1: 0,2-0,9 2: 1,0-1,9 3: 2,0-2,9 4: 3,0-3,9 5: 4,0-4,9 6: 5,0-5,9 7: ≥6,0
	17 Média (comp.)	1: 5,0-5,9 2: 6,0-6,9 3: 7,0-7,9 4: 8,0-8,9 5: 9,0-9,9 6: >10,0
	18 Maior largura (µm)	1: 0-0,5 2: 0,6-1,0 3: 1,1-1,5
	19 Média (maior larg.)	1: <3,0 2: 3,0-3,9 3: >4,0
	20 Desvio (maior larg.)	1: alto 2: baixo
	21 Base (µm)	1: <0,1 2: 0,1-0,5 3: >0,5
	22 Média (base)	1: <1,9 2: 2,0-2,4 3: 2,5-2,9 4: >3,0
	23 Célula da base (µm)	1: <0,7 2: 0,7-1,0 3: 1,1-1,8 4: 1,9-2,9 5: >3,0
Clamidosporos	24 Média (cel. base)	1: <3,1 2: 3,1-3,5 3: 3,6-4,0 4: 4,1-4,5 5: >4,6
	25 Largura / Comprimento	1: <0,6 2: 0,6-1,0 3: 1,1-1,5 4: 1,6-2,0 5: >2,1
	26 Média (rel. larg./compr.)	1: <1,6 2: 1,6-2,0 3: 2,1-2,5 4: 2,6-3,0 5: >3,0
	27 Fialides intercalares	1: ausente/pouco frequente 2: presente
	28 Ocorrência	1: ausente 2: presente
	29 Disposição	1: terminal 2: intercalar
	30 Largura (µm)	1: <3,0 2: 3,0-6,0 3: 6,1-9,0 4: >9,1
Cultura	31 Média (largura)	1: <7,1 2: 7,1-8,0 3: 8,1-9,0 4: 9,1-10,0 5: 10,1-11,0 6: >11,0
	32 Odor de coco	1: ausente 2: presente
	33 Difusão de pigmentos	1: ausente 2: presente

Quadro 6 – Relação das seqüências e codificação das espécies utilizadas na análise taxonômica e filogenética de *Trichoderma* spp.

No.	Espécies	Codificação de trabalho	Instituto Biológico	GenBank	Coleções de Cultura
01	<i>T. aggressivum</i>	AG	-	AF443911	DAOM 222156
02	<i>T. asperellum</i>	AS	-	AY380912	CBS 433.97
03	<i>T. atroviride</i>	AT	-	AY380906	CBS 142.95
04	<i>T. aureoviride</i>	AU	-	AF194017	IMI 091968
05	<i>T. citrinoviride</i>	CT	-	AJ230663	BBA 70220
06	<i>T. crassum</i>	CR	-	AF414315	CCRC 33580
07	<i>T. erinaceum</i>	ER	-	AY266658	3DK2
08	<i>T. fasciculatum</i>	FS	-	AF414327	CCRC 33595
09	<i>T. fertile</i>	FE	-	AF400260	DAOM 167.161
10	<i>T. ghanense</i>	GH	IB 37-2	-	-
11	<i>T. hamatum</i>	HA	-	AJ507086	MA 2994
12	<i>T. harzianum</i>	HZ	IB 26-9	-	-
13	<i>T. koningii</i>	KG	IB 29-8	-	-
14	<i>T. longibrachiatum</i>	LB	IB 37-5	-	-
15	<i>T. minutisporum</i>	MT	-	AF414318	CCRC 33583
16	<i>T. oblongisporum</i>	OB	-	AF414319	CCRC 33584
17	<i>T. polysporum</i>	PL	-	AY240844	GJS 90-126
18	<i>T. pseudokoningii</i>	PK	-	Z31014	DAOM 167678, CBS 408.91
19	<i>T. pubescens</i>	PB	-	AF414320	CCRC 33585
20	<i>T. saturnisporum</i>	SA	IB 36-3	-	-
21	<i>T. spirale</i>	SP	-	AF486022	TUB-F-936
22	<i>T. strictipile</i>	ST	-	AF414322	CCRC 33587
23	<i>T. strigosum</i>	SG	IB 28-3	-	-
24	<i>T. stromaticum</i>	SR	-	AF097911	GJS 97-180
25	<i>T. tomentosum</i>	TO	-	AF414323	CCRC 33588
26	<i>T. virens</i>	VN	-	AF222865	DAOM 167651
27	<i>T. viride</i>	VR	-	AF456922	CBS 433.34
28	<i>T. reesei</i>	TR	-	Z48933	ATCC 26921, QM9414
29	<i>Hypocrea jecorina</i>	HJ	-	X93951	CBS 836.91
30	<i>Clonostachys rosea</i>	CLR	-	AF358233	CBS 443.65
31	<i>Cladobotryum mycophilum</i>	CM	-	Y17095	IMI 267134
32	<i>Verticillium lecani</i>	VL	-	AJ292382	IMI 304807

4.13 Análise Filogenética

Para o estudo filogenético foram selecionadas 27 seqüências da região ITS1-5.8S-ITS2, correspondentes aos táxons analisados no estudo taxonômico. Apenas as seqüências que apresentaram valores de *score* alto (ao redor de 1000) e *e-value* igual a zero foram selecionadas dentre os isolados seqüenciados.

Para as espécies restantes, que não foram detectadas nos isolamentos (conforme consulta através do BLASTN), coletou-se no *GenBank*. Para assegurar a homogeneidade de critérios de identificação e possibilitar a comparação de dados, foram coletadas apenas seqüências depositadas e identificadas pelos mesmos autores (SAMUELS, et al, 2004) ou por intermédio de sua chave, além de serem mantidas em coleções internacionais. As seqüências obtidas no Instituto Biológico foram submetidas

ao programa BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997) juntamente com as outras foram alinhadas inicialmente através do programa de alinhamento múltiplo CLUSTAL X, v.1.8 (THOMPSON et al., 1997) para avaliação inicial da qualidade e resolução das seqüências.

A análise filogenética de máxima parcimônia foi realizada utilizando o programa PAUP (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) v. 4b.8 (SWOFFORD, 2002). Gaps foram considerados como quinta base por conterem informação filogenética (cf. GIRIBET & WHEELER, 1999). As árvores foram obtidas por busca heurística sendo apresentadas aquelas de consenso estrito e/ou semi-estrito através de adição aleatória com 1000 replicações. O limite de confiança das ramificações internas foi inferido pela análise de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985, SWOFFORD et al., 1996), aplicando-se em busca heurística, e considerando 1000 replicações e adição aleatória com 100 replicações. As análises (molecular e morfológica) foram realizadas considerando todos os caracteres com mesmo peso e não ordenados.

Para a composição do grupo externo foram selecionadas espécies de famílias diferentes que apresentam afinidades entre si na fase teleomórfica, enquanto que na fase anamórfica se diferenciam consistentemente de *Trichoderma* spp. As espécies selecionadas foram: *Cladobotryum mycophilum* (teleomorfo *Hypomyces odoratus*, Hypocreaceae); *Verticillium lecani* (= *Lecanicillium lecanii* – teleomorfo *Torrubiella confragosa*, Clavicipitaceae, Hypocreales), e *Clonostachys rosea* (= *Gliocladium roseum* – teleomorfo *Bionectria ochroleuca*, Bionectriaceae, Hypocreales). A inclusão da espécie *C. rosea* deveu-se ao fato de apresentar fiálides típicas de *Gliocladium* sp. (peniciliformes) possibilitando comparação posterior com *T. virens* (= *Gliocladium virens*), este incluído neste gênero, artificialmente, devido à semelhança morfológica da fase teleomórfica (*Hypocrea* sp.).

O alinhamento foi realizado através do programa MALIGN v.2.7 (WHEELER & GLADSTEIN, 1994, 1995) via aplicativo EASYALIGN v.1.0 (MIRANDA, 2002). Para discussão sobre a escolha deste método de alinhamento ver Giribet et al. (2002). A pesagem utilizada foi 1:1:2 (transição e transversão com peso 1 e *gaps* com peso 2). Para a construção dos cladogramas e dendrogramas foi utilizado o programa TreeView (PAGE, 1996, 1998).

4.14 Análise da Biodiversidade

Para a análise da distribuição das espécies, os pontos de coleta foram plotados em mapa específico e, após conversão das coordenadas para *UTM*, foi identificada a vegetação típica da área de coleta. A Figura 1 apresenta o “Mapa de Cobertura Vegetal Natural e Reflorestamento” (Instituto Florestal, Projeto BIOTA/Base Cartográfica de São Paulo) indicando os 52 pontos de coleta.

O levantamento obtido foi utilizado para a análise da diversidade de espécies, distribuição e frequência. Em função do extenso número de amostras, foram selecionados 4 a 6 isolados de cada amostra para se ter uma visão global do comportamento do gênero na área estudada. O critério utilizado para a seleção destas espécies foi o de maior variação morfológica das culturas. Nesta seleção foram considerados os seguintes parâmetros: a) coloração, b) aspecto das colônias em meio MEA e BDA e, c) alteração na coloração do meio (reverso da colônia), assumindo-se que estas características podem traduzir uma amostra da diversidade dentro do gênero.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Mapeamento e Coletas

As coletas foram realizadas totalizando 52 amostras de solo (49 de solo nativo e matas pouco perturbadas e 3 de solo cultivado) de 50 municípios. Os locais de coleta constam de matas mais preservadas (nativas), como é o caso da mata atlântica, ou de manchas de florestas (secundárias) espalhadas por entre áreas cultivadas, sobretudo por cana de açúcar. A coleta, quando realizada nestes fragmentos foi feita a partir de pelo menos 50m adentro. A fisionomia típica e a relação pormenorizada dos locais e suas respectivas coordenadas são apresentadas na Tabela 1. A Tabela 9 apresenta o número de coletas por ecossistema amostrado.

A predominância de alguns ecossistemas é natural uma vez que nas coletas se obedeceu a um critério de distribuição geográfica, procurando cobrir o estado de maneira uniforme. Portanto, o predomínio de coletas realizadas em mata e capoeira foi determinado pelas características da cobertura vegetal do Estado. A classificação utilizada segue aquela empregada pelo Instituto Florestal (Projeto Sinbiota), responsável pelo fornecimento dos dados.

5.2 Condições de Isolamento

As amostras de solo, coletadas durante as viagens e mantidas refrigeradas (caixas de isopor e refrigerador comum) até o momento da manipulação, aparentemente, não prejudicaram a eficiência de isolamento. Após o processamento das 52 amostras (compostas) obteve-se um total de 539 isolados que foram devidamente identificados por 2 números (dezenas): o número da coleta seguido do número do isolado. Estes isolados compuseram a coleção de trabalho e estão relacionados na Tabela 10.

Após o procedimento de isolamento (ver item seguinte) as placas foram mantidas em condições de laboratório, em ambiente de pouca circulação, U.R.A. mantida na faixa de 30-40%, temperatura média de 25°C e ausência de iluminação direta.

Tabela 9 – Fisionomia vegetal típica nos 52 pontos amostrados, identificadas em base cartográfica digital obtida via satélite (I. Florestal/Projeto SINBIOTA)

Ecossistema	Pontos de Coleta	Amostras / Ponto de Coleta
Mata	3, 4, 7, 9, 16, 17, 18, 19, 21, 25, 26, 27, 32, 33, 36, 38, 39, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 50	24
Capoeira	5, 6, 8, 10, 11, 12, 15, 20, 22, 23, 30, 31, 34, 35, 37, 40, 45, 49, 51	19
Cerrado	1, 2, 52	3
Cerradão	14, 41	2
Restinga	24, 28, 29	3
Várzea	13	1
Total		52

Tabela 10 – Coleção de Trabalho – Relação de isolados mantidos em câmara fria e pelo método de Castellani no Instituto Biológico, obtidos das 52 coletas realizadas no Estado de São Paulo

Nº. Coleta IB	ISOLADOS	Total/Coleta
01	01 → 15	15
02	01 → 15	15
03	01 → 04	04
04	01 → 11	11
05	01 → 05	05
06	01 → 10	10
07	01 → 14	14
08	01 → 04 / 06 → 14	13
09	01 → 04 / 07 → 10	08
10	01 → 05 / 09	06
11	02 → 04 / 06 09 → 12 14 15 19 20	12
12	01	01
13	01 05 08 10 12	05
14	01 02 04 05 10	05
15	06 15	02
16	01 → 09	09
17	01 03 05 07	04
18	01 → 05 07 → 22	21
19	01 → 09 12 → 20	18
20	01 02 05 06 08	05
21	01 03 08 10 11 13	06
22	01 03 06 → 12	09
23	01 → 05 08	06
24	03 → 08 15 16	08
25	01 → 11 14 16 17	14
26	01 02 04 → 13 16	13
27	04 → 11 13 → 16	12
28	01 03 05 → 07 09 → 11 14 15	10
29	02 → 06 08 10 → 16	13
30	01 05 → 08 11 12	07
31	03 05 → 10	07
32	01 → 12	12
33	01 03 05 → 12 14 15	12
34	01 → 10	10
35	04 07 13 → 15	05
36	01 → 10	10
37	01 02 04 05	04
38	01 03 → 05 07 → 21	19
39	01 → 03 05 → 08 10 11 13 → 19	16
40	01 → 09 11 12 14 16	13
41	01 → 05 13 15	07
42	01 → 16	16
43	01 05 07 → 14 16 17	12
44	01 18	02
45	01 → 05 08 → 10 12 → 15 17 18	14
46	01 06 → 08 10 11 17 18 21 → 24	12
47	01 02 05 → 07 09 → 14 16 → 18 20	15
48	01 → 07 09 → 11 13 → 24	22
49	01 02 06 → 17	14
50	01 → 04 06 07 09 → 13 15 → 20	17
51	02 06 07 09 → 12 15 17 18	10
52	03 → 08 10 → 12	09
Total Coleção		539

Quadro 7 – Avaliação de viabilidade de linhagens preservadas pelo método de Castellani (1967) mantidos à temperatura ambiente (1ª. avaliação, realizada em 16/09/2003)

Isolado	Espécie (blast/ITS)	Data Introdução	Data Avaliação	Nº. de Meses	Resultado
01/02	<i>T. asperellum</i>	06/2002	16/09/2003	15	+
01/05	<i>T. sp.</i>				+
05/02	<i>T. aureoviride</i>				+
05/03	<i>T. harzianum</i>				+
05/05	<i>T. koningii</i>				+
06/01	<i>T. spirale</i>	14/06/2002		15	+
06/02	<i>T. spirale</i>				+
06/03	<i>T. sp.</i>				+
06/04	<i>T. sp.</i>				+
06/05	<i>T. spirale</i>				+
07/01	<i>T. atroviride</i>				+
07/02	<i>T. harzianum</i>				+
07/09	<i>T. sp.</i>				+
07/10	<i>T. atroviride</i>				+
07/11	<i>T. sp.</i>				+
07/12	<i>T. harzianum</i>				+
07/13	<i>T. atroviride</i>				+
07/14	<i>T. sp.</i>				+
08/01	<i>T. hamatum</i>				03/05/2002
08/02	<i>T. hamatum</i>	+			
08/03	<i>T. hamatum</i>	+			
08/04	<i>T. harzianum</i>	+			
08/06	<i>T. sp.</i>	23/07/2002		14	+
13/08	<i>T. spirale</i>				+
14/01	<i>T. aureoviride</i>				+
14/02	<i>T. atroviride</i>				+
14/05	<i>T. spirale</i>				+
15/15	<i>T. spirale</i>	30/07/2002		14	-
19/02	<i>T. harzianum</i>				-
19/05	<i>T. aureoviride</i>	15/08/2002		13	+
20/01	<i>T. spirale</i>				-
20/02	<i>T. spirale</i>	27/08/2002		13	+
22/01	<i>T. tomentosum</i>				-
23/05	<i>T. koningii</i>				-
24/16	<i>T. spirale</i>				-
25/02	<i>T. spirale</i>	22/08/2002		13	+
25/07	<i>T. spirale</i>				-
27/15	<i>T. harzianum</i>				-
29/16	<i>T. koningii</i>				-
30/12	<i>T. spirale</i>	12/07/2002		14	+
31/06	<i>T. hamatum</i>				-
31/07	<i>T. hamatum</i>				+
32/01	<i>T. harzianum</i>				+
35/15	<i>T. sp.</i>	30/07/2002		14	+
52/10	<i>T. koningii</i>	05/09/2002		12	-
				TOTAL	45/8

Quadro 8 – Avaliação de viabilidade de linhagens preservadas pelo método de Castellani (1967) mantidos à temperatura ambiente (2^a. avaliação, realizada em 17/10/2003)

Isolado	Espécie (blast/ITS)	Data Introd.	Data Avaliação	Nº. de Meses	Resultado			
IB 01	<i>T. aureoviride</i>	12/04/2002	17/10/2003	18	+			
IB 02	<i>T. sp.</i>				-			
IB 03	<i>T. citrinoviride</i>				-			
IB 05	<i>T. harzianum</i>				+			
IB 07	<i>T. sp.</i>				-			
IB 08	<i>T. sp.</i>				+			
IB 09	<i>T. aureoviride</i>				+			
IB 10	<i>T. harzianum</i>				+			
IB 12	<i>T. harzianum</i>				+			
IB 13	<i>T. harzianum</i>				-			
IB 14	<i>T. stromaticum</i>				+			
IB 15	<i>T. longibrachiatum</i>				-			
IB 16	<i>T. atroviride</i>				+			
IB 17	<i>T. virens</i>				+			
IB 18	<i>T. harzianum</i>				+			
IB 19	<i>T. sp.</i>				+			
IB 20	<i>T. harzianum</i>				+			
IB 21	<i>T. harzianum</i>				+			
IB 22	<i>T. harzianum</i>				+			
IB 23	<i>T. stromaticum</i>				+			
IB 24	<i>T. asperellum</i>				+			
IB 25	<i>T. sp.</i>				+			
IB 26	<i>T. longibrachiatum</i>				+			
IB 27	<i>T. longibrachiatum</i>				+			
IB 28	<i>T. harzianum</i>				+			
					TOTAL	25/5		

A identificação inicial foi realizada visualmente através dos aspectos morfológicos das colônias e outras características como pigmentação do meio de cultura, odor semelhante a côco. Foram feitas lâminas dos isolados utilizados nos ensaios para certificar se tratarem de *Trichoderma*, uma vez que gêneros afins, como *Gliocladium* e *Clonostachys*, podem apresentar características semelhantes a algumas espécies de *Trichoderma*. O gênero *Hypomyces* (forma anamórfica *Cladobotryum* sp.), citado por Samuels et al. (2004), também pode apresentar características de colônia muito semelhantes.

Quadro 9 – Avaliação de viabilidade de linhagens preservadas pelo método de Castellani (1967) mantidos à temperatura ambiente (3^a. avaliação, realizada em 02/02/2004)

Isolado	Espécie (blast/ITS)	Data Introdução	Data Avaliação	Nº. de Meses	Resultado	
08/01	<i>T. hamatum</i>	14/06/2002	02/02/2004	20	+	
13/05	<i>T. spirale</i>	03/05/2002		21	+	
14/01	<i>T. aureoviride</i>				+	
14/02	<i>T. atroviride</i>				+	
15/06	<i>T. aureoviride</i>				+	
18/03	<i>T. atroviride</i>				23/07/2002	19
18/04	<i>T. sp.</i>	-				
18/11	<i>T. hamatum</i>	+				
19/05	<i>T. aureoviride</i>	+				
20/05	<i>T. spirale</i>	30/07/2002		19	-	
22/01	<i>T. tomentosum</i>	15/08/2002		18	+	
23/05	<i>T. koningii</i>				+	
24/05	<i>T. sp.</i>	27/08/2002		18	+	
25/04	<i>T. sp.</i>	22/08/2002		18	+	
27/15	<i>T. harzianum</i>				+	
29/16	<i>T. koningii</i>	22/08/2002		18	-	
31/06	<i>T. hamatum</i>	12/07/2002		19	-	
32/06	<i>T. koningii</i>				+	
36/01	<i>T. harzianum</i>	05/07/2002		19	+	
36/03	<i>T. saturnisporum</i>				+	
38/04	<i>T. saturnisporum</i>				+	
39/07	<i>T. spirale</i>	08/2002		18	-	
52/10	<i>T. koningii</i>	05/09/2002		17	-	
52/12	<i>T. reesei</i>				-	
				TOTAL	24/7	

Quadro 10 – Avaliação da viabilidade do isolados preservados em câmara fria

Isolado	Espécie (blast/ITS)	Data Introdução	Data Avaliação	Nº. de Meses	Resultado
01/08	<i>T. sp.</i>	06/2002	09/09/2003	15	+
20/01	<i>T. spirale</i>	30/07/2002		14	+
20/02	<i>T. spirale</i>			+	
23/05	<i>T. koningii</i>	15/08/2002		13	+
24/16	<i>T. spirale</i>	27/08/2002	02/02/2004	18	+
25/02	<i>T. spirale</i>	22/08/2002	09/09/2003	13	+
27/15	<i>T. harzianum</i>		02/02/2004	18	+
29/16	<i>T. koningii</i>		09/09/2003	13	+
31/06	<i>T. hamatum</i>		12/07/2002		14
37/01	<i>T. longibrachiatum</i>	05/07/2002	02/02/2004	19	+
37/02	<i>T. ghanense</i>				+
37/04	<i>T. longibrachiatum</i>				+
37/05	<i>T. longibrachiatum</i>				+
51/09	<i>T. harzianum</i>	05/09/2002		17	+
52/10	<i>T. koningii</i>		09/09/2003	12	+
				TOTAL	15/0

As culturas foram verificadas diariamente após terem sido submetidas ao meio de isolamento. Devido à falta de sincronização da velocidade de desenvolvimento dos

isolados, essa verificação e isolamento ocorreram até 10 dias de incubação, descartando-se o material em seguida. Na subcultura seguinte, repicou-se nos meios BD e/ou ME utilizando-se em placas de Petri descartáveis (9 x 14mm) a intervalos de 14 dias durante as etapas do trabalho. Nos casos onde houve suspeita de contaminação foi feito um re-isolamento a partir da placa contaminada.

Dos meios de cultura seletivos analisados, o meio MC foi o mais satisfatório para o isolamento, resgatando um número médio de 10,4 isolados por amostra. Este meio consiste de uma variante do clássico meio de Martin (1950) com as alterações indicadas na Tabela 2. Este meio propiciou o maior número de UFCs e ausência de bactérias nas condições testadas, entretanto, vale observar que os outros meios descritos não foram utilizados na sua formulação original, conforme o quadro indica.

Os meios TSMM e DAVC foram descartados logo no início dos ensaios por não conseguirem conter a contaminação e o desenvolvimento de fungos indesejáveis. Provavelmente isso se deveu à ausência de alguns componentes do meio que estão fora de linha de fabricação e, portanto, difíceis de serem obtidas.

O meio TSMC foi descartado em seguida por apresentar um rendimento inferior aos outros dois. Na Tabela 11 são mostrados os resultados de alguns isolamentos nos meios testados em duas diluições – 10^3 e 10^4 . Quando a suspensão menos diluída gerava um alto número de fungos viáveis, a placa mais diluída era utilizada para o isolamento. Os resultados refletem a média simples de 3 repetições.

A adição de Agrimicina 100 (Pfizer, Brasil), que consiste numa associação dos antibióticos terramicina (1,5%) e sulfato de estreptomicina (15%), foi fundamental para conter a contaminação e facilitar o isolamento. Somente a adição de cloranfenicol, nas dosagens indicadas, bem como a utilização isolada de sulfato de estreptomicina, conforme descrito no meio original, não foi suficiente para abranger o espectro de contaminantes normalmente recorrentes em amostras de solo.

Diversos meios têm sido descritos na literatura visando o isolamento de *Trichoderma* (DAVET, 1979; DAVET et al., 1980; ELAD et al., 1981; PAPAVIDAS & LUMSDEN, 1982; ELAD & CHET, 1983; SMITH et al., 1990; ASKEW & LAING, 1993), entretanto, a comparação dos dados relatados é dificultada pois traduzem o comportamento de amostras de solo diferentes. Além das condições físico-químicas e

biológicas (microbiota) serem distintas, a diversidade de substâncias utilizadas para eliminar ou inibir o crescimento de fungos indesejados e de crescimento rápido, como é o caso de *Mucorales*, também dificulta essa análise. Este último é um fator que pode ocasionar uma pressão de seleção indesejada em certos casos, sobretudo quando o grupo ou comunidade estudados apresentam diferentes graus de tolerância.

Tabela 11 – Recuperação de isolados fúngicos em diferentes meios de cultura semi-seletivos obtidos em duas diluições das amostras de solo (* = >50 UFC, média de 3 repetições)

Amostra	Meios de Cultura					
	TSMC		MMT		MC	
	10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ⁴
18	8,0	1,0	12,0	7,0	-	-
19	6,0	5,0	11,0	8,0	-	-
20	3,0	2,0	7,0	4,0	-	-
21	7,0	10,0	4,0	4,0	-	-
22	11,0	9,0	14,0	9,0	-	-
23	*	8,0	*	9,0	-	-
24	-	-	*	13,7	24,3	16,3
25	-	-	*	16,5	40,0	19,3
26	-	-	26,0	6,3	30,0	12,8
27	-	-	19,4	8,0	17,3	4,8
28	-	-	*	29,5	40,0	15,3
29	-	-	*	37,5	11,5	6,8
30	-	-	*	8,0	43,7	15,0
31	-	-	*	31,3	*	24,7
32	-	-	45,7	13,7	29,7	5,7
33	-	-	34,0	7,0	21,7	6,3
34	-	-	44,3	13,3	39,7	13,3
35	-	-	*	35,3	*	28,0
36	-	-	3,3	0,3	4,3	0
37	-	-	3,7	0,3	4,3	0,7
38	-	-	*	6,3	37,3	8,3
39	-	-	*	10,7	*	13,0
40	-	-	46,7	5,7	32,3	3,3
41	-	-	*	31,7	*	34,3
42	-	-	*	8,0	*	12,7
43	-	-	28,0	4,7	21,7	3,3
44	-	-	*	26,3	*	22,0
48	-	-	*	11,0	46,7	13,2
49	-	-	*	27,3	*	27,7
50	-	-	*	37,2	*	29,7
51	-	-	*	15,5	*	16,2
52	-	-	*	*	*	*

A opção de partir de um meio mais simples (MC) correspondeu às expectativas mostrando um rendimento superior aos outros meios. Além de apresentar reduzido

custo para isolamentos em maior escala, devido à redução e/ou eliminação de componentes dos meios comparados, sua composição é facilmente disponível.

A adição da substância rosa de bengala (tetraclorotetradiodofluoresceína, marca BDH, Inglaterra) foi importante não só por facilitar o isolamento retendo o desenvolvimento dos fungos como também por oferecer maior contraste na identificação do gênero de interesse. Foi observado, como relatado na literatura, que na contínua presença de luz esta substância pode se tornar inibitória ou apresentar efeito tóxico para os fungos de solo. Nas amostras onde nem a diluição 10^4 foi suficiente para o procedimento, como no caso da amostra IB 52, o isolamento foi repetido utilizando-se a diluição subsequente.

Pelos resultados observados na Tabela 11 verifica-se que a diversidade de populações existentes em cada amostra de solo é bastante nítida. Em relação à ocorrência e frequência do gênero *Trichoderma* a tabela mostra que estes fatores independem do número de UFCs originados, uma vez que placas com alta densidade nem sempre refletiram num maior número de colônias de *Trichoderma* recuperadas. De maneira global o meio não gerou, na maioria das vezes, nem placas muito densas, o que prejudica muito a identificação visual do fungo de interesse, nem placas com um número muito reduzido de colônias.

5.3 Coleção de Referência

A coleção de referência foi devidamente identificada com o código “IB” (Quadro 2) e preservada pelo método de Castellani (1967) sendo duas replicatas mantidas em placas (meios BD e ME) através de repicagens sucessivas e manutenção a baixa temperatura (Câmara Fria) durante todo o trabalho.

Embora diversas linhagens já possuam codificação oficial de origem (CCT-WDCM711; EMBRAPA-WDCM712; URM-WDCM604) atribuímos codificação própria (“IB”) para efeito de facilitar as referências no trabalho.

Idealmente, culturas referenciadas em artigos internacionais seriam as mais indicadas para utilização em estudos deste tipo. Entretanto, o alto custo de aquisição não permitiu a obtenção deste material. Para se ter uma idéia do custo, a linhagem

QM9414 (derivada do tipo selvagem QM6a), se adquirida da ATCC (E.U.A.), teria custado, na ocasião, US\$154,00, acrescida das despesas de remessa.

Sempre que necessário, as culturas foram “reavivadas” nos meios citados, repicando-se pelo menos 3 vezes (pontos) para garantir a recuperação das culturas e isenção de contaminantes, no caso de culturas mantidas pelo método de Castellani (FIGUEIREDO, 1967).

5.3.1 Caracterização das Linhagens de Referência

O estudo morfométrico inicial dos conídios das espécies de referência (Quadro 2) revelou incongruências entre os dados obtidos e os esperados conforme as descrições da chave utilizada (SAMUELS et al., 2004, 2004 e GAMS & BISSET, 1998). A Tabela 12 evidencia essa divergência entre as medições de 6 linhagens. A variação observada em relação a *T. harzianum* pode ser explicada por tratar-se de um complexo de espécies filogeneticamente distintas (análise molecular) mas fenotipicamente serem linhagens crípticas (SAMUELS, 2004). As linhagens IB-16 e IB-26 enquadram-se nas respectivas descrições. Observadas ao microscópio e pelo aspecto das colônias, as linhagens IB-9, IB-16, IB-18, pareceram tratar-se da mesma espécie.

Tabela 12 – Medições dos conidiosporos de 6 isolados da Coleção de Referência e medidas esperadas (cf. SAMUELS et al., 2004)

Linhagem	Espécie	Medidas obtidas (µm)	Medidas esperadas (µm)
IB 09	<i>T. harzianum</i>	2,51(-2,97) X 2,06(-2,29)	(2,0-)2,7-3,5(-5,0) X (1,8-)2,5-3,0(-4,0)
IB 16	<i>T. harzianum</i>	3,01(-3,31) X 2,49(-2,75)	
IB 18	<i>T. inhamatum</i> (= <i>T. harzianum</i>)	2,45(-2,74) X 2,13(-2,34)	
IB 23	<i>T. virens</i>	3,33(-3,64) X 2,50(-2,84)	(3,6-)4,5-4,7(-5,8) X (3,0-)3,9-4,0(-4,8)
IB 25	<i>T. hamatum</i>	3,46(-3,85) X 2,63(-2,95)	(3,9-)4,2-5,0(-5,8) X (2,4-)2,7-3,0(-3,4)
IB 26	<i>T. longibrachiatum</i>	4,28(-7,10) X 1,91(-2,22)	(2,5-)3,5-4,7(-7,8) X (2,0-)2,5-3,0(-4,0)

A utilização da técnica clássica de culturas em lâmina (RIDDELL,1950), mostrou-se inadequada para grande parte dos isolados analisados (coleção de referência e de trabalho). A dificuldade observada foi relativa ao rápido processo de conidiogênese. Como estes processo ocorre em *Trichoderma* de modo rápido e irregular, isso impede uma visualização clara da distribuição das fíalides ao longo do

conidióforo. Esta característica, juntamente com o sistema de ramificação dos mesmos (espacial), constituem aspectos fundamentais na descrição e na identificação das espécies. Além disso, os isolados apresentam velocidades de desenvolvimento diferentes o que impede uma avaliação sistemática e operacional (períodos regulares).

No sentido de diminuir essa velocidade e melhorar a visualização da formação das estruturas, foi desenvolvida uma variação da técnica citada, na qual o desenvolvimento do fungo é restringido por intermédio de um gradiente de aeração, provocado pela colocação de 2 blocos de agar pareados, sobre os quais uma lamínula é depositada. A passagem formada permitiu uma observação mais nítida, com também a visualização espacial dos conidióforos. A Figura 2 mostra uma lâmina preparada através desta técnica, em câmara úmida montada com papel de filtro. A técnica pareceu oferecer também condições para estudos de ontogenia (conidiogênese, clamidosporogênese etc.), onde se objetiva registros periódicos durante o processo de diferenciação. Além disso, consiste num procedimento mais simples e menos laborioso que as microcâmaras descritas por Cole (COLE & KENDRICK, 1968; COLE et al., 1969). A descrição mais detalhada da técnica consta do Anexo 2.

As observações das lâminas foram feitas satisfatoriamente em microscópio com contraste de fase, entretanto, para estudos morfométricos dos fialoconidiosporos, o microscópio com analisador de imagens (Zeiss, Alemanha; BioRad, Inglaterra) foi mais eficiente. As Figuras 3 e 4 ilustram o detalhe de um conidióforo típico da seção *Longibrachiatum* obtido pelo método descrito e um campo utilizado para medição dos fialoconidiosporos, respectivamente.

A avaliação do desenvolvimento dos 30 isolados em diferentes condições de temperatura e meio de cultura, como previsto, mostrou diferença entre os isolados testados. Os diferentes locais de semeadura também apresentaram alguma variação.

Os dados obtidos, apresentados de forma consolidada na Tabela 14, mostram que o detalhamento destes fatores, nas descrições e artigos são importantes para a caracterização das espécies. Estes caracteres, se apresentados de forma sistematizada nestas descrições, poderiam facilitar mais na triagem de espécies diferentes.

Espécies como *T. stromaticum* (IB-30 e 14), que não desenvolveram nos meios testados a 35°C poderiam ser separadas de outras que se comportaram relativamente bem nos mesmos. Nas temperaturas 15, 20 e 25°C não se observou grande variação entre os dois meios entretanto, a 30 e 35°C diversas espécies apresentaram respostas diferentes como, por exemplo, o isolado IB-20 que a 30°C no meio de batata dextrose, após 96h desenvolveu 223% mais em relação ao meio de malte. Outros isolados, como IB-6, 7, 17 e 21, também apresentaram grande variação que podem ser constatadas até mesmo com 48h de incubação. Na maior parte deles, entretanto, entre os dois não ocorrem diferenças marcantes de comportamento em termos de velocidade.

Os dados da Tabela 13 indicam que uma avaliação feita a 25 e 30°C e, em alguns casos a 15 e/ou 35°C, após 72h ser suficiente para abranger a variação de comportamento para uma grande parte das espécies conhecidas.



Figura 2 – Cultura em lâmina realizada com a variação do método de Riddell (1950), onde pode-se observar a diferença de desenvolvimento do fungo no perímetro dos blocos devido ao gradiente de aeração formado na região onde a lamínula foi sobreposta

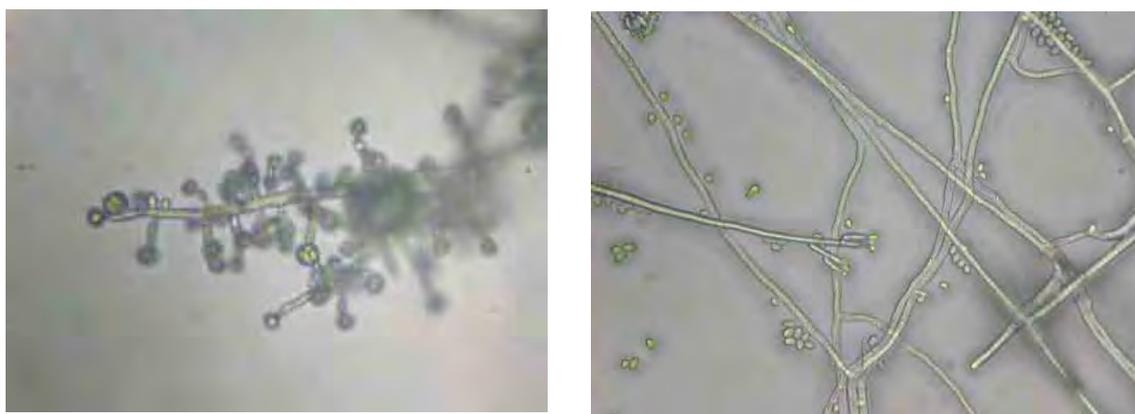


Figura 3 – Fotomicrografias digitais de conidióforos: esquerda – típico da Seção *Longibrachiatum*, com fiálides solitárias, não verticiladas e não pareadas, direita – *Trichoderma virens* (ex *Gliocladium virens*) com estrutura fialídica peniciliforme (fotografados auxílio de microscópio ótico convencional)

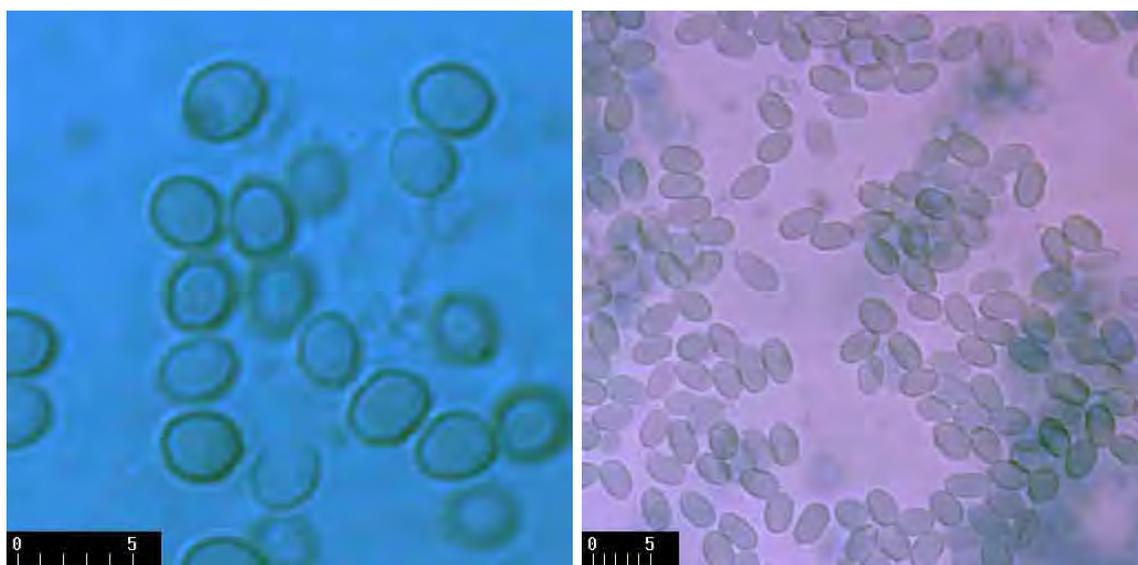


Figura 4 – Detalhe dos fialoconidiosporos da linhagem IB 23, subglobosos (esquerda) e, IB-26, cilíndricos (direita), em campo adequado para medição digital (microscópio confocal, escala µm)

Na literatura consultada esse critério não está padronizado, o que dificulta a comparação com finalidade de análise e identificação. Verificando-se essa padronização entre os artigos publicados foi constatado que normalmente os autores omitem o local preciso da sementeira (seja por intermédio de disco de agar ou ponteamto), descrevendo apenas o diâmetro da colônia. Enquanto alguns autores procedem a deposição do material fúngico no centro da placa de Petri, outros o fazem próximo a lateral da mesma. Um exemplo desta situação pode ser observado no artigo de Chaverri

et al. (2003a), no qual o diâmetro das colônias, submetidas à diferentes temperaturas, são obtidos a partir do raio (2x), em semeadura lateral. Outros especialistas citam apenas o diâmetro, omitindo o modo como é calculado (local, repetições etc.)(cf. BISSET, 1984; 1991abc).

Em ensaio subsequente foi analisado se essa variação poderia comprometer o resultado deste tipo de ensaio no meio batata dextrose. O resultado dos isolados avaliados são apresentados na Tabela 14, repetindo-se os dados da primeira avaliação naquelas condições para facilidade de comparação.

As medições resultam da média de 3 medições do maior diâmetro ou raio da colônia, sendo atribuído o sinal (+) nas placas preenchidas integralmente. Nestes casos foi considerada a medida de 90mm (diâmetro da placa) para o cálculo do raio (45mm). As Figuras 5 e 6 mostram a diferença de comportamento nas duas situações avaliadas.

Os resultados mostraram que as linhagens podem ser agrupadas em 3 categorias distintas e bem nítidas: a) as que não apresentam variações consideráveis de velocidade nas 2 temperaturas testadas, como no caso de IB-21; b) aquelas que apresentam variação apenas na temperatura de 30°C (IB-06) e, c) as que mostram variação em ambas, como nos casos de IB-4, 11, 13, 26 (exemplos). A razão para este fato pode ser explicada, conforme suspeita inicial, de que a escassez de nutrientes e a proximidade das hifas da região próxima à tampa (maior aeração) induz uma conidiação mais rápida e intensa neste local, promovendo um dreno metabólico que finalmente resultará numa redução dos prolongamentos das hifas no lado oposto da superfície do meio de cultura. Essa diferença, que em alguns casos chegou a 55% (IB-4, 5, 10, 11, 13, 15, 26, 27) não pode ser generalizada, uma vez que nem todos os isolados foram sensíveis a ela como no caso de IB-25. Entretanto, a ordem de variação observada indica claramente a necessidade de explicitar esse detalhe em ensaios dessa natureza, o que não foi observado nos trabalhos consultados.

Tabela 13 – Crescimento da colônia das linhagens da Coleção de Referência submetidos a diferentes temperaturas em meios batata-dextrose (BD) e extrato de malte (ME) com semeadura realizada no centro da placa (+ = preenchimento total da placa)

Isolado	Meio	T°C	Leitura			
			24h	48h	72h	96h
IB 01	ME	15°C	0	3,0	14,0	29,0
	BD	15°C	0	2,7	14,3	31,0
	ME	20°C	3,7	25,7	52,3	+
	BD	20°C	2,0	26,0	57,7	+
	ME	25°C	14,7	52,0	+	+
	BD	25°C	16,7	54,3	+	+
	ME	30°C	24,3	64,7	+	+
	BD	30°C	24,7	65,0	+	+
	ME	35°C	5,7	18,0	30,0	45,0
	BD	35°C	6,0	24,0	39,7	50,7
IB 03	ME	30°C	8,3	56,0	+	+
	BD	30°C	17,7	52,3	+	+
	ME	35°C	23,3	65,3	+	+
	BD	35°C	22,0	64,0	+	+
IB 04	ME	15°C	0	3,7	17,0	34,0
	BD	15°C	0	8,0	24,3	45,3
	ME	20°C	8,3	39,0	77,3	+
	BD	20°C	7,7	40,3	80,0	+
	ME	25°C	25,7	81,3	+	+
	BD	25°C	28,3	82,0	+	+
	ME	30°C	47,7	+	+	+
	BD	30°C	52,7	+	+	+
	ME	35°C	59,3	+	+	+
	BD	35°C	62,3	+	+	+
IB 05	ME	30°C	19,3	71,0	+	+
	BD	30°C	19,0	71,7	+	+
	ME	35°C	5,0	19,3	30,0	44,0
	BD	35°C	8,0	21,0	29,0	37,3
IB 06	ME	15°C	0	2,0	15,7	28,6
	BD	15°C	0	9,0	19,3	32,3
	ME	20°C	5,0	28,7	58,7	+
	BD	20°C	7,7	31,3	59,3	+
	ME	25°C	20,0	54,0	+	+
	BD	25°C	21,7	55,3	+	+
	ME	30°C	26,7	61,0	+	+
	BD	30°C	30,7	67,0	+	+
	ME	35°C	2,0	4,0	4,3	5,3
	BD	35°C	6,0	13,0	18,0	19,0
IB 07	ME	30°C	21,3	30,0	+	+
	BD	30°C	24,0	58,7	+	+
	ME	35°C	2,0	2,0	4,0	4,0
	BD	35°C	3,0	11,0	21,0	25,0
IB 08	ME	15°C	0	3,0	14,3	31,3
	BD	15°C	0	3,7	17,7	37,0
	ME	20°C	7,0	26,7	56,3	+
	BD	20°C	3,3	32,0	67,0	+
	ME	25°C	17,0	46,3	82,0	+
	BD	25°C	20,7	59,7	+	+
	ME	30°C	21,7	57,7	+	+
	BD	30°C	28,3	63,3	+	+
	ME	35°C	0	0	0	0
	BD	35°C	0	0	0	1,3
IB 09	ME	30°C	22,7	66,7	+	+
	BD	30°C	21,7	64,7	+	+
	ME	35°C	4,3	18,7	33,7	46,3
	BD	35°C	5,3	19,3	33,0	42,3

Isolado	Meio	T°C	Leitura			
			24h	48h	72h	96h
IB 10	ME	15°C	0	2,0	12,3	28,0
	BD	15°C	0	3,0	13,3	30,0
	ME	20°C	4,3	27,0	60,0	+
	BD	20°C	3,0	26,7	59,7	+
	ME	25°C	18,3	59,7	+	+
	BD	25°C	18,0	60,7	+	+
	ME	30°C	25,7	76,0	+	+
	BD	30°C	29,0	80,3	+	+
	ME	35°C	2,0	14,3	29,3	45,0
	BD	35°C	8,0	25,3	38,0	52,7
IB 11	ME	15°C	0	10,3	28,0	48,0
	BD	15°C	0	4,5	22,0	45,5
	ME	20°C	7,0	36,7	74,7	+
	BD	20°C	4,8	34,2	68,0	+
	ME	25°C	23,3	71,0	+	+
	BD	25°C	24,2	74,2	+	+
	ME	30°C	41,0	+	+	+
	BD	30°C	42,3	+	+	+
	ME	35°C	47,0	+	+	+
	BD	35°C	39,3	+	+	+
IB 12	ME	30°C	18,0	57,3	+	+
	BD	30°C	16,3	51,7	+	+
	ME	35°C	3,3	12,3	24,0	33,0
	BD	35°C	4,7	16,0	26,0	31,0
IB 13	ME	15°C	0	2,0	10,0	24,0
	BD	15°C	0	2,0	10,3	26,0
	ME	20°C	3,0	25,3	57,0	83,0
	BD	20°C	2,0	25,7	59,3	+
	ME	25°C	16,7	56,7	+	+
	BD	25°C	17,3	59,0	+	+
	ME	30°C	26,0	77,7	+	+
	BD	30°C	25,7	73,7	+	+
	ME	35°C	3,0	14,0	31,0	49,0
	BD	35°C	5,0	19,7	29,0	36,7
IB 14	ME	15°C	0	1,3	7,0	20,0
	BD	15°C	0	3,7	11,3	24,7
	ME	20°C	0	13,0	36,3	65,0
	BD	20°C	2,0	18,0	42,0	74,3
	ME	25°C	5,7	31,7	70,0	+
	BD	25°C	9,0	37,0	77,3	+
	ME	30°C	3,0	13,0	20,0	29,7
	BD	30°C	6,0	19,0	33,0	35,0
	ME	35°C	0	0	0	0
	BD	35°C	0	0	0	0
IB 15	ME	30°C	38,0	+	+	+
	BD	30°C	43,7	+	+	+
	ME	35°C	45,0	+	+	+
	BD	35°C	42,7	+	+	+
IB 16	ME	30°C	10,0	34,0	62,3	+
	BD	30°C	14,0	42,7	73,0	+
	ME	35°C	0	0	0	0
	BD	35°C	2,3	2,0	2,0	2,0

Tabela 13 – Crescimento da colônia das linhagens da Coleção de Referência submetidos a diferentes temperaturas em meios batata-dextrose (BD) e extrato de malte (ME) com semeadura realizada no centro da placa (+ = preenchimento total da placa)
(continua)

Isolado	Meio	T°C	Leitura			
			24h	48h	72h	96h
IB 17	ME	15°C	0	2,0	9,0	22,0
	BD		0	2,7	8,0	18,0
	ME	20°C	4,0	19,7	38,3	59,7
	BD		3,3	18,3	37,3	63,3
	ME	25°C	13,3	35,3	63,0	+
	BD		13,7	35,0	65,7	+
	ME	30°C	19,0	48,0	78,3	+
	BD		19,3	45,3	68,0	+
	ME	35°C	2,0	4,0	6,0	8,0
	BD		4,7	15,0	21,7	23,7
IB 18	ME	30°C	20,0	61,3	+	+
	BD		20,0	50,3	80,0	+
	ME	35°C	0	0	0	2,0
	BD		0	2,0	1,7	2,3
IB 19	ME	30°C	2,0	10,0	14,0	15,0
	BD		3,0	25,7	53,0	78,0
	ME	35°C	0	0	0	0
	BD		0	0	0	0
IB 20	ME	30°C	2,0	16,3	20,3	25,7
	BD		6,0	29,3	58,0	83,0
	ME	35°C	0	0	0	0
	BD		3,0	3,0	2,0	2,3
IB 21	ME	15°C	0	2,3	14,0	27,7
	BD		0	3,0	16,3	30,0
	ME	20°C	4,7	23,3	44,7	70,0
	BD		3,0	26,3	49,7	74,0
	ME	25°C	15,0	40,7	75,0	+
	BD		16,7	45,7	74,3	+
	ME	30°C	21,7	53,3	82,7	+
	BD		24,0	53,3	84,0	+
	ME	35°C	3,0	2,7	13,0	20,0
	BD		5,0	20,0	29,3	34,3
IB 22	ME	30°C	20,3	60,0	+	+
	BD		16,3	49,0	+	+
	ME	35°C	5,7	6,0	9,0	10,3
	BD		9,0	12,0	18,0	19,3
IB 23	ME	15°C	0	2,0	11,3	22,3
	BD		0	4,0	14,0	25,0
	ME	20°C	4,7	24,3	49,7	79,0
	BD		5,7	26,3	49,3	77,0
	ME	25°C	17,0	50,0	+	+
	BD		17,3	48,7	84,0	+
	ME	30°C	23,7	59,0	+	+
	BD		26,0	58,0	+	+
	ME	35°C	4,0	5,0	5,7	5,0
	BD		3,0	6,0	6,0	5,0
IB 24	ME	30°C	20,3	52,7	82,7	+
	BD		21,3	48,7	80,0	+
	ME	35°C	2,0	2,0	2,0	2,0
	BD		3,0	5,0	4,3	5,0

Isolado	Meio	T°C	Leitura			
			24h	48h	72h	96h
IB 25	ME	15°C	0	5,0	13,7	24,3
	BD		0	5,3	15,0	27,0
	ME	20°C	10,0	27,3	50,7	78,0
	BD		6,0	26,7	48,0	75,0
	ME	25°C	17,0	44,0	79,3	+
	BD		19,0	46,3	80,0	+
	ME	30°C	20,0	49,3	77,0	+
	BD		25,3	52,7	78,0	+
	ME	35°C	3,0	6,0	6,7	6,0
	BD		2,0	5,0	7,0	7,0
IB 26	ME	15°C	0	3,7	16,3	33,0
	BD		0	6,0	21,0	40,7
	ME	20°C	3,7	30,7	65,7	+
	BD		4,3	30,3	63,3	+
	ME	25°C	21,3	64,0	+	+
	BD		22,0	60,7	+	+
	ME	30°C	40,7	+	+	+
	BD		33,3	78,0	+	+
	ME	35°C	43,3	+	+	+
	BD		32,0	81,0	+	+
IB 27	ME	30°C	33,7	+	+	+
	BD		30,0	+	+	+
	ME	35°C	37,7	+	+	+
	BD		37,0	84,0	+	+
IB 28	ME	15°C	0	1,7	7,0	18,0
	BD		0	2,0	10,3	23,0
	ME	20°C	5,0	23,7	53,7	83,0
	BD		2,0	22,3	50,3	80,0
	ME	25°C	13,3	45,3	+	+
	BD		11,7	45,0	85,0	+
	ME	30°C	16,0	54,0	+	+
	BD		19,0	52,7	+	+
	ME	35°C	0	7,0	10,3	10,0
	BD		0	5,0	8,0	9,0
IB 29	ME	30°C	19,0	63,0	+	+
	BD		20,0	55,3	+	+
	ME	35°C	4,0	7,3	8,0	8,0
	BD		5,3	13,0	13,3	14,0
IB 30	ME	15°C	0	1,3	6,7	18,7
	BD		0	3,7	12,3	25,3
	ME	20°C	0	14,7	35,3	62,0
	BD		4,0	18,3	40,0	65,7
	ME	25°C	5,7	29,7	61,7	+
	BD		6,7	30,0	61,3	+
	ME	30°C	0	0	0	0
	BD		3,0	8,0	9,3	9,0
	ME	35°C	0	0	0	0
	BD		0	0	0	0

Em relação às observações sobre a distribuição das fiáides e do sistema de ramificação como um todo, foi constatado tratar-se de um caractere bastante plástico. Decorrente deste fato, as descrições relatadas nos artigos dão margem à um relativo subjetivismo, visto que os autores empregam com frequência termos como: “normalmente”, “usualmente”, “em sua maioria”, “raramente”, “freqüentemente”, “principalmente”, “predominantemente” etc. Por não se conhecer com maior precisão as amplitudes de variação e os fatores intrínsecos que interferem na expressão dos principais caracteres morfológicos, a identificação taxonômica, baseada unicamente na morfologia, se torna bastante complexa.

Isto evidencia claramente a necessidade de uma aproximação polifásica (ou multifásica) no estudo taxonômico, incluindo aspectos ecofisiográficos e moleculares.

Além disso, métodos numéricos poderiam ser utilizados de modo a propiciar descrições com menor grau interpretativo. Um exemplo disso foi proposto recentemente por Ott et al. (2003) aplicando métodos topológicos para descrever e classificar os padrões de ramificação das hifas em colônias de *Peronospora viciae*. Embora análise topológica já houvesse sido aplicada para pesquisar o padrão de ramificação de raízes de plantas, em relação ao suprimento de nutrientes (FITTER et al., 1988; FITTER & STICKLAND, 1991; TAUB & GOLDBERG, 1996), esta foi a primeira vez que o método foi aplicado em fungos.

Uma outra aproximação que, de forma não excludente à anterior, pode trazer novas informações para a compreensão do padrão de desenvolvimento (diferenciação) e comportamento micelial é a aplicação dos princípios da teoria dos sistemas não lineares (GLEICK, 1988).

O estudo dessa dinâmica, associando os fatores que interagem com o microrganismo relacionando o ambiente, o metabolismo e a expressão gênica na geração de padrões pode constituir uma das chaves na compreensão dessa multiplicidade morfológica e delimitar (ou não) grupos ou espécies de modo mais coerente e natural.

Num outro ângulo de análise, esta teoria poderia auxiliar a elucidar os mecanismos que determinam o comportamento *in vitro* do organismo focado. Exemplificando o caso de *Trichoderma*, as variações observadas nos aspectos das

colônias (formação de halos concêntricos e/ou pústulas, conidiogênese, clamidosporogênese, prolongamentos de hifa estéreis ou férteis, padrão de ramificação dos conidióforos, variações nas dimensões e distribuição das fiáides, difusão de metabólitos etc.) seriam consideradas como um padrão de “prospecção” que resulta da integração de processos exploratórios, de consumo, conservativos e degenerativos em ambientes naturais e não apenas como uma característica morfológica estanque.

Neste trabalho, no item 5.3.1 (ver Figura 5 e 6), a variação morfológica abordada, exemplifica como o organismo reage com um sistema integrado quando submetido à um desequilíbrio em um de seus setores. O sistema se tornando instável, a partir desse ponto busca reestabelecer seu equilíbrio na direção dos atratores surgidos. Rayner (1996) faz um aprofundamento desta abordagem no campo da micologia, incluindo aspectos relacionados à dinâmica populacional de comunidades fúngicas e, pode ser considerado um artigo chave no desenvolvimento desse estudo.

Tabela 14 – Crescimento das linhagens da Coleção de Referência submetidos a 2 temperaturas em meio batata-dextrose (BD) com semeadura lateral e central

Isolado	Temperatura			
	25°C		30°C	
	Central	Lateral	Central	Lateral
IB 01	45,0	46,7	45,0	51,7
IB 03	-	36,3	45,0	50,7
IB 04	45,0	65,0	45,0	70,0
IB 05	-	55,7	45,0	70,0
IB 06	45,0	45,0	45,0	54,7
IB 07	-	46,0	45,0	52,0
IB 08	45,0	44,3	45,0	41,7
IB 09	-	53,3	45,0	62,0
IB 10	45,0	55,3	45,0	70,0
IB 11	45,0	62,0	45,0	70,0
IB 12	-	45,3	45,0	54,0
IB 13	45,0	52,3	45,0	70,0
IB 14	38,6	42,0	16,5	13,7
IB 15	-	67,0	45,0	70,0
IB 16	-	50,7	36,5	42,7
IB 17	32,8	33,3	34,0	37,3
IB 18	-	37,3	40,0	31,7
IB 19	-	44,7	26,5	29,3
IB 20	-	46,7	29,0	25,3
IB 21	37,1	39,7	42,0	42,7
IB 22	-	38,7	45,0	42,3
IB 23	42,0	45,0	45,0	46,3
IB 24	-	37,0	40,0	41,3
IB 25	40,0	42,0	39,0	41,0
IB 26	45,0	54,7	45,0	70,0
IB 27	-	58,3	45,0	70,0
IB 28	42,5	41,3	45,0	47,0
IB 29	-	48,0	45,0	55,3
IB 30	30,6	30,7	4,6	9,0

5.4 Manutenção e Preservação dos Isolados

Os isolados obtidos das amostras de solo foram mantidos durante todo o desenvolvimento do trabalho pelos métodos de Castellani (1967, adaptado por FIGUEIREDO, 1967), de repicagens sucessivas e Câmara Fria (10°C). Esses isolados foram introduzidos e/ou reavivados paulatinamente na medida que os ensaios eram desenvolvidos, portanto em datas distintas. Os Quadros 7, 8 e 9 mostram 3 avaliações, realizadas entre setembro de 2003 e fevereiro de 2004, de isolados mantidos pelo método de Castellani com diferentes datas de introdução. Os testes de viabilidade mostram um alto índice de recuperação no período avaliado (até 21 meses de armazenamento). As linhagens da coleção de referência, avaliadas após 18 meses mostram uma eficiência de 83,3%, enquanto a coleção de trabalho resultou em 70,8 e 82,2%, respectivamente. A perda da viabilidade de alguns isolados parece estar relacionada às características intrínsecas dos genótipos, uma vez que não se observa o decréscimo da taxa com o decorrer dos meses. Avaliações posteriores poderão identificar o período limite aceitável para se proceder ao re-avivamento e re-armazenamento.

Diversas técnicas de preservação têm sido utilizadas para a preservação de fungos sem que haja um consenso em termos de recomendação geral. Smith & Onions (1994), em monografia específica sobre o assunto, aponta as técnicas de armazenamento de liofilização (*freeze drying*), em nitrogênio líquido, ou em sílica gel serem as ideais para a manutenção de *Trichoderma*, sendo que pela técnica de liofilização vêm preservando espécies deste gênero por 14 anos.

Samuels (comunicação pessoal, 2004) recomenda idealmente a liofilização, entretanto, devido ao custo e mão de obra, indica as técnicas de nitrogênio líquido e baixa temperatura (*deep freezing*, -80°C) como uma opção satisfatória. Este autor utiliza rotineiramente a manutenção em agar (*corn meal*, 9°C) e em nitrogênio líquido para garantir a preservação.

Em relação aos meios de re-avivamento e/ou manutenção foi utilizado durante o trabalho os meios de extrato de malte (*Malt Extract Agar*) e batata dextrose (*Potato Dextrose Agar*). Estes meios, incluindo o meio de batata cenoura (*Potato Carrot Agar*)

são os recomendados por Smith & Onions (1994) para preservação de *T. harzianum* e *T. viride*. Para a manutenção da atividade celulolítica estes autores recomendam a inclusão de papel filtro estéril nos meios de forma a manter a indução enzimática.

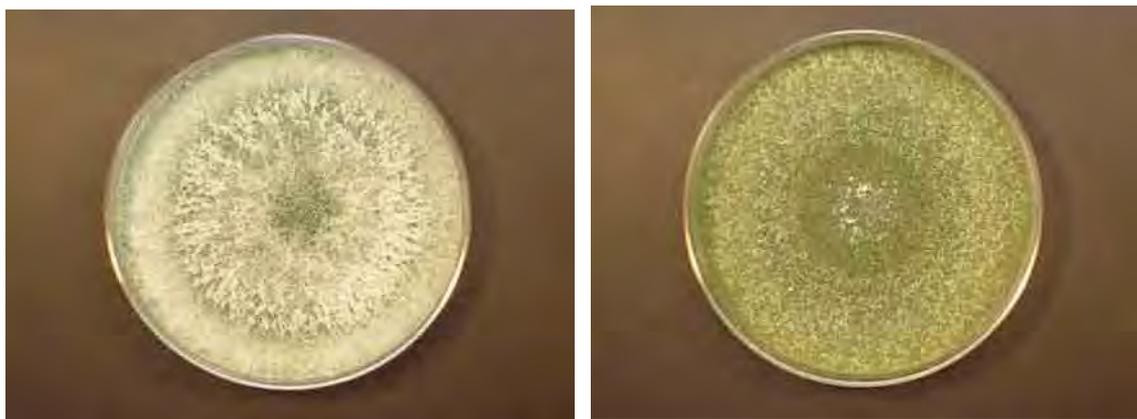


Figura 5 – Isolados crescidos em meio BD (30°C) evidenciando a formação de halos concêntricos e conidiação radial homogênea, não ocorrendo pressão ambiental diferenciada que altere o aspecto concêntrico



Figura 6 – Isolados crescidos em meio BD (30°C) através de semeadura lateral. As setas indicam uma conidiação setorial e observa-se o desenvolvimento irregular provocado pela restrição das condições ótimas no interior da placa

Quadro 8 – Avaliação de viabilidade de linhagens preservadas pelo método de Castellani (1967) mantidos à temperatura ambiente (2^a. avaliação, realizada em 17/10/2003)

Isolado	Espécie (blast/ITS)	Data Introdução	Data Avaliação	Nº. de Meses	Resultado			
IB 01	<i>T. aureoviride</i>	12/04/2002	17/10/2003	18	+			
IB 02	<i>T. sp.</i>				-			
IB 03	<i>T. citrinoviride</i>				-			
IB 05	<i>T. harzianum</i>				+			
IB 07	<i>T. sp.</i>				-			
IB 08	<i>T. sp.</i>				+			
IB 09	<i>T. aureoviride</i>				+			
IB 10	<i>T. harzianum</i>				+			
IB 12	<i>T. harzianum</i>				+			
IB 13	<i>T. harzianum</i>				-			
IB 14	<i>T. stromaticum</i>				+			
IB 15	<i>T. longibrachiatum</i>				-			
IB 16	<i>T. atroviride</i>				+			
IB 17	<i>T. virens</i>				+			
IB 18	<i>T. harzianum</i>				+			
IB 19	<i>T. sp.</i>				+			
IB 20	<i>T. harzianum</i>				+			
IB 21	<i>T. harzianum</i>				+			
IB 22	<i>T. harzianum</i>				+			
IB 23	<i>T. stromaticum</i>				+			
IB 24	<i>T. asperellum</i>				+			
IB 25	<i>T. sp.</i>				+			
IB 26	<i>T. longibrachiatum</i>				+			
IB 27	<i>T. longibrachiatum</i>				+			
IB 28	<i>T. harzianum</i>				+			
					TOTAL	25/5		

Quadro 9 – Avaliação de viabilidade de linhagens preservadas pelo método de Castellani (1967) mantidos à temperatura ambiente (3^a. avaliação, realizada em 02/02/2004)

Isolado	Espécie (blast/ITS)	Data Introdução	Data Avaliação	Nº. de Meses	Resultado		
08/01	<i>T. hamatum</i>	14/06/2002	02/02/2004	20	+		
13/05	<i>T. spirale</i>	03/05/2002		21	+		
14/01	<i>T. aureoviride</i>				+		
14/02	<i>T. atroviride</i>				+		
15/06	<i>T. aureoviride</i>				+		
18/03	<i>T. atroviride</i>	23/07/2002		19	+		
18/04	<i>T. sp.</i>				-		
18/11	<i>T. hamatum</i>				+		
19/05	<i>T. aureoviride</i>				+		
20/05	<i>T. spirale</i>	30/07/2002		19	-		
22/01	<i>T. tomentosum</i>	15/08/2002		18	+		
23/05	<i>T. koningii</i>	27/08/2002		18	+		
24/05	<i>T. sp.</i>				+		
25/04	<i>T. sp.</i>				22/08/2002	18	+
27/15	<i>T. harzianum</i>				+		
29/16	<i>T. koningii</i>				22/08/2002	18	-
31/06	<i>T. hamatum</i>				12/07/2002	19	-
32/06	<i>T. koningii</i>				+		
36/01	<i>T. harzianum</i>				05/07/2002	19	+
36/03	<i>T. saturnisporum</i>						+
38/04	<i>T. saturnisporum</i>						+
39/07	<i>T. spirale</i>	08/2002		18	-		
52/10	<i>T. koningii</i>	05/09/2002		17	-		
52/12	<i>T. reesei</i>				-		
				TOTAL	24/7		

Em termos rotineiros e com um número relativamente pequeno de isolados o método de Castellani (1967) se mostrou eficiente no período de trabalho. Este método vem sendo largamente utilizado devido a sua praticidade e baixo custo, inclusive para fungos fitopatogênicos (FIGUEIREDO, 1967), entretanto, não dispensa avaliações periódicas e monitoramento de contaminações.

A preservação das culturas (método de Castellani e câmara fria) foram satisfatórias para a utilização nos ensaios ao longo do período estudado. Uma ou duas repicagens no meio de extrato de malte (*ME*) ou de batata-dextrose (*BD*) garantiu às culturas um estado ótimo de crescimento para a realização dos experimentos. O Quadro 10 mostra que até 19 meses obteve-se 100,0% de recuperação dos isolados, mantidos nos meios extrato de malte e/ou batata dextrose. Uma alternativa de custo reduzido é a técnica de armazenamento em óleo mineral. Ela vem sendo utilizada sistematicamente em coleções nacionais como a URM (UFPe) e a Coleção de Culturas do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) com resultados satisfatórios (CAVALCANTI, M.A.Q., UFPe, comunicação pessoal, 2003, NEUFELD & SARQUIS, 2003).

Quadro 10 – Avaliação da viabilidade do isolados preservados em câmara fria

Isolado	Espécie (blast/ITS)	Data Introdução	Data Avaliação	Nº. de Meses	Resultado
01/08	<i>T. sp.</i>	06/2002	09/09/2003	15	+
20/01	<i>T. spirale</i>	30/07/2002		14	+
20/02	<i>T. spirale</i>				+
23/05	<i>T. koningii</i>	15/08/2002		13	+
24/16	<i>T. spirale</i>	27/08/2002	02/02/2004	18	+
25/02	<i>T. spirale</i>		09/09/2003	13	+
27/15	<i>T. harzianum</i>	22/08/2002	02/02/2004	18	+
29/16	<i>T. koningii</i>		09/09/2003	13	+
31/06	<i>T. hamatum</i>	12/07/2002		14	+
37/01	<i>T. longibrachiatum</i>	05/07/2002	02/02/2004	19	+
37/02	<i>T. ghanense</i>				+
37/04	<i>T. longibrachiatum</i>				+
37/05	<i>T. longibrachiatum</i>				+
51/09	<i>T. harzianum</i>	05/09/2002		17	+
52/10	<i>T. koningii</i>		09/09/2003	12	+
				TOTAL	15/0

Em relação ao material mantido pelo método da liofilização, uma avaliação preliminar feita com a linhagem IB-04 (material de referência), feita em março de 2003 (1 mês após o procedimento), recuperou os dois materiais, sendo que o isolado mantido em leite desnatado cresceu de forma mais agressiva e rapidamente em condições

ambiente que o material preservado em sacarose. Avaliações subseqüentes poderão confirmar a eficiência e validade deste material como meio protetor.

As normas internacionais de coleção de culturas recomendam que pelo menos 2 métodos de preservação devem ser utilizados, sendo um deles a liofilização (CAVALCANTI, M.A.Q., UFPe, comunicação pessoal, 2003). Apesar disso, a seleção dos métodos disponíveis e mais adequados será função direta das condições e recursos do laboratório utilizado.

Por acordo institucional, foram depositadas duplicatas de toda a coleção de trabalho (539 isolados), e das linhagens de referência (coleção) na EMBRAPA – Meio Ambiente (Jaguariúna-SP, codificação internacional WDCM-712) onde serão liofilizadas para garantia de preservação visando sua utilização em estudos posteriores.

5.5 Avaliação da Atividade Celulolítica

5.5.1 Meios de Cultura e Condições Experimentais

Dos meios de cultura testados nos ensaios preliminares o meio CA1, consistiu numa formulação intermediária entre os meios CMC e CA. A vantagem da utilização da carboximetilcelulose em lugar da celulose microcristalina foi bastante evidente, além de proporcionar um halo de degradação mais nítido após a revelação, seu manuseio oferece bastante reprodutibilidade nos ensaios devido à facilidade de homogeneização durante o preparo do meio. Em relação à utilização do redutor de colônia (Triton X100, Sigma, E.U.A.) a melhor concentração foi de 0,1%, com ligeira diminuição do diâmetro de crescimento, praticamente não interferindo na degradação obtida nas 2 concentrações testadas, conforme é mostrado na Tabela 15. O dados compreendem a média de 18 medidas (mm) e desvio padrão após 6 dias em cultura no meio CA1.

Na Figura 7, em ensaio preliminar, é visualizado aspecto das placas no momento da avaliação, após revelação em solução de vermelho do Congo. O procedimento utilizando discos de meio de cultura para a semeadura foi abandonado no início dos ensaios por ter sido verificado que a técnica de ponteamento é mais eficiente, rápida e

apresenta um desvio padrão menor nas medições. Esta técnica foi padronizada para todos os ensaios subsequentes.

A Tabela 16 mostra o resultado da avaliação da atividade celulolítica de 14 linhagens nas temperaturas 20 e 27°C com o meio CA1 contendo o redutor de colônia de 2 procedências distintas: importado (Sigma, E.U.A.) e nacional (Prolab) em igual concentração. As medidas indicadas representam a média de 9 medições (mm) e ao lado delas é mostrado o desvio padrão. O meio controle (CA1Ø) constituiu na mesma formulação de CA1, sem o redutor.

Após 7 dias foi possível verificar que, como esperado, à 20°C todas culturas, formaram colônias com halos de crescimento inferiores aquelas de submetidas a 27°C. Nesta temperatura ocorreu um aumento variando na faixa de 29,6% (IB-11) a 85,7% (IB-07). Embora essa redução na velocidade de desenvolvimento tenha sido evidente, aparentemente não implicou na alteração da atividade enzimática das linhagens celulolíticas, uma vez que não foram observadas diferenças marcantes (considerando o desvio padrão) nas duas situações. Por estes resultados e pela disponibilidade de recursos de laboratório selecionada a temperatura de 27°C como temperatura padrão para o experimento de triagem (ver próximo item).

Nas concentrações utilizadas, dos redutores avaliados após 7 dias, o de procedência nacional (Prolab) apresentou resultados superiores em 8 das 14 linhagens submetidas às duas temperaturas. Embora selecionado para o ensaio posterior de triagem, a diferença de eficiência para algumas linhagens foi inexpressiva considerando o desvio padrão obtido.

Para verificar a influência do meio de origem (cultura pregressa) na expressão da atividade celulolítica foram avaliadas as linhagens de referência IB-07 e IB-11, provenientes dos meios de cultura BD e ME. No meio CA1, duas concentrações do redutor de colônia foram comparadas visando confirmar o resultado apresentado na Tabela 15. Os resultados são apresentados na Tabela 17, expressos pela média de 18 medições (mm) com o desvio padrão incluído. Aos 5 dias foi observada uma variação na faixa de 0,6 e 5,7%, e aos 7 dias entre 1,2 e 2,6% entre os materiais provenientes dos diferentes meios. Essas variações, em função da amplitude do desvio padrão em cada

tratamento, podem ser consideradas desprezíveis, indicando, portanto, que os dois meios de origem (BD e ME) parecem não interferir substancialmente na resposta enzimática dos isolados. Uma vez que o experimento foi realizado com apenas 2 linhagens e, portanto, não constituindo uma amostra representativa do gênero, o ensaio foi padronizado utilizando materiais provenientes de meio BD, no mínimo após 2 subcultivos neste meio.

Tabela 15 – Efeito da concentração do redutor de colônia sobre diferentes linhagens de *Trichoderma* (Coleção de Referência)

Isolado	Concentração do redutor							
	0,05%				0,10%			
	Ø col.		Ø deg.		Ø col.		Ø deg.	
	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ
IB 07	24,9	1,9	38,7	0,8	24,8	1,5	39,9	0,9
IB 08	23,6	0,8	33,7	0,5	21,1	0,8	33,1	0,8
IB 10	27,9	0,8	39,0	0,9	27,6	0,8	40,3	0,9
IB 11	17,4	0,6	33,8	1,4	16,7	1,3	35,4	1,5
IB 13	27,3	0,7	38,9	0,9	26,8	0,8	40,1	0,8
IB 14	19,9	0,6	30,2	0,7	19,8	0,9	31,9	0,8
IB 17	25,0	0	26,0	0	22,7	1,5	24,8	1,3
IB 23	23,6	0,7	35,5	0,7	22,9	0,9	34,7	1,6

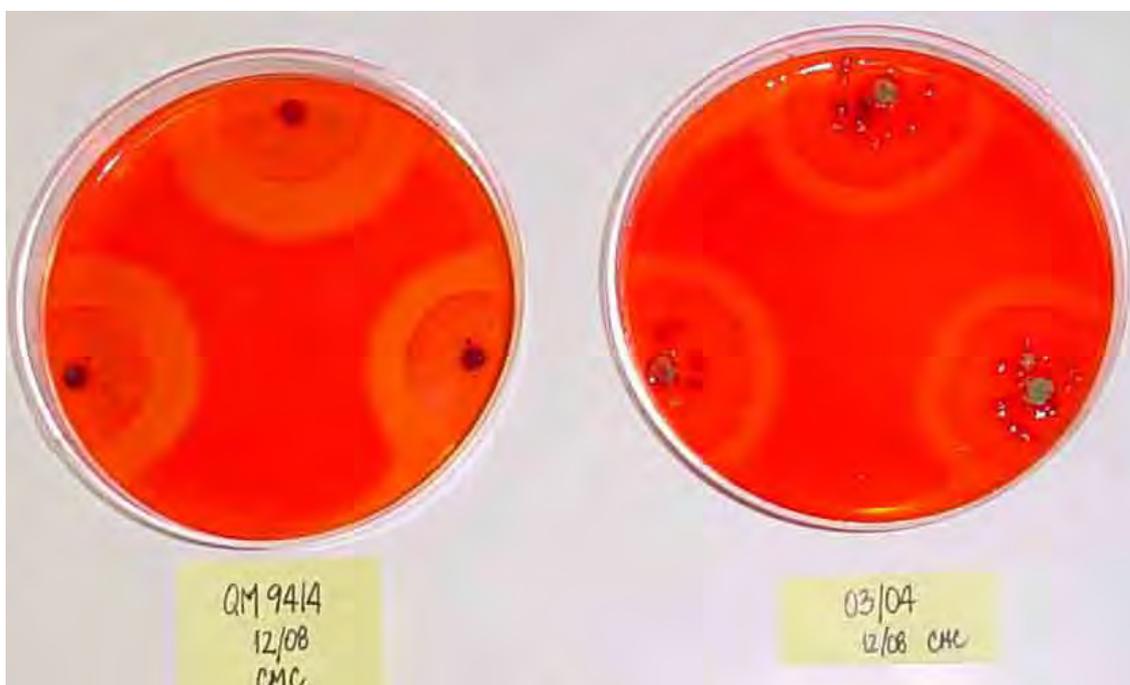


Figura 7 – Isolados IB-11 (=QM9414, referência) e IB-03/04 com diferentes níveis de atividade celulolítica, apresentando halos de hidrólise revelados por solução de vermelho do Congo em meio contendo carboximetilcelulose

5.5.2 Triagem de Isolados Celulolíticos

Da coleção de trabalho (539 isolados), foram avaliados 262, distribuídos em 5 lotes, avaliados subseqüentemente. A linhagem IB-11, com reconhecida celulolítica (*Trichoderma reesei* = QM9414 = ATCC 26921, derivada de QM6a, ver MONTENECOURT & EVELEIGH, 1979, e Quadro 11), foi utilizada como parâmetro de referência (degradação relativa percentual) e controle dos ensaios. As seguintes linhagens provenientes da coleção de referência também foram avaliadas: IB-7, 8, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 25 e 29. Os resultados das medições dos halos de degradação são apresentados no Anexo 5.

A interpretação dos resultados do ensaio utilizando carboximetilcelulose como forma de triagem (*screening*) mostrou de forma clara a validade da técnica para a seleção de isolados com potencial biotecnológico. De maneira geral, como previsto, os isolados, em sua grande maioria apresentaram atividade menor que o isolado celulolítico de referência (IB-11).

A média global de degradação, relativa ao isolados de referência foi de 54,4%. Entretanto a variação entre os isolados obtidos das amostras de solo foi bastante elevada, indo de um valor mínimo de 0 (ausência de halo de degradação) até 117,7% (IB-37/01, identificado posteriormente como *T. longibrachiatum*). Esse isolado junto com outros 3 obtidos da mesma amostra de solo (ponto 37, Piratininga) apresentaram os melhores índices de atividade celulolítica, e não foram identificados em nenhum outro ponto de coleta. Os resultados obtidos com estes isolados, que apresentaram atividade superior ao isolado de referência deverão receber um estudo mais pontual em função desta resposta.

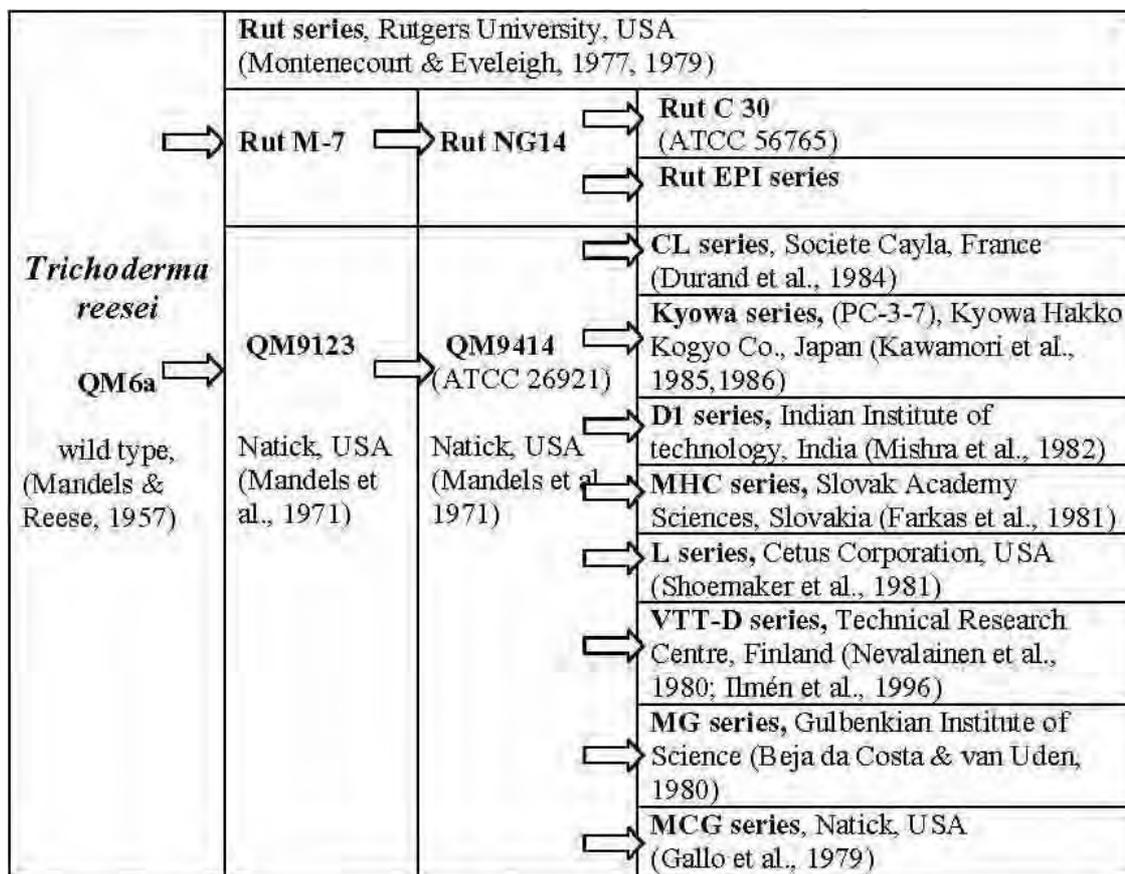
Tabela 16 – Efeito do redutor de colônia sobre o desenvolvimento e atividade celulolítica de isolados submetidos às temperaturas de 20 e 27°C (S=marca Sigma; P=marca ProLab, (+) = preenchimento da placa, (-) = sem degradação)

Isol.	Meio	2d				3d				4d				7d							
		20°C		27°C		20°C		27°C		20°C		27°C		20°C				27°C			
		Ø colônia				Ø colônia				Ø colônia				Ø col.		Ø deg.		Ø col.		Ø deg.	
		x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ
IB 07	CA1S	1,7	0,5	3,0	0	2,4	0,5	5,4	0,5	3,6	0,9	7,3	0,9	7,0	1,6	-	-	13,0	0,5	8,1	0,6
	CA1P	1,7	0,5	3,1	0,3	2,7	0,5	5,2	0,4	3,2	0,4	7,1	0,9	6,9	0,6	-	-	12,9	1,1	7,8	0,7
IB 08	CA1S	2,2	0,7	4,4	0,5	3,6	1,0	5,7	0,7	5,1	0,8	7,8	0,7	11,9	0,8	7,9	0,3	17,1	0,3	6,1	0,3
	CA1P	2,1	0,3	3,4	0,5	3,2	0,4	5,8	1,0	4,7	0,7	7,6	0,7	11,3	0,9	6,7	0,5	16,9	0,3	6,8	0,4
IB 10	CA1S	2,0	0	4,0	0	4,3	0,5	6,0	0	5,1	0,6	8,6	0,5	11,1	0,6	5,7	0,5	15,0	0	6,7	0,5
	CA1P	2,0	0	3,7	0,5	4,1	0,3	5,3	0,5	5,1	0,3	7,9	1,4	10,4	0,5	8,7	0,5	15,0	0	7,1	0,3
	CA1Ø	10,0	0,6	19,2	0,8	20,4	2,7	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	BDA	17,1	0,8	31,3	2,6	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
IB 11	CA1S	1,9	1,2	3,5	1,1	2,1	0,6	5,4	0,9	4,3	1,8	4,1	0,9	8,1	2,1	10,1	0,3	10,5	1,8	10,4	0,8
	CA1P	0,8	0,7	1,9	0,9	2,0	0	3,4	0,5	1,7	0,5	3,4	0,5	5,7	0,7	9,0	0	8,6	0,7	10,3	1,2
	CA1Ø	8,8	1,2	7,4	0,5	18,9	1,3	+	-	20,9	1,3	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
IB 13	CA1S	2,0	0	3,3	0,5	3,4	0,5	6,4	1,2	5,1	0,6	8,1	1,1	12,1	0,6	-	-	18,0	1,4	7,9	0,3
	CA1P	2,0	0	3,2	0,4	3,2	0,8	6,0	0,9	5,1	0,3	8,7	1,4	12,6	1,9	-	-	18,2	1,0	7,8	0,7
IB 14	CA1S	1,9	0,3	1,7	0,5	2,1	0,6	3,7	1,0	3,3	0,7	5,4	0,7	7,8	2,4	11,0	2,3	12,1	0,6	7,1	0,3
	CA1P	2,0	0	2,4	0,7	2,7	0,7	4,6	1,8	3,3	0,5	5,9	2,0	7,9	1,5	6,0	0	12,9	1,3	7,3	0,5
IB 17	CA1S	2,0	0	3,2	1,1	3,2	0,4	4,9	0,3	4,3	0,5	7,3	1,4	10,8	1,1	1,0	0	15,3	1,1	0,9	0,3
	CA1P	1,9	0,3	3,0	0,9	2,9	0,6	5,0	0,9	3,8	0,4	7,2	1,0	10,1	0,3	1,0	0	14,7	0,5	0,8	0,4
IB 18	CA1S	3,0	0	3,8	0,7	3,9	0,6	6,2	0,4	5,1	0,3	8,0	0,5	11,7	1,6	3,3	0,5	16,2	0,7	2,9	0,3
	CA1P	3,0	0	3,0	0	3,9	0,6	6,3	0,7	5,2	0,4	7,3	0,7	12,0	1,2	4,0	0	17,0	1,8	2,9	0,3
IB 20	CA1S	2,7	0,5	2,8	0,4	3,7	0,9	4,4	0,5	4,9	0,6	6,7	0,5	10,9	1,1	7,7	0,5	14,6	0,7	5,7	0,5
	CA1P	2,0	0,5	2,7	0,5	3,6	0,7	4,9	0,6	4,6	0,5	6,6	0,5	9,9	0,8	5,0	0	13,8	0,8	6,6	0,5
IB 21	CA1S	1,6	0,5	2,9	0,3	2,2	0,8	4,8	0,4	3,9	0,8	6,2	0,4	8,2	1,0	1,0	0	12,8	1,0	1,0	0
	CA1P	1,1	0,3	3,1	0,3	2,9	0,8	5,1	0,8	3,6	0,5	6,7	0,9	8,4	1,1	1,0	0	12,0	0,9	1,0	0
IB 22	CA1S	-	-	2,8	0,4	-	-	5,7	0,7	-	-	7,8	0,8	-	-	-	-	13,5	0,8	5,0	1,0
IB 23	CA1S	1,4	0,5	3,1	0,6	2,3	1,1	4,2	0,7	3,3	0,9	5,7	1,2	8,3	1,1	8,0	0	12,7	1,7	7,7	0,5
	CA1P	1,6	0,7	3,0	0	2,2	0,8	4,4	0,7	2,7	0,7	6,0	0,9	8,1	1,8	6,0	0	13,1	1,1	8,0	0
IB 25	CA1S	1,2	0,4	3,1	0,6	2,2	0,8	4,2	1,0	3,4	0,7	5,7	0,9	8,3	1,2	7,0	0	9,7	1,7	-	-
	CA1P	1,3	0,5	3,0	0,5	1,8	0,4	4,3	0,9	3,4	0,5	5,8	0,8	6,6	1,0	4,0	0	13,0	1,3	7,7	0,5
IB 29	CA1S	-	-	3,9	0,5	-	-	6,8	0,4	-	-	8,2	0,7	-	-	-	-	14,5	0,5	5,0	0

Tabela 17 – Efeito do meio de cultura de origem na resposta à atividade de degradação de celulose em meio CA1 contendo concentrações distintas do redutor de colônia Triton X100 (média de 18 medições considerando o diâmetro total do halo de degradação)

Isol.	Meio De Origem	Leituras															
		5d								7d							
		Concentração do redutor															
		0,05%				0,10%				0,05%				0,10%			
		Ø col.		Ø deg.		Ø col.		Ø deg.		Ø col.		Ø deg.		Ø col.		Ø deg.	
IB 07	MEA	20,9	0,6	32,5	0,8	20,5	1,2	33,1	1,1	28,0	1,4	41,8	1,1	27,6	0,7	42,7	0,8
	BDA	20,1	1,9	31,8	1,5	21,3	1,1	33,3	1,1	28,2	0,7	42,9	0,3	28,2	0,9	42,2	0,4
IB 11	MEA	14,7	0,7	29,2	1,3	14,1	0,5	28,9	0,7	20,1	1,1	39,8	1,8	19,5	0,6	39,5	1,2
	BDA	14,6	0,7	29,1	1,0	13,3	0,8	27,4	1,6	20,3	0,8	40,0	2,1	19,0	0,5	38,5	0,5

Quadro 11 – Genealogia de diferentes linhagens mutantes de *T. reesei* altamente produtoras de celulase, isoladas em diferentes laboratórios do mundo (PERSSON et al., 1991; NEVALAINEM et al., 1994; XU et al., 2000, XIONG, H., 2004) (as referências deste quadro constam em NEVALAINEM et al, 1994)



Este tipo de ensaio é considerado como um teste semi-quantitativo (XIMENES, E., UNB, comunicação pessoal, 2002), assim, embora possa ocorrer ligeira variação nos diâmetros dos halos produzidos (apesar das padronizações de volume de meio, discos de cultura, etc) os resultados refletem uma forte indicação sobre a eficiência dos isolados em termos de produção de celulases. Outro fato que deve ser considerado é que estes isolados apresentaram estes resultados em meio básico sem qualquer outro componente adicional ou técnica específica que pudesse interferir na expressão gênica das celulases. Portanto, é possível que mediante técnicas específicas como indução de superexpressão gênica (cf. MARGOLLES-CLARK, et al., 1996) e/ou a suplementação de substâncias indutoras (SCHAFFNER & TOLEDO, 1991), a produção enzimática possa ser ainda amplificada, viabilizando assim uma possível utilização industrial.

A preservação de todos os isolados manipulados foi realizada pelos métodos de Castellani e em câmara fria, entretanto não foi possível obter dados mais precisos sobre a estabilidade da expressão celulolítica em *Trichoderma* através destes métodos.

Para visualizar no conjunto, o resultado da avaliação foi disposto de maneira gráfica em ordem crescente de atividade e apresentados na forma porcentual em relação à linhagem de referência utilizada como padrão no decorrer de todo o trabalho (IB-11). O gráfico obtido é apresentado na Figura 8, no qual cada ponto, disposto seqüencialmente, corresponde à atividade enzimática de um isolado avaliado (não indicados na figura devido à limitação gráfica). A disposição em ordem crescente de atividade revelou um padrão de curva sigmóide, mostrando o espectro de atividade possível de se obter num processo de seleção linhagens com potencial de aplicação. Posteriormente, prospecções mais direcionadas poderão priorizar esta espécie sobretudo no ecossistema em que foram localizadas.

As celulasas compreendem uma família de enzimas extracelulares produzidas por uma grande variedade de fungos e bactérias, as quais catalisam sinergicamente a hidrólise das ligações β -1,4-glicosídica na molécula da celulose. A atividade celulolítica de *Trichoderma* é bastante conhecida e sua utilização em processos industriais têm sido cada vez mais ampla e diversificada (ver item 4). Apesar disso, a caracterização e distribuição de espécies com maior potencial produtivo ainda não é bastante compreendida. A utilização de ensaios de atividade enzimática *in vitro* pode servir com uma ferramenta importante na triagem e seleção de isolados com alta produção de celulasas.

5.6 Avaliação do Potencial de Biocontrole

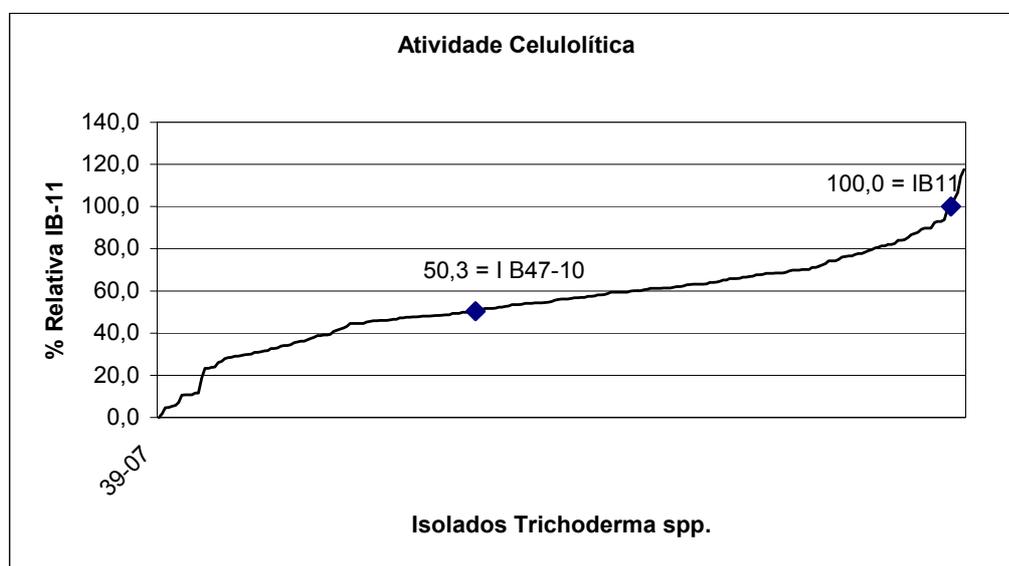
5.6.1 Avaliação *in vitro* da Ação dos Isolados de *Trichoderma* spp. sobre o Crescimento de *Pythium aphanidermatum*

Os resultados obtidos, apresentados na Tabela 18, mostram que a maioria dos isolados cresceu sobre o patógeno preenchendo a placa inteira (=nota 1), indicando que estes isolados apresentam atividade potencial de controle sobre o fitopatógeno, nas condições analisadas.

Tabela 18 – Resultado dos ensaios de pareamento de cultura dos isolados de *Trichoderma* spp. e antibiose *in vitro* sobre *Pythium aphanidermatum* (avaliação do pareamento conforme escala de BELL et al., 1982)

Isolado	Pareamento Nota	Ensaio			
		Antibiose			
		halo de inibição (mm)			
		a	b	c	x
01/01	1	0	0	0	0
01/02	2	0	0	0	0
01/09	1	0	0	0	0
01/15	1	21,0	24,0	24,0	23,0
02/03	1	17,0	20,0	26,0	21,0
02/05	1	0	0	0	0
02/10	1	11,0	11,0	-	11,0
02/14	1	15,0	20,0	15,0	16,7
03/01	1	0	0	0	0
03/02	1	0	0	0	0
03/03	1	18,0	16,0	21,0	18,3
03/04	1	21,0	19,0	23,0	21,0
04/01	1	22,0	29,0	28,0	26,3
04/03	1	25,0	14,0	20,0	19,7
04/04	1	20,0	23,0	21,0	21,3
04/08	1	0	0	0	0
04/09	1	0	0	0	0
04/10	1	22,0	24,0	20,0	22,0
04/11	1	23,0	20,0	20,0	21,0
05/01	1	0	0	0	0
05/02	1	0	0	0	0
05/03	1	12,0	11,0	10,0	11,0
05/04	1	0	0	0	0
05/05	3	0	0	0	0
06/01	1	0	0	0	0
06/02	5	0	0	0	0
06/03	1	0	0	0	0
06/05	1	0	0	0	0
07/01	5	23,0	24,0	19,0	22,0
07/02	1	0	0	0	0
07/09	1	21,0	21,0	17,0	19,7
07/10	1	18,0	18,0	15,0	17,0
07/12	1	21,0	20,0	20,0	20,3
07/13	1	21,0	21,0	17,0	19,7
07/14	1	24,0	15,0	16,0	18,3
08/01	4	0	0	0	0
08/02	5	8,0	3,0	-	5,5
08/03	4	23,0	17,0	-	20,0
08/04	1	0	0	0	0
09/01	1	23,0	25,0	18,0	22,0
09/02	1	17,0	15,0	17,0	16,3
09/04	3	17,0	16,0	16,0	16,3
09/09	1	15,0	11,0	-	13,0
10/01	1	21,0	14,0	24,0	19,7
10/02	1	24,0	25,0	23,0	24,0
10/03	0	18,0	13,0	16,0	15,7
10/04	1	13,0	-	-	13,0
10/09	4	0	0	0	0

Figura 8 – Atividade celulolítica relativa dos isolados de *Trichoderma* spp. dispostos em seqüência crescente de atividade. No gráfico são indicados os isolados 39-07 (0%), IB47-10 (50,3%) e o padrão IB-11 (100%)



Dos 48 isolados avaliados 79,2% (38) suprimiram o desenvolvimento do patógeno, preenchendo a superfície da placa (nota 1, conforme BELL et al., 1982), enquanto os isolados IB-06/02, IB-07/01, IB-08/02 não apresentaram qualquer atividade sobre o patógeno (nota 5). A ocorrência destes e de outros 3 isolados apresentando nota 4, indica que o patógeno está ativo, entretanto, a manutenção do grau de fitopatogenicidade somente pode ser aferida em ensaios com hospedeiros susceptíveis.

5.6.2 Análise *in vitro* da Produção de Metabólitos Tóxicos

Os resultados *in vitro* (Tabela 18) demonstraram que vários isolados foram capazes de inibir o crescimento do patógeno pela produção de metabólitos inibidores em meio de cultura. 23% (11) dos isolados testados produziram halos de inibição iguais ou superiores a 20,0mm, sendo que os maiores halos foram produzidos pelos isolados IB-04/01 e IB-10/02, com 26,0 e 24,0mm respectivamente. A ausência de atividade antibiótica foi verificada em 20 isolados (41,7%), tendo 15 deles recebido nota 1 no ensaio de pareamento de culturas.

Estas observações indicam que a propriedade de antibiose está ocorrendo de modo independente dos outros possíveis mecanismos antagônicos (micoparasitismo e competição), não permitindo, portanto, uma triagem de isolados potenciais para o biocontrole num único procedimento experimental.

Tabela 19 – Eficiência dos isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *Pythium aphanidermatum* em condições de casa de vegetação (esq.= lote 1, dir.= lote 2)

Isolado (IB)	Plantas Mortas		Isolado (IB)	Plantas Mortas	
	No.	%		No.	%
C +	17	85	C +	20	100
C -	-	-	C -	-	-
01/01	08	40	06/01	14	70
01/02	13	65	06/02	15	75
01/09	09	45	06/03	17	85
01/15	05	25	06/05	16	80
02/03	07	35	07/01	13	65
02/05	01	05	07/02	16	80
02/10	04	20	07/09	16	80
02/14	04	20	07/10	18	90
03/01	07	35	07/12	17	85
03/02	10	50	07/13	18	90
03/03	10	50	07/14	15	75
03/04	05	25	08/01	17	85
04/01	11	55	08/02	18	90
04/03	06	30	08/03	17	85
04/04	09	45	08/04	15	75
04/08	08	40	09/01	14	70
04/09	09	45	10/01	16	80
04/10	10	50	10/02	15	75
04/11	06	30	10/04	09	45
05/01	08	40	10/09	19	95
05/02	07	35			
05/03	12	60			
05/04	07	35			
05/05	16	80			
09/02	08	40			
09/04	05	25			
09/09	09	45			
10/03	03	15			

5.6.3 Análise *in vivo* do Potencial de Biocontrole

Dos 48 isolados testados em casa de vegetação (20 plantas/tratamento), 7 (15%) apresentaram eficiência maior ou igual a 75%, sendo que os melhores resultados foram observados com os isolados IB-02/05 e IB-10/03 com 5 e 15% de plantas mortas, respectivamente, conforme demonstrado na Tabela 19. Apesar da indicação de se tratar de isolados promissores somente uma reavaliação pode confirmar esses dados uma vez que o Controle positivo do primeiro lote testado não acusou 100% de plântulas mortas, o que seria esperado uma vez que apenas o patógeno foi aplicado neste tratamento.

Fatores como a diminuição da agressividade do patógeno, ou mesmo condições do preparo do inóculo poderiam explicar esta variação.

Entre a resposta dos dois lotes avaliados, em condições de casa de vegetação, observou-se uma diferença relativamente grande na média percentual de plantas mortas analisadas conjuntamente. Este fato não pode ser explicado devido ao procedimento metodológico, o qual foi idêntico nas duas situações. Esta diferença pode ser atribuída a diferentes condições climáticas entre os dois períodos nos quais os ensaios se desenvolveram, uma vez que a casa de vegetação utilizada não apresenta controle ambiental total.

Cruzando-se os dados do ensaio de antibiose com os resultados obtidos na casa de vegetação, observa-se que dos 11 isolados mais eficientes (halos superiores a 20,0mm) 2 deles – 01/15 e 03/04 - também tiveram um bom desempenho no controle do tombamento das mudas de pepino, indicando uma possível relação entre os dois fatores. Estes dois isolados também apresentaram bom resultado no ensaio de pareamento, fortalecendo assim a suposição que os mesmos teriam um efeito significativo como biocontroladores.

Resultados pontuais de correspondência, como aquele apresentado pelo isolado IB-08/02, que apresentou baixa eficiência nos dois ensaios *in vitro* e também na casa de vegetação (90% de plantas mortas), não podem ser generalizados uma vez que foram raros no presente estudo.

Embora tenha sido observada uma possível correlação entre a produção de substâncias tóxicas (ou inibidoras) *in vitro* e o comportamento no pareamento de alguns isolados e em casa de vegetação no controle de tombamento de mudas de pepino, os ensaios realizados não permitiram uma conclusão consistente. Estes ensaios, estando expostos a diversas variáveis, fazem com que sua validade, como forma de triagem, seja questionada, além de dificultar sua reprodutibilidade

Além disso, os resultados obtidos não podem ser extrapolados diretamente para as condições de campo, uma vez que outros fatores podem interferir diretamente na interação com a microbiota e microambiente local. Para uma avaliação mais precisa, um estudo complementar sobre as condições ecológicas locais e comportamento destes isolados *in situ* seria imprescindível. Isto é confirmado na literatura mais recente que, de

modo geral, observa uma tendência generalizada de utilizar estes métodos *in vitro* somente em conjunto com ensaios em casa de vegetação e/ou campo.

Tabela 20 – Identificação dos isolados através da análise no *GenBank* e frequência relativa das espécies seqüenciadas

Seções	Espécie	Frequência		
		No.	%	%Seção
<i>Trichoderma</i>	<i>T. asperellum</i>	10	5,0	63,5
	<i>T. atroviride</i>	11	5,5	
	<i>T. aureoviride</i>	12	6,0	
	<i>T. erinaceum</i>	1	0,5	
	<i>T. harzianum</i>	68	34,2	
	<i>T. koningii</i>	22	11,1	
	<i>T. viride</i>	3	1,5	
<i>Pachybasium</i>	<i>T. hamatum</i>	11	5,5	32,5
	<i>T. inhamatum</i>	6	3,0	
	<i>T. strigosum</i>	1	0,5	
	<i>T. spirale</i>	39	19,6	
	<i>T. tomentosum</i>	2	1,0	
	<i>T. virens</i>	6	3,0	
<i>Longibrachiatum</i> (+ <i>Saturnisporum</i>)	<i>T. ghanense</i>	1	0,5	4,0
	<i>T. longibrachiatum</i>	3	1,5	
	<i>T. reesei</i>	2	1,0	
	<i>T. saturnisporum</i>	2	1,0	
Total		200	100,0	

5.7 Análise Molecular

5.7.1 Análise da Extração do DNA Genômico

O método descrito por Cennis (1982), além de maior praticidade funcionou satisfatoriamente. Seguindo este protocolo, os isolados foram cultivados em meio líquido nos próprios tubos de processamento (microtubos plásticos), eliminando a etapa inicial (cultivo em tubo de ensaio, meio BD líquido), indo direto para centrifugação e lavagem. Dos 2 tampões de extração testados o que produziu as melhores amostras de DNA foi o tampão TEa. Ensaios preliminares mostraram que um volume maior de micélio, cultivados em meio líquido estacionário e macerados em nitrogênio líquido, resultaram numa extração mais eficiente e de maior qualidade, entretanto, mais onerosa. Devido à esta dificuldade, a maceração das estruturas foi feita manualmente, utilizando palitos de madeira estéreis. Esta técnica, embora rústica, funcionou razoavelmente bem face ao grande número de amostras, além de reduzir o tempo de processamento. O procedimento, após a otimização, foi padronizado para todo o restante das amostras.

Os resultados da extração de 30 isolados, referentes a 7 coletas (26, 27, 28, 29, 30, 31, 32), são mostrados na Figura 9 (imagem positiva e negativa) através de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio (conforme condições já descritas). O marcador de peso molecular (*ladder*) utilizado foi de 1Kb (Promega E.U.A.).

O DNA de 263 amostras foi extraído e avaliado por eletroforese em gel de agarose. O critério adotado para a seleção das amostras foi de pelo menos 4 isolados por ponto de coleta, o que foi considerado como representativo da diversidade da população local. Em alguns casos foi extraído o DNA de um número maior de isolados, prevendo-se um estudo mais localizado, como é o caso da amostra 18, com 8 isolados manipulados (IB-08/02, 03, 05, 07, 08, 09, 11 e 12).

5.7.2 Amplificação e Purificação do DNA para o Seqüenciamento

Nas condições empregadas o programa de termociclagem que forneceu os melhores resultados foi o programa 2 (ver item 4.11.2). A Figura 10 (imagem positiva e negativa) exemplifica o resultado obtido utilizando-se essa programação, considerado satisfatórios para o procedimento seguinte.

O protocolo de purificação utilizando isopropanol foi padronizado para todas as amostras por apresentar uma eficiência próxima àquela obtida com as microcolunas (*kit* Concert, Gibco-BRL, E.U.A.). A seguinte variante deste método também foi testada e mostrou resultado semelhante: após a centrifugação e remoção do sobrenadante, acrescenta-se 150ul de etanol 70%, os tubos são invertidos várias vezes para lavagem das paredes e são, em seguida centrifugados novamente (15000g/5') na mesma posição da centrifugação anterior. O material então é seco na centrífuga à vácuo e armazenado em *freezer* até o momento da amplificação para o seqüenciamento.

Estes procedimentos além de terem proporcionado seqüências de boa resolução, são de custo bastante inferior em relação às microcolunas.

5.7.3 Análise das Seqüências da região ITS1-5,8S-ITS2

Das amostras processadas, 205 foram provenientes da coleção de trabalho e 25 da coleção de referência. No Anexo 4 é relacionado o resultado do seqüenciamento incluindo a identificação dos isolados e das linhagens de referência feitas no *GenBank*, através do programa BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997). As duas seqüências obtidas de cada isolado (senso e anti-senso) foram submetidas ao programa, sendo apresentado apenas os resultados de maior *score* e menor *e-value* (*expect value*). Dos 6 seqüenciamentos que falharam 4 foi devido a problemas na etapa de purificação e no *PCR* de seqüenciamento e 2 por contaminação das amostras por fungos. Os campos em destaque mostram as amostras que foram também avaliadas quanto ao seu potencial celulolítico.

As seqüências submetidas não passaram por nenhum tipo de manipulação prévia. Essa manipulação, através do alinhamento das leituras nos dois sentidos (reverso complemento), gerando uma seqüência de consenso, é utilizada principalmente nos estudos onde uma pequena variação nas bases pode determinar uma alteração grande nas seqüências-resposta. Caso contrário é utilizada para aferir a fidelidade do seqüenciamento e verificar a eficiência dos reagentes utilizados (sobretudo os iniciadores).

A Tabela 20 resume as espécies identificadas através do *GenBank* e sua freqüência relativa, discriminados entre as 4 seções anamórficas conforme Bisset (1991a). Verificou-se que as espécies mais recorrentes na área coberta pela pesquisa foram *T.harzianum* e *T. spirale* (ambos pertencentes à *S. Pachybasium*) com 34,2 e 19,6% de freqüência, respectivamente.

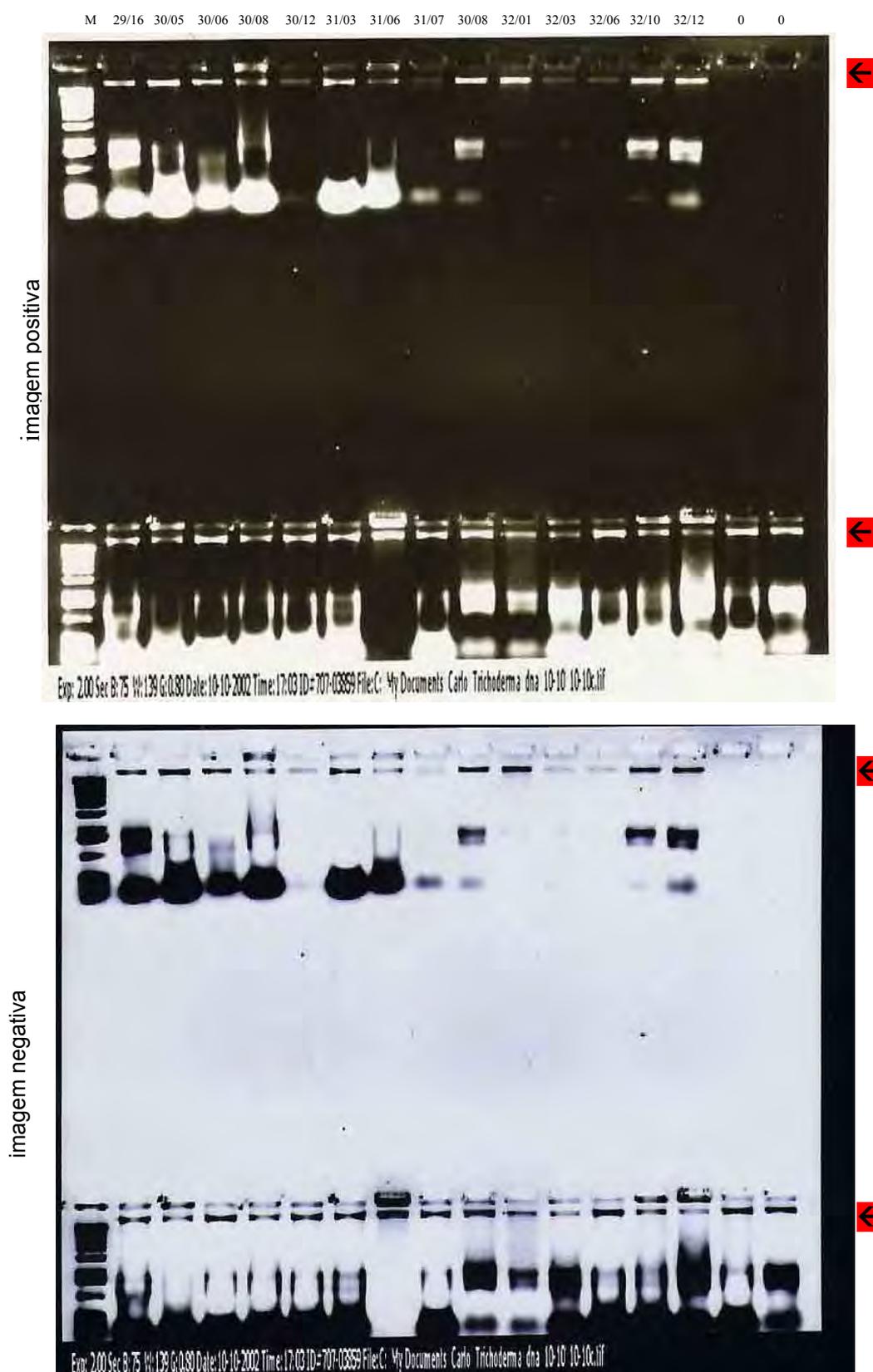


Figura 9 – Resultado da extração de DNA de 30 isolados obtida através do protocolo descrito por Cennis(1992) (setas indicam banda relativa ao DNA genômico)

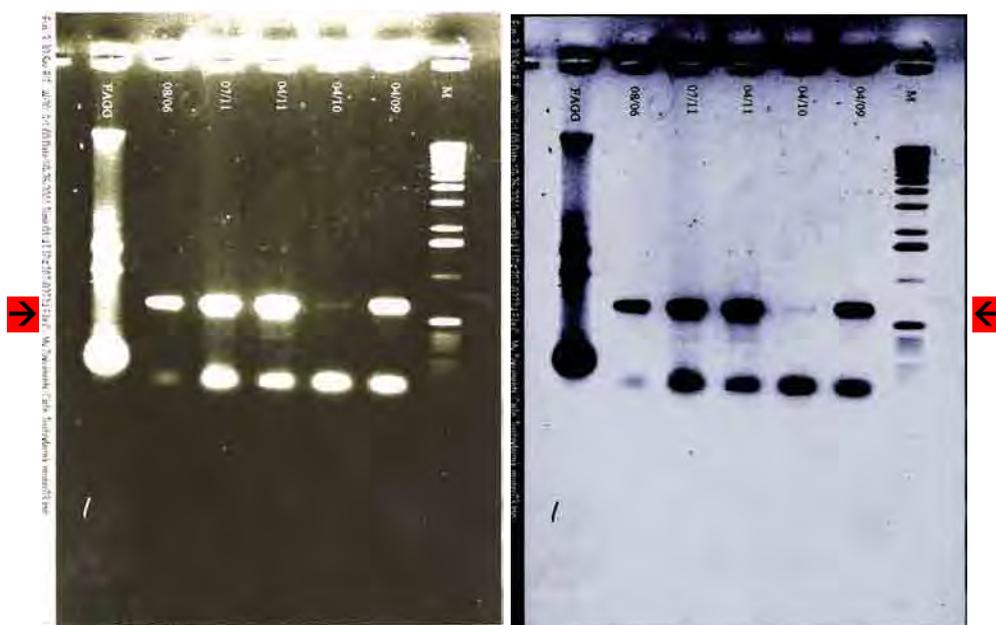


Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose evidenciando os *amplicons* obtidos de 5 amostras de DNA (IB-04/09; IB-04/10; IB-04/11; IB-07/11 e IB-08/06) utilizando-se os iniciadores *ITS1* e *ITS4*

Em alguns casos foram observadas discrepâncias entre as seqüências obtidas pelo dois sentidos de leitura (senso e anti-senso). Seria esperada uma variação pequena entre as duas leituras, ou nula numa condição ideal, entretanto, na prática, isso nem sempre ocorre. Problemas relacionados aos iniciadores *ITS* (qualidade e eficiência), condições de termociclagem (*PCR* de sequenciamento), eficiência na purificação, ou mesmo erros de leitura do seqüenciador, são apontados como os principais responsáveis por essa divergência.

Tabela 21 – Seqüências com maior *score* e menor *e-value* obtidas a partir da comparação no *GenBank*, pelo programa BLASTN (Altschul al., 1997) dos isolados da coleta 13 (F=*forward*, R=*reverse*, 1=repetição do seqüenciamento)

Coleta	Isolado	Sentido	BLASTN	Score	e-value
IB-13	05	F	qi 32394940 gb AY154954.1 Trichoderma spirale Ir. 291 D 18...	1045	0.0
		F1	qi 32394940 gb AY154954.1 Trichoderma spirale Ir. 291 D 18...	1045	0.0
		R	qi 32394940 gb AY154954.1 Trichoderma spirale Ir. 291 D 18...	872	0.0
		R1	qi 32394940 gb AY154954.1 Trichoderma spirale Ir. 291 D 18...	890	0.0
	08	R	qi 32394940 gb AY154954.1 Trichoderma spirale Ir. 291 D 18...	1013	0.0
		10	F	qi 22086335 gb AF400262.1 Trichoderma spirale strain CBS 3...	254
	R		qi 32394934 gb AY154948.1 Trichoderma harzianum Ir. 561 18...	969	0.0
	12	F	qi 22086335 gb AF400262.1 Trichoderma spirale strain CBS 3...	254	2e-64
R		qi 32394940 gb AY154954.1 Trichoderma spirale Ir. 291 D 18...	900	0.0	

Na Tabela 21 são apresentados algumas situações típicas ocorridas durante a análise, no caso, da coleta 13.

O primeiro seqüenciamento da amostra IB-13/05 (feito em duplicata) mostra *scores* idênticos para a leitura no sentido senso e ligeiramente diferentes para o sentido anti-senso (872 x 890). Nesse caso as diferenças entre os *scores* não determinou o resgate de diferentes seqüências, logo uma seqüência de consenso não aumentaria a resolução da análise de similaridade. A diferença de score entre as respostas pode ser considerada como não significativa. Considerando o isolado IB-13/08, embora tenha falhado a leitura reversa, a leitura feita em apenas um sentido apresenta boa confiabilidade pelo *score* obtido e o *e-value* igual a zero, comparativamente aos outros isolados. O caso em seguida (IB-13/12), constitui um exemplo de erro de leitura (motivos diversos) identificado pela nítida diferença entre os resultados, acarretando no resgate de seqüência de outra espécie (*T. spirale*).

Tabela 22 – Resultados das seqüências IB-16/01 (31), IB-16/04 (32), IB-16-05 (33) e IB-16/08 (34), submetidas para análise de similaridade no *GenBank* pelo programa BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997) (F=*forward*, R=*reverse*, l=*repetição*)

Coleta	Isol.	No.	Leitura	BLASTN	Score	e-value
IB-16	01	031	F1	gi 27448758 gb AF443913.1 Trichoderma harzianum G.J.S. 00-...	1055	0.0
	04	032	F	gi 27448757 gb AF443912.1 Trichoderma harzianum G.J.S. 00-...	1053	0.0
	05	033	R	gi 19880065 gb AF359265.1 Trichoderma aureoviride strain T...	920	0.0
	08	034	F	gi 19880144 gb AF362101.1 Trichoderma inhamatum strain KAC...	1061	0.0

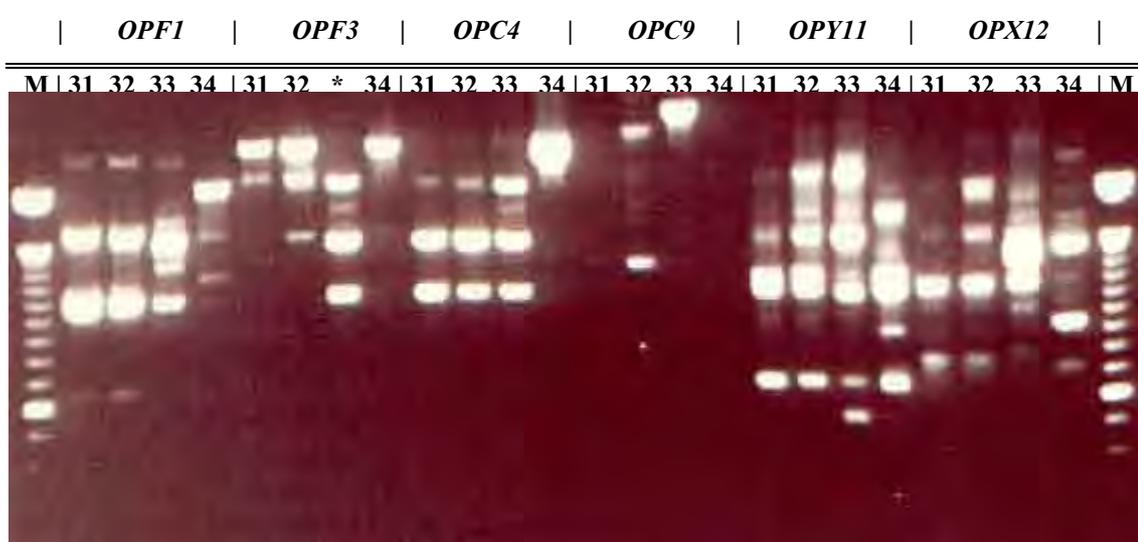
5.7.4 Utilização de Marcadores RAPD na Triagem de Isolados

As amostras submetidas aos diferentes iniciadores apresentaram perfis eletroforéticos distintos. A Figura 11 mostra foto do gel de agarose com os amplicons gerados, corados com brometo de etídio.

O iniciador OPC-9 não gerou fragmentos nas amostras 33 (IB-16/05), 31 (IB-16/01), e 34 (IB-16/08), enquanto o iniciador OPC-4 falhou apenas nesta última amostra. A amostra marcada com asterisco corresponde à 33 (iniciador OPC-4), aplicada erroneamente na seqüência do iniciador OPF-3, a qual não foi retirada da foto para evitar edição da imagem.

No ensaio realizado, e nas condições utilizadas (protocolo de amplificação, balanço de reagentes, amostras utilizadas) as amostras IB-16/01 (31) e IB-16/04 (32) originaram perfis idênticos com os iniciadores funcionais. Isso foi comprovado pela análise das seqüências no *GenBank* (programa BLASTN), onde foi recuperada uma mesma seqüência com *scores* semelhantes, como pode ser visto na Tabela 23.

Figura 11 – Gel de agarose mostrando os produtos da amplificação das amostras **31** (IB-16/01); **32** (IB-16/04); **33** (IB-16/05); **34** (IB-16/08) com os iniciadores universais OPF-1 e 3; OPC-4 e 9; OPY-11; e OPX-12 (* = OPC4, M=marcador molecular 100kb)



Estes dados indicam que as amostras são idênticas, embora tenham sido isoladas como sendo provenientes de populações diferentes. Outro fato que corrobora essa observação é a análise da atividade celulolítica dos dois isolados em questão. Na Tabela 24 pode-se ver a grande semelhança de resposta dos mesmos.

A variação na intensidade das bandas, apresentadas pelas amostras 31 e 32, observadas nas amplificações obtidas com os iniciadores OPF-3, OPY-11 e OPX-12 refletem variações decorrentes de homogeneização da amostra durante sua aplicação no gel. O gel de agarose poderia ser submetido em solução de brometo de etídio para melhorar sua visualização entretanto, este recurso poderia prejudicar a análise dos outros perfis. Além disso, a foto, por limitações do próprio recurso de impressão, nem

sempre evidencia claramente bandas fracas as quais no computador se apresentam-se mais nítidas.

Tabela 23 – Atividade celulolítica dos isolados IB-16/01 e IB-16/04 (1ª. avaliação, IB-11 = linhagem referência)

1ª. LEITURA																						
Código	Diâmetro Colônia (mm)									Diâmetro Total (mm)									Halo Degr.			
	1			2			3			x	1			2			3			y	x-y	%IB11
IB-11	16	16	17	16	16	16	16	16	16	16,1	34	34	34	35	35	35	35	36	35	34,8	18,7	100,0
IB-16/01	30	30	30	30	30	30	29	29	29	29,7	39	38	39	39	39	39	38	38	39	38,7	9,0	48,1
IB-16/04	29	29	30	30	30	30	30	30	30	29,8	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39,0	9,2	49,3

A utilização de iniciadores arbitrários do tipo RAPD tem se mostrado eficiente comprovadamente para interpretar diversas situações biológicas (CORABI-ADELL, 1999). A utilização desta técnica para identificação de isolados duplicados foi inicialmente descrita por Fujimori & Okuda (1993) que selecionaram o iniciador R28 (5'-ATGGATCCCCGC) e determinaram condições adequadas de termociclagem para fins de triagem de linhagens. Em 1994, Zimand et al., também obtiveram êxito em discriminar linhagens idênticas de 3 agregados de espécies: *T. harzianum*, *T. viride* e *T. hamatum*. Okuda et al. (1994) além de obterem resultados semelhantes na eliminação de linhagens redundantes (geneticamente iguais), associaram a técnica de RAPD com centrifugação em gradiente de Percoll para separar conídios de espécies diferentes aumentando, assim, a eficiência de isolamento.

Posteriormente, Arisan-Atac et al. (1995), analisando também a similaridade genética entre as linhagens e espécies de *Trichoderma*, foi capaz de identificar e selecionar subgrupos de *T. viride* com atividade contra o fitopatógeno *Cryphonectria parasitica*, agente causal do míldio da castanheira, entretanto, Góes et al. (2002), não observaram relação aparente entre o perfil de RAPD e o antagonismo a *Rhizoctonia solani*, o que indica não ser possível uma generalização no caso de uma seleção para estudos de biocontrole.

Os resultados obtidos nos ensaios com os isolados da amostra IB-16, em relação à identificação e caracterização de linhagens, corroboram com estes autores, indicando um uso aplicado bastante útil. Sua utilização, além de redução de mão-de-obra e insumos, pode aumentar a eficiência de um processo de seleção, uma vez que, potencialmente, pode eliminar linhagens duplicadas. Ensaios complementares poderão,

no futuro, identificar iniciadores mais eficientes na direção da seleção desejada e, até mesmo propiciar a elaboração de *kits* de procedimento rápido, específicos para *Trichoderma*.

A técnica de RAPD, embora venha sendo intensamente utilizada como ferramenta eficiente em diferentes aplicações, como qualquer técnica, apresenta certas limitações, as quais devem ser ponderadas antes de seu uso. Esta análise foge ao escopo do presente estudo, entretanto, se faz necessário citar pelo menos um trabalho a título de exemplo e também por ser o alvo do estudo a seção *Longibrachiatum*. Turner et al. (1997), trabalhando com 145 isolados desta seção, provenientes de diferentes regiões do mundo, fizeram diversas inferências sobre a biogeografia e variabilidade “fenotípica” do grupo. Um dos pontos principais que se questiona é que se não se conhece bem a variabilidade genotípica das referidas espécies, a proposição de uma explicação sobre sua distribuição, fundamentada em 4 oligonucleotídeos (M13, [GTC]₅, [GACA]₄, e V5), parece ser prematura. No atual estágio de conhecimento, onde se discute até mesmo o conceito de espécie dentro do gênero *Trichoderma* (cf. GAMS & MEYER, 1998, SAMUELS. 1996; KULLNIG et al., 2001) ou mesmo a extensão de validade dos caracteres morfológicos em grupos taxonômicos complexos (BAKER & GATESY, 2002), talvez o foco mais importante seria centrar-se na compreensão do mecanismo das relações morfologia x função x genótipo. Propõe-se, portanto, como sendo uma das questões iniciais fundamentais, um estudo mais aprofundado sobre a plasticidade fenotípica e suas interações com o meio circundante (comentada anteriormente).

Olhando-se por esse prisma, é nítido entender como os estudos que não atentam para esse ponto, vão sendo multiplicados sem que pontos fundamentais, portanto basais para a construção de uma hipótese, sejam devidamente aprofundados. Assim, vários resultados são gerados, que nem sempre podem ser integrados a outros dados (cruzamento de informações).

5.8 Análise Taxonômica

5.8.1 Análise Taxonômica a partir de Dados Moleculares

As espécies identificadas pela identidade genômica da região ITS1-5,8S-ITS2 são relacionadas na Tabela 21, e suas respectivas seqüências (estado original) encontram-se depositadas no Instituto Biológico juntamente com os registros de coleta.

O procedimento de identificação, através de consulta informatizada, tem se mostrado bastante eficiente, prático e rápido do ponto de vista operacional. Entretanto, como ferramenta para esclarecer fenômenos biológicos, deve ser considerado com muita cautela.

A caracterização taxonômica, a partir de dados moleculares apresenta algumas restrições tornando sua análise relativamente complexa. O mecanismo de busca do programa BLASTN, que opera integrado ao *GenBank* e faz sua análise mediante algoritmos de similaridade, é um sistema dinâmico e integrado, dependente dos dados inseridos como conjunto. Desse modo, alguns pontos devem ser evidenciados e considerados na análise dos dados obtidos:

1) a relação entre os caracteres morfológicos e os caracteres moleculares ainda não está inteiramente elucidada. Apesar da existência de certas regiões gênicas informacionais e correlacionadas com determinadas expressões fenotípicas, portanto taxonômicamente relevantes, estas regiões ou genes podem estar atuando de modo dependente, sofrendo efeitos de mecanismos regulatórios paralelos e não conhecidos (ou não associados). Assim, sob certas circunstâncias de interação a determinada seqüência ou gene pode apresentar correlação positiva temporária com o caracter estudado, originando inferências plausíveis tecnicamente mas não constantes.

2) No caso de regiões muito conservadas, como aquela utilizada, a questão levantada é até que ponto a baixa variabilidade pode se traduzir numa divergência que, correlacionada com sua morfologia, que permita o agrupamento em classes distintas;

3) A caracterização das diversas classes biológica ainda é um ponto debatido intensa e extensivamente no meio acadêmico. O próprio conceito de espécie vem sendo

questionado à luz, não somente da relação morfológica x molecular, como também morfológica x funcional.

4) Em termos operacionais o *GenBank*, se por um lado apresenta a vantagem de operar abertamente, por outro os materiais depositados provenientes de diferentes partes do mundo, não recebem qualquer tipo de conferência teórica (apenas o preenchimento de questionário de parâmetros mínimos para viabilizar o depósito). As informações são incluídas, portanto, no banco de dados e colocados na rede, segundo informação do próprio autor o qual se responsabiliza por sua eventual atualização e/ou correção.

Como o critério de análise do BLASTN é feito por comparação em conjunto, de todas as seqüências depositadas, fica claro que qualquer depósito, tenha sido sua identificação *a priori* adequada ou não, provocará um novo balanceamento em todo o sistema. Assim, esse novo balanceamento poderá trazer conseqüências críticas nas análises seguintes, em casos até invalidando inferências anteriores.

5) Outra questão que se coloca, decorrente da anterior, é o caráter cumulativo e residual das seqüências que vão se depositadas. A ausência de um sistema de atualização dos dados submetidos, ou mesmo uma “limpeza”, futuramente poderá gerar diversas controvérsias.

6) Ainda sobre as seqüências depositadas, outro fator que pode influir no resultado da pesquisa é a prévia manipulação das seqüências durante a etapa de alinhamento (alteração da localização de bases e/ou *gaps*, corte de extremidades) eventualmente mascarando informações que poderiam ser fundamentais para a análise seja taxonômica ou filogenética. Esse item, bem como a qualidade do seqüenciamento, são fundamentais, pois poderão gerar identidades artificiais (escores e e-value distintos) (vide exemplos no Anexo 4).

Isso pode ser crítico para espécies muito próximas como é o caso de *T. asperellum* e *T. harzianum*. No caso específico de *T. asperellum*, como sua descrição é recente (SAMUELS *et al.*, 1999), as seqüências depositadas até então podem corresponder a qualquer uma das duas (a julgar apenas pela sua identificação de submissão).

Portanto, as espécies descritas como entidades biológicas distintas (espécies), fundamentadas em caracteres morfológicos, molecularmente, pela região do DNA analisada, podem vir a ser consideradas como pertencentes à mesma espécie.

Pelos dados obtidos isso não parece ser uma regra para todas as espécies identificadas. Espécies como *T. stromaticum* e *T. longibrachiatum* foram identificadas com relativa precisão, enquanto outras como *T. album*; *T. citrinoviride*; *T. erinaceum*, *T. ghanense*, e *T. saturnisporum* precisam ser melhor estudadas.

Sobre as seqüências depositadas no *GenBank*, também é importante considerar que nem todas as espécies citadas foram descritas até a presente data. Várias delas, como por exemplo *Trichoderma rossicum*, *T. taiwanense*, *T. strigosum*, *T. virgatum*, *T. effusum* e outras, ainda não tiveram suas descrições publicadas (trabalhos não publicados, ou submetidos), portanto ainda não podem ser consideradas como espécies válidas pela comunidade acadêmica.

No Anexo 6, são relacionadas as “espécies” (sic) que possuem seqüências depositadas no *GenBank* e outras relações de espécies consideradas válidas por autores diferentes. Pode ser constatado que várias espécies não possuem exemplares (seqüências) depositados como é o caso, por exemplo de *T. polysporum*.

Em relação à técnicas moleculares mais específicas a metodologia de RAPD pode ser uma alternativa interessante na identificação de espécies, entretanto maiores estudos devem ser feitos para a obtenção de iniciadores (ou grupos) eficientes. Conforme observou Zimand *et al.* (1994), embora a técnica tenha sido adequada na distinção de isolados da mesma espécie, no caso de *T. harzianum*, obtiveram perfis idênticos entre 23 isolados. É importante ressaltar que *T. harzianum* constitui um caso atípico dentro do gênero, uma vez que se trata de uma espécie variável tanto morfológica como geneticamente. Este fato levou alguns autores a sugerirem o envolvimento de mais de uma espécie (GRONDONA *et al.*, 1997). Estudos mais recentes, a partir de resultados combinados do seqüenciamento de 4 genes (CHAVERRI *et al.*, 2003b), demonstraram que *T. harzianum* trata-se, na verdade, de um complexo de espécies que inclui linhagens filogenéticas crípticas morfológicas e biológicas, apresentando até mesmo número de cromossomos diferentes em alguns casos (SAMUELS, 2004).

No caso de diferenciação de espécies muito próximas (ou mesmo linhagens) outros recursos poderiam utilizados como a análise através de RFLP desta região (GAMS & MEYER, 1998) ou ARDRA (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*) (ACINAS et al., 1997). A técnica de ARDRA, entretanto, para poder ser utilizada, deve-se ter em conta a variação intra-gênica na análise dos resultados. A opção mais indicada, que poderia ser testada futuramente é a RISA (*rDNA internal spacer analysis*, GARCÍA-MARTINEZ et al., 1999) que utiliza os espaçadores intergênicos, os quais apresentam regiões hipervariáveis que são bastante úteis na discriminação fina de OTUs (unidades taxonômicas operacionais).

No caso do complexo *Trichoderma*, como estas técnicas ainda não foram testadas, é prematuro e difícil prever se poderão auxiliar de algum modo na sua elucidação, dada a artificialidade da classificação atual.

5.8.2 Análise Taxonômica Numérica

5.8.2.1 Análise de Agrupamento

A matriz de similaridade a partir dos dados morfológicos das 25 OTUs analisadas é apresentada na Tabela 25, enquanto a Figura 12 mostra o fenograma originado pelo método do pareamento igualmente ponderado (UPGMA) utilizando o recurso Find (incluído no pacote SAHN) nas resolução das dicotomias.

A proximidade entre a matriz de similaridade e a matriz cofenética, obtida para os níveis de distância entre cada amostra no gráfico, foi verificada através do coeficiente de correlação entre elas. Obteve-se uma correlação (índice cofenético) de 0,85449, mostrando uma boa representação da matriz de similaridade pelo fenograma.

No fenograma obtido são apresentados apenas os valores de Bootstrap acima de 50% obtidos a partir de 2000 amostragens (programa WinBoot, YAP & NELSON, 1996).

Pode ser observado um agrupamento formado por *T. harzianum* (HZ), *T. aggressivum* (AG) e *T. atroviride* (AT). A proximidade de *T. aggressivum* é explicada por

ser uma espécie muito próxima a *T. harzianum*, tendo sido recentemente descrita por Samuels et al. (2002).

Em relação a *T. atroviride* (AT), Ospina-Giraldo et al. (1998), analisando a região ITS1, 5,8S e ITS2 de linhagens de *T. harzianum* concluíram que pelo menos uma delas (Th3) deveria ser considerada como *T. atroviride* (ambas da mesma seção *Trichoderma*) pela identidade gênica observada.

É importante considerar que as 3 espécies apresentam aspectos fisiológicos diferenciados, embora morfologicamente estejam bastante relacionadas, como demonstra o fenograma obtido. *T. agressivum* (AG), apresenta um desenvolvimento fraco a 35°C, enquanto *T. harzianum* (HZ) desenvolve-se e esporula muito bem nessa temperatura. *T. atroviride* embora usualmente esteja associado à doença conhecida como “mofo verde” dos cogumelos comestíveis, é na verdade uma espécie sapróbia, não causando problemas dessa natureza (SAMUELS et al., 2002). A espécie reconhecida atualmente como responsável pela doença é a espécie *T. agressivum*.

A análise pelo método NJ (Figura 13) apresenta o mesmo agrupamento formado mostrando que as 3 espécies são próximas filogeneticamente, confirmando, nesse caso, a não correspondência da morfologia com os aspectos fisiológicos mencionados. Estes dados confirmam indícios anteriores que a espécie *T. harzianum*, trata-se na verdade de um complexo de espécies (SAMUELS, 2004).

O agrupamento formado por *T. virens* (VN) e *T. fasciculatum* (FS), suportado por um índice de *bootstrap* de 100,0%, é explicado pela grande afinidade entre as duas espécies, e praticamente nenhuma distinção morfológica expressiva, considerando a chave taxonômica utilizada para o estudo (SAMUELS, 2004). Junto com *T. strictipile* (ST), originaram um agrupamento bastante robusto (88,3%), uma vez que as 3 espécies são incluídas na seção *Pachybasium*. Em termos filogenéticos esse afastamento também foi observado na árvore obtida pelo método NJ (vide Figura 13). Esta seção parece ser a que apresenta uma definição morfológica mais consistente em relação às seções *Trichoderma* e *Longibrachiatum*, uma vez que as espécies *T. fertile* (FE), *T. minutisporum* (MT), *T. tomentosum* (TO), *T. hamatum* (HA), *T. oblongisporum* (OB), *T. pubescens* (PB), *T. spirale* (SP), *T. polysporum* (PL), constituíram um nítido agrupamento. A espécie *T. erinaceum* (ER), embora incluída na seção *Trichoderma* (ver

BISSET et al., 2003), mostrou-se disposta neste ramo, evidenciando uma proximidade morfológica maior com aquela seção. Caso semelhante ocorreu com *T. saturnisporum* (SA) em relação à seção *Longibrachiatum*.

O agrupamento, relativamente consistente (69,8%), formado por *T. strigosum* (SG) e *T. koningii* (KG), não pode ser explicado em termos morfológicos, uma vez que pertencem a seções distintas – *Pachybasium* e *Trichoderma*, respectivamente. Entretanto, Lieckfeldt et al. (1998), através de análise filogenética, indicaram uma proximidade muito grande desta espécie (SG) com *T. atroviride* e *T. viride*, ambos da seção *Trichoderma*, o que poderia explicar a aproximação observada no fenograma.

A espécie *T. stromaticum* (SR), recentemente descrita (SAMUELS et al., 2000) e destacada pela sua atividade antagônica ao patógeno causador da doença vassoura de bruxa (*witches broom*) no cacauero, não apresenta uma definição clara quanto à seção que pertence (*Trichoderma* ou *Pachybasium*), segundo a descrição do autor. Pelo método de similaridade utilizado esta espécie insere-se mais adequadamente na seção *Pachybasium*. Do ponto de vista filogenético, esta espécie também se posiciona nesta seção, num ramo bastante definido (vide Figura 13).

Num enfoque geral, das seções consideradas no estudo, as seções *Trichoderma* e *Longibrachiatum*, mostraram uma interpenetração maior de caracteres morfológicos do que *Pachybasium*. Nesta seção, o posicionamento conjunto de espécies, mostra uma certa consistência e estabilidade, confirmadas pela árvore apresentada na Figura 13.

A análise dos coeficientes de similaridade (ver matriz de similaridade, Tabela 25) revelou uma faixa de variação de 13,3 a 100,0% entre as espécies amostradas. O índice mais alto foi obtido entre as amostras *T. virens* (VN) e *T. fasciculatum* (FS) demonstrando a impossibilidade de diferenciá-los com base apenas em suas características morfológicas. A similaridades entre *T. agressivum* (AG) e *T. harzianum* (HZ) – 63,4%, e entre *T. harzianum* e *T. atroviride* (AT) – 60,5% pode ser abaixo do esperado, uma vez que se trata de um complexo específico, conforme mencionado anteriormente. Se por um lado essa faixa de similaridade pode ser decorrente do coeficiente utilizado (Dice), pode também ser atribuída à própria limitação dos caracteres utilizados em traduzir as relações taxonômicas entre as espécies.

	AG	AS	AT	CT	ER	FS	FE	GH	HA	HZ	KG	LB	MT	OB	PL	PK	PB	SA	SP	ST	SG	SR	TO	VN	VR
AG	1,0000																								
AS	0,3810	1,0000																							
AT	0,6190	0,4545	1,0000																						
CT	0,5714	0,5000	0,5909	1,0000																					
ER	0,2791	0,2667	0,4444	0,3556	1,0000																				
FS	0,2727	0,3913	0,3478	0,3478	0,2553	1,0000																			
FE	0,4878	0,3721	0,3256	0,3256	0,4091	0,2667	1,0000																		
GH	0,4103	0,3415	0,3415	0,4390	0,2857	0,2791	0,4000	1,0000																	
HA	0,5714	0,2727	0,4545	0,3636	0,4444	0,2609	0,4186	0,3902	1,0000																
HZ	0,6341	0,3721	0,6047	0,5116	0,3636	0,5333	0,4286	0,5000	0,4651	1,0000															
KG	0,3500	0,4286	0,4762	0,5238	0,4186	0,2727	0,3415	0,5641	0,5238	0,4878	1,0000														
LB	0,4186	0,3556	0,4444	0,6667	0,3478	0,3404	0,2273	0,3333	0,4000	0,4091	0,6047	1,0000													
MT	0,6341	0,3721	0,5681	0,4651	0,4091	0,2667	0,6190	0,4000	0,6047	0,4762	0,3902	0,3636	1,0000												
OB	0,4878	0,1860	0,2791	0,3721	0,3636	0,1333	0,5238	0,3000	0,6977	0,2857	0,4878	0,3636	0,4286	1,0000											
PL	0,4878	0,2791	0,2791	0,4186	0,2727	0,1778	0,3810	0,2500	0,4651	0,3333	0,3415	0,3182	0,5238	0,5238	1,0000										
PK	0,5366	0,3256	0,4651	0,6512	0,3182	0,3111	0,2857	0,5500	0,4186	0,4762	0,5854	0,5909	0,3810	0,4286	0,4286	1,0000									
PB	0,5366	0,2791	0,3721	0,4545	0,2222	0,6190	0,4000	0,6512	0,3810	0,3902	0,3182	0,5238	0,7619	0,5238	0,4286	1,0000									
SA	0,4186	0,4000	0,4000	0,3556	0,4783	0,2553	0,4091	0,3810	0,5333	0,3636	0,3721	0,3913	0,4545	0,4545	0,4545	1,0000									
SP	0,4651	0,2667	0,3111	0,3111	0,4783	0,2553	0,4545	0,2857	0,6222	0,3636	0,4186	0,4348	0,5000	0,6818	0,6364	0,4091	0,6818	0,5652	1,0000						
ST	0,2791	0,3556	0,2222	0,3111	0,3478	0,6383	0,3636	0,2381	0,3556	0,3182	0,2791	0,3478	0,3182	0,3182	0,2273	0,2273	0,2727	0,3478	0,3043	1,0000					
SG	0,4286	0,4091	0,5909	0,4091	0,4889	0,2609	0,4651	0,4390	0,5455	0,5116	0,7143	0,4000	0,4186	0,4651	0,3256	0,5581	0,2667	0,4444	0,3111	0,3556	1,0000				
SR	0,2857	0,0909	0,0909	0,2273	0,4000	0,2174	0,5116	0,0916	0,4545	0,1860	0,2857	0,2667	0,1860	0,6047	0,3256	0,1860	0,5581	0,2667	0,4444	0,3111	0,3636	1,0000			
TO	0,3721	0,3556	0,3556	0,4444	0,4348	0,2979	0,5455	0,2857	0,4000	0,3636	0,2791	0,2174	0,5000	0,5000	0,4091	0,2727	0,5909	0,4348	0,5217	0,2609	0,3556	0,3111	1,0000		
VN	0,2727	0,3913	0,3478	0,3478	0,2553	1,0000	0,2667	0,2791	0,2609	0,5333	0,2727	0,3404	0,2667	0,1333	0,1778	0,3111	0,2222	0,2553	0,2553	0,6383	0,2609	0,2174	0,2979	1,0000	
VR	0,4390	0,3721	0,4651	0,3721	0,3182	0,3556	0,3333	0,4000	0,3721	0,3810	0,4390	0,4091	0,4286	0,3810	0,2857	0,4762	0,3810	0,4091	0,3636	0,2727	0,4651	0,1395	0,2727	0,3556	1,0000

Tabela 24 – Matriz de similaridade de 25 espécies de *Trichoderma* sp., obtida mediante aplicação do coeficiente de Dice (1945)

i	Eigenvalue	Percent	Cumulative
1	19.81532549	22.0170	22.0170
2	8.83597861	9.8176	31.8348
3	6.76480472	7.5164	39.3512
4	4.65070587	5.1675	44.5187
5	4.51368021	5.0152	49.5339
6	4.20914626	4.6768	54.2107
7	4.05124620	4.5014	58.7121
8	3.70033524	4.1115	62.8236
9	3.43611819	3.8179	66.6415
10	2.73705333	3.0412	69.6827
11	2.62148746	2.9128	72.5954
12	2.54489701	2.8277	75.4231
13	2.47315192	2.7479	78.1710
14	1.98767539	2.2085	80.3796
15	1.81647772	2.0188	82.3979
16	1.68421157	1.8713	84.2692
17	1.50046626	1.6672	85.9364
18	1.45783958	1.6198	87.5562
19	1.35421624	1.5047	89.0609
20	1.26339360	1.4038	90.4647
21	0.98369329	1.0930	91.5577
22	0.85155258	0.9462	92.5038
23	0.72630984	0.8070	93.3108
24	0.70086132	0.7787	94.0896
25	0.61849331	0.6872	94.7768
26	0.49739493	0.5527	95.3295
27	0.47988728	0.5332	95.8627
28	0.42315894	0.4702	96.3329
29	0.37932165	0.4215	96.7543
30	0.36456665	0.4051	97.1594
31	0.32328377	0.3592	97.5186
32	0.27656915	0.3073	97.8259
33	0.24994570	0.2777	98.1036
34	0.20544212	0.2283	98.3319
35	0.18457899	0.2051	98.5370
36	0.16149111	0.1794	98.7164
37	0.13879179	0.1542	98.8706
38	0.13089961	0.1454	99.0161
39	0.10876763	0.1209	99.1369
40	0.09772089	0.1086	99.2455
41	0.08517217	0.0946	99.3401
42	0.07757453	0.0862	99.4263
43	0.07004286	0.0778	99.5042
44	0.06222074	0.0691	99.5733
45	0.05260410	0.0584	99.6317
46	0.04503972	0.0500	99.6818
47	0.03968421	0.0441	99.7259
48	0.03601076	0.0400	99.7659
49	0.03419228	0.0380	99.8039
50	0.02883613	0.0265	99.8304
51	0.02052370	0.0226	99.8532
52	0.01656523	0.0206	99.8738
53	0.01662392	0.0185	99.8923
54	0.01382212	0.0154	99.9076
55	0.01204624	0.0134	99.9210
56	0.01121204	0.0125	99.9335
57	0.01018610	0.0113	99.9448
58	0.00710626	0.0079	99.9527
59	0.00669419	0.0074	99.9601
60	0.00584579	0.0066	99.9666
61	0.00505548	0.0056	99.9722
62	0.00435849	0.0048	99.9771
63	0.00345531	0.0038	99.9809
64	0.00286573	0.0032	99.9841
65	0.00234330	0.0026	99.9867
66	0.00223283	0.0025	99.9892
67	0.00176486	0.0020	99.9911
68	0.00153029	0.0017	99.9928
69	0.00125288	0.0014	99.9942
70	0.00112725	0.0013	99.9955
71	0.00078448	0.0009	99.9964
72	0.00066343	0.0007	99.9971
73	0.00056150	0.0006	99.9977
74	0.00045107	0.0005	99.9982
75	0.00042118	0.0006	99.9987
76	0.00037496	0.0004	99.9991
77	0.00028598	0.0003	99.9994
78	0.00018131	0.0002	99.9996
79	0.00014410	0.0002	99.9998
80	0.00007579	0.0001	99.9999
81	0.00005829	0.0001	99.9999
82	0.00003885	0.0000	100.0000
83	0.00001399	0.0000	100.0000
84	0.00000000	0.0000	100.0000
85	0.00000000	0.0000	100.0000
86	0.00000000	0.0000	100.0000
87	0.00000000	0.0000	100.0000
88	0.00000000	0.0000	100.0000
89	0.00000000	0.0000	100.0000
90	0.00000000	0.0000	100.0000

Sum of eigenvalues = 90.000000

Variáveis	Componentes		
	1	2	3
1	0.1221	0.0494	0.1792
2	0.5934	-0.1701	-0.2595
3	0.2122	-0.1103	0.3173
4	0.2903	-0.0212	0.2046
5	0.5201	-0.2752	-0.0516
6	0.2684	0.7394	-0.1399
7	0.1326	0.1101	0.2140
8	0.1223	-0.0776	-0.1070
9	0.5543	-0.0948	0.1307
10	0.7589	-0.0051	-0.0552
11	0.1033	0.0011	0.1929
12	0.4700	0.6567	-0.0911
13	0.5180	-0.2857	-0.3768
14	0.5127	-0.2128	0.2374
15	0.3087	-0.0629	0.1857
16	0.1342	-0.0809	-0.0457
17	-0.1920	-0.0427	0.3363
18	0.4899	-0.3189	-0.5393
19	0.6465	0.1430	0.2180
20	0.5586	-0.0111	0.2626
21	0.3716	-0.1673	-0.1030
22	0.8860	-0.3254	0.0229
23	0.3147	-0.1653	0.0863
24	0.4662	0.7284	0.0546
25	0.3750	0.8401	-0.1901
26	0.3105	-0.1968	-0.3498
27	0.5627	-0.2777	-0.3761
28	0.5035	-0.1462	0.4836
29	0.3345	-0.0364	0.4506
30	0.4384	-0.2218	-0.2965
31	0.6419	-0.3464	-0.0415
32	0.6038	0.4488	0.3235
33	0.4931	0.4414	0.1647
34	0.5315	-0.1993	-0.1935
35	0.5831	-0.3101	0.1395
36	0.2247	0.2426	0.0628
37	-0.1127	-0.1143	-0.1645
38	0.8537	-0.1056	-0.0494
39	0.1326	0.1101	0.2140
40	0.1033	0.0011	0.1929
41	0.2216	-0.0300	0.1021
42	0.8674	-0.0630	0.1271
43	0.1223	-0.0776	-0.1070
44	0.1416	-0.0808	-0.3059
45	0.3671	0.6086	-0.2751
46	0.7911	0.0939	0.3511
47	0.3171	-0.1465	-0.3257
48	0.3656	-0.2939	-0.4570
49	0.5221	-0.0950	-0.2047
50	0.7614	-0.2747	-0.2238
51	0.4929	0.5760	-0.3517
52	0.4281	0.7779	-0.1262
53	0.4806	-0.2966	-0.5391
54	0.4752	-0.2924	-0.1720
55	0.2218	-0.1039	0.2970
56	0.4417	-0.0889	0.5919
57	0.1326	0.1101	0.2140
58	0.5205	-0.3298	-0.4575
59	0.4198	-0.1589	-0.0678
60	0.4505	0.0311	0.2636
61	0.3354	-0.1297	0.3432
62	0.4028	0.6397	0.1262
63	0.4341	0.6801	-0.3430
64	0.8016	-0.3431	0.1591
65	0.2214	0.0348	0.0620
66	0.2245	-0.1044	0.1998
67	0.7811	-0.2868	0.1511
68	0.4798	0.5620	-0.3795
69	0.7025	0.2433	0.1909
70	0.3750	0.8401	-0.1901
71	0.2435	-0.1550	-0.2724
72	0.8130	-0.3088	0.1705
73	0.3052	-0.1474	0.2825
74	0.7520	0.0408	0.1773
75	0.4493	-0.0890	-0.3208
76	0.1416	-0.0808	-0.3059
77	0.4844	0.6700	-0.2343
78	0.6391	-0.3880	-0.3410
79	0.1409	-0.1048	-0.0327
80	0.4583	-0.1027	0.5835
81	0.2242	0.0038	0.3364
82	0.2431	-0.0926	-0.2257
83	0.6281	-0.2654	-0.4479
84	0.5313	0.3342	0.2156
85	0.4161	-0.0806	0.5556
86	0.1221	0.0494	0.1792
87	0.3025	-0.0931	0.4430
88	0.7308	0.0150	-0.0935
89	0.3081	-0.1662	0.2325
90	0.5860	0.2298	0.0453

Tabelas 25 e 26 – Análise de Componentes Principais – Autovalores (percentuais e acumulados, esquerda) e contribuição das 3 primeiras componentes (direita)

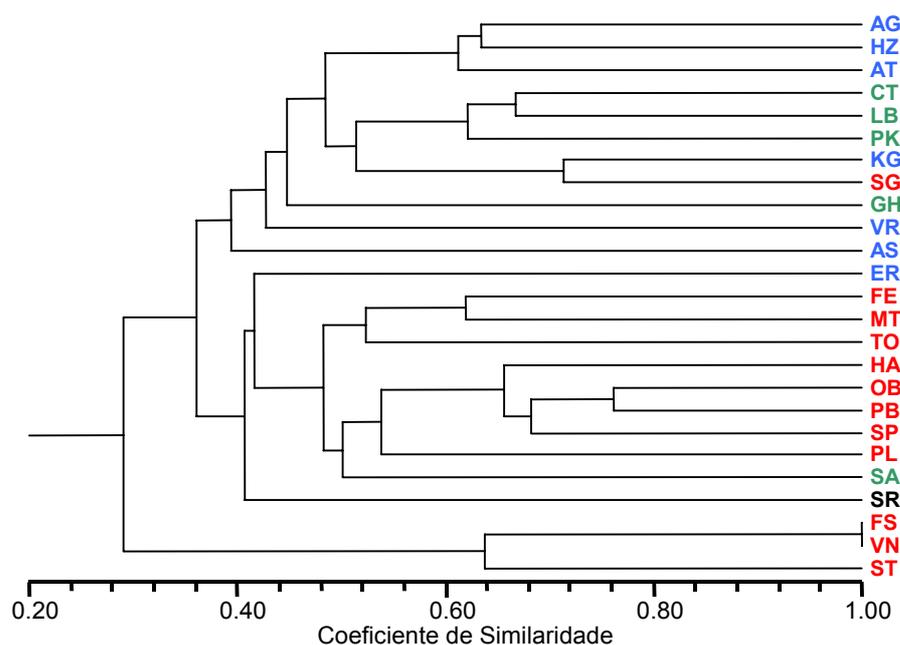


Figura 12 – Fenograma obtido pelo método UPGMA utilizando-se o coeficiente de DICE (1945) como medida de similaridade (azul= *S. Trichoderma*; vermelho=*S. Pachybasium*, verde= *S. Longibrachiatum*)

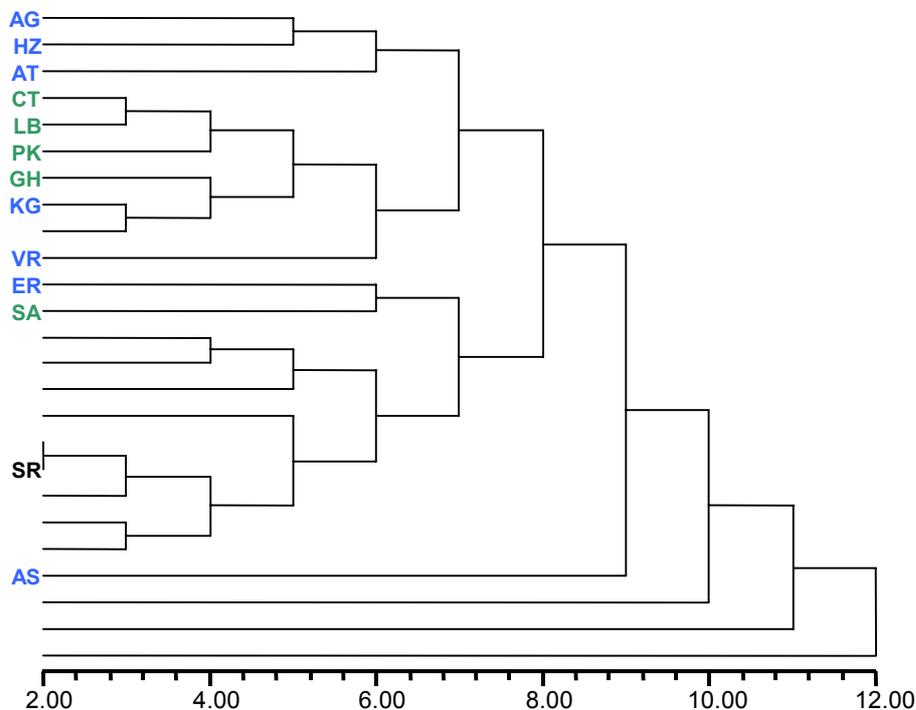


Figura 13 – Árvore obtida pelo método *Neighbor-joining* tendo como grupo externo *Trichoderma virens* (VN) com as Seções discriminadas através de cores (vide Fig. 12)

Em relação à consistência das seções, em termos de similaridade fenotípica, o maior valor observado (71,4%) ocorreu entre *T. koningii* (KG) e *T. strigosum* (SG), ambos pertencentes às seções *Trichoderma* e *Pachybasium*, respectivamente.

Entretanto, considerando a análise filogenética feita por Lieckfeld et al. (1998), este resultado apresenta relativa coerência. Neste trabalho a autora evidenciou uma relação muito próxima de *T. strigosum* com *T. atroviride* (AT) e *T. viride* (VR), estes últimos incluídos na seção *Trichoderma*.

Este pode ser considerado mais um caso exemplar o qual a análise exclusivamente morfológica se mostra insuficiente para explicar a divergência observada, exigindo outros tipos de parâmetros complementares para uma análise integrada.

Os maiores valores em seguida (69,8% e 68,2%) referentes às espécies *T. hamatum* (HA) x *T. oblongisporum* (OB) e *T. pubescens* (PB) x *T. spirale* (SP), respectivamente, apresentaram resultados coerentes, uma vez que todos se incluem na seção *Pachybasium*.

A árvore obtida pelo método de NJ é apresentada na Figura 13, dispondo *Trichoderma virens* como grupo externo em função de sua acentuada divergência morfológica em relação ao conjunto.

É importante considerar que este método, embora desenvolvido para a construção de árvores filogenéticas baseadas no princípio da parcimônia, não busca necessariamente a menor árvore possível (menor número de passos), mas sim aquela que traduz mais fielmente a filogenia do grupo analisado. Em diversos casos esse método tem resultado em árvores mais precisas que aquele utilizando somente a parcimônia (ver KIM et al., 1992).

5.8.2.2 Análise de Ordenação

Para complementar a análise de agrupamento (*cluster analysis*) foi feita a análise de coordenadas principais para a correspondência de dados ou existência de algum padrão no espaço multidimensional. A matriz de similaridade foi gerada utilizando-se o

coeficiente de Dice (1945) em seguida calculando os autovetores para a geração do gráficos bi e tridimensionais. Os resultados são apresentados nas Figuras 14 e 15.

A Figuras 16 e 17, apresentam as espécies plotadas em diferentes ângulos (topo e lateral-perpendicular) rotuladas com cores conforme a seção a que pertencem. De maneira geral observa-se um padrão de distribuição semelhante aquele visualizado no fenograma da análise de agrupamento. A seção *Pachybasium* parece formar um agrupamento mais consistente em relação às demais. Aparentemente, pela vista lateral, observa-se um forte indício de agrupamento formado pela seção *Trichoderma*. Ressalta-se que a análise tão somente de agrupamento, não teria permitido elaborar esta hipótese, mascarando um eventual indício de conexão entres as espécies dessa seção. Não se descarta, entretanto, a possibilidade de tratar-se de um artifício de técnica, daí a necessidade de outras análises como por exemplo moleculares para dar mais subsídios à interpretação. O afastamento de espécies como *T. virens* (VN) e *T. fasciculatum* (FS), *T. strictipile* (ST) e *T. stromaticum* (SR). Esta última espécie, da mesma forma que na outra análise, não mostrou tendência de afinidade com nenhuma das 3 seções. Este fato merece um estudo mais aprofundado uma vez que esta ausência de uma nítida afinidade com as seções, pode estar traduzindo um conjunto inédito de caracteres, podendo ser uma espécie chave para a compreensão do grupo.

O afastamento conjunto apresentado pelas espécies VN e FS pode ser facilmente explicado pela morfologia bastante típica (*Gliocladium-like*) destas duas espécies afins.

A análise de componentes principais (ACP) foi o o outro método de ordenação selecionado no intuito de identificar os principais descritores que participariam de modo mais determinante na caracterização de uma dada espécie. Uma vez que a plasticidade fenotípica do gênero *Trichoderma* é evidente, supõe-se que, uma vez identificadas as principais variáveis morfológicas, seus respectivos espectros de variação e possíveis interdependências, poderia se estabelecer um padrão de distribuição dessas variáveis de modo a formar um critério mais objetivo na descrição de uma espécie. Isso poderia ser útil mesmo numa análise do tipo polifásica, na qual outros dados (moleculares, fisiológicos etc.) poderiam ser analisados de maneira combinada.

Esta técnica, por reduzir o número de variáveis originais, gerando novas variáveis mais informativas, tem permitido, de modo recorrente na literatura, definir

agrupamentos com grande precisão. Em última análise, as componentes principais obtidas (funções ortogonais empíricas), representam a variância total dos dados, sendo que os primeiros eixos, sobre os quais serão ordenados as amostras, representam a maior parte da variação dos dados.

Pela Tabela 26 verifica-se que as duas primeiras componentes principais explicam cerca de 31,8% da variabilidade total.

Foi considerado como uma contribuição alta aquelas superiores ao valor 0,60. Este valor de referência foi estimado em função da amplitude e do teto máximo de contribuição obtido (0,8537). As maiores contribuições para a primeira componente principal (CP1) foram dadas por 17 variáveis: 10, 19, 22, 31, 32, 38, 42, 46, 50, 64, 67, 69, 72, 74, 78, 83 e 88, enquanto para a segunda componente principal (CP2) por 9 variáveis: 6, 12, 24, 25, 45, 52, 62, 70 e 77 (ver Tabela 27).

O Quadro 12 sumariza os principais descritores associando-os às respectivas componentes e a Figura 18 apresenta o gráfico de dispersão das componentes principais 1 (CP1) e 2 (CP2) em plotagem bidimensional.

Embora tenha sido identificada uma participação relativamente alta de vários descritores, responsáveis pelos posicionamentos das espécies no conjunto, o baixo percentual de variabilidade, atribuído aos mesmos demonstra a insuficiência destas variáveis, por si só, na caracterização das espécies.

Apesar disso, os resultados obtidos evidenciam que são caracteres informacionais confiáveis e podem ser utilizados complementarmente e conjuntamente com outras análises comparativas para fins taxonômicos. Estudos mais minuciosos em relação à plasticidade morfológica deverão ser feitos futuramente no sentido de definir com maior precisão as classes de cada caractere melhorando sua eficiência como descritor.

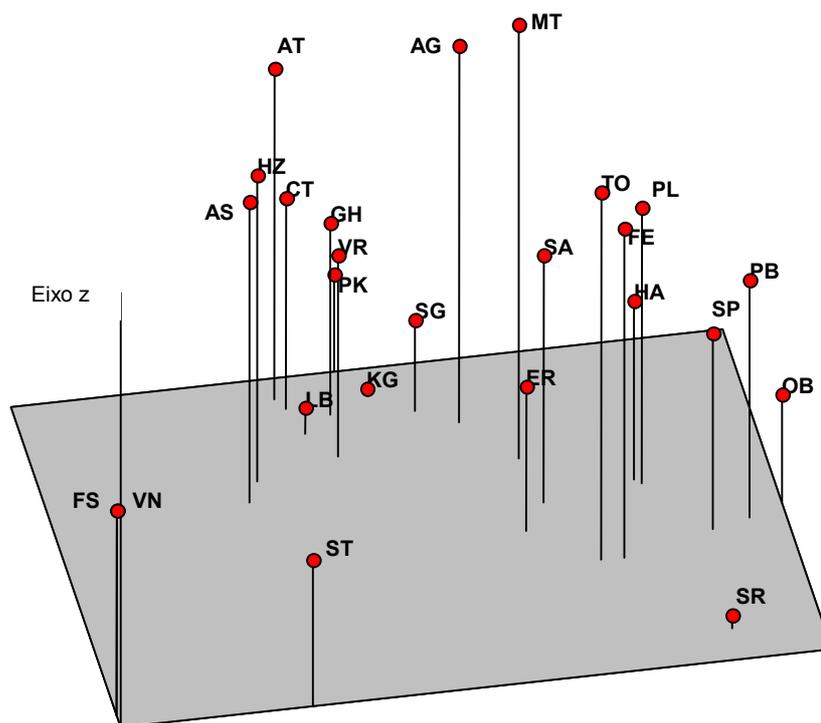


Figura 14 – Análise de coordenadas principais – Plotagem tridimensional das amostras a partir de autovetores obtidos pela matriz de similaridade

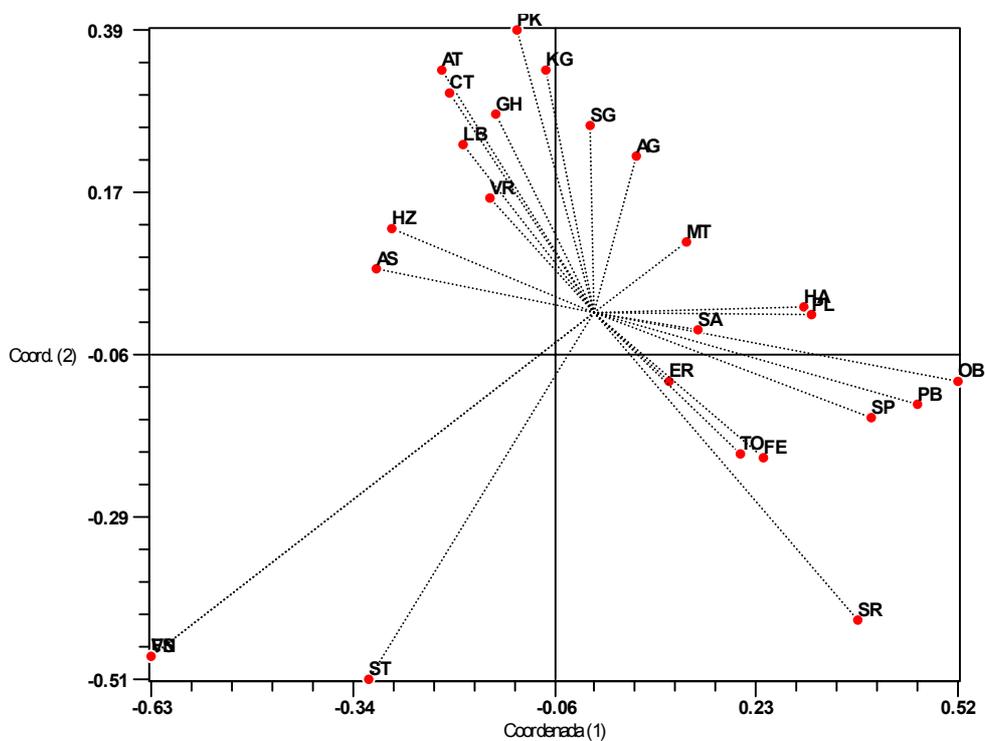


Figura 15 – Análise de coordenadas principais – Plotagem bidimensional das amostras a partir de autovetores obtidos pela matriz de similaridade

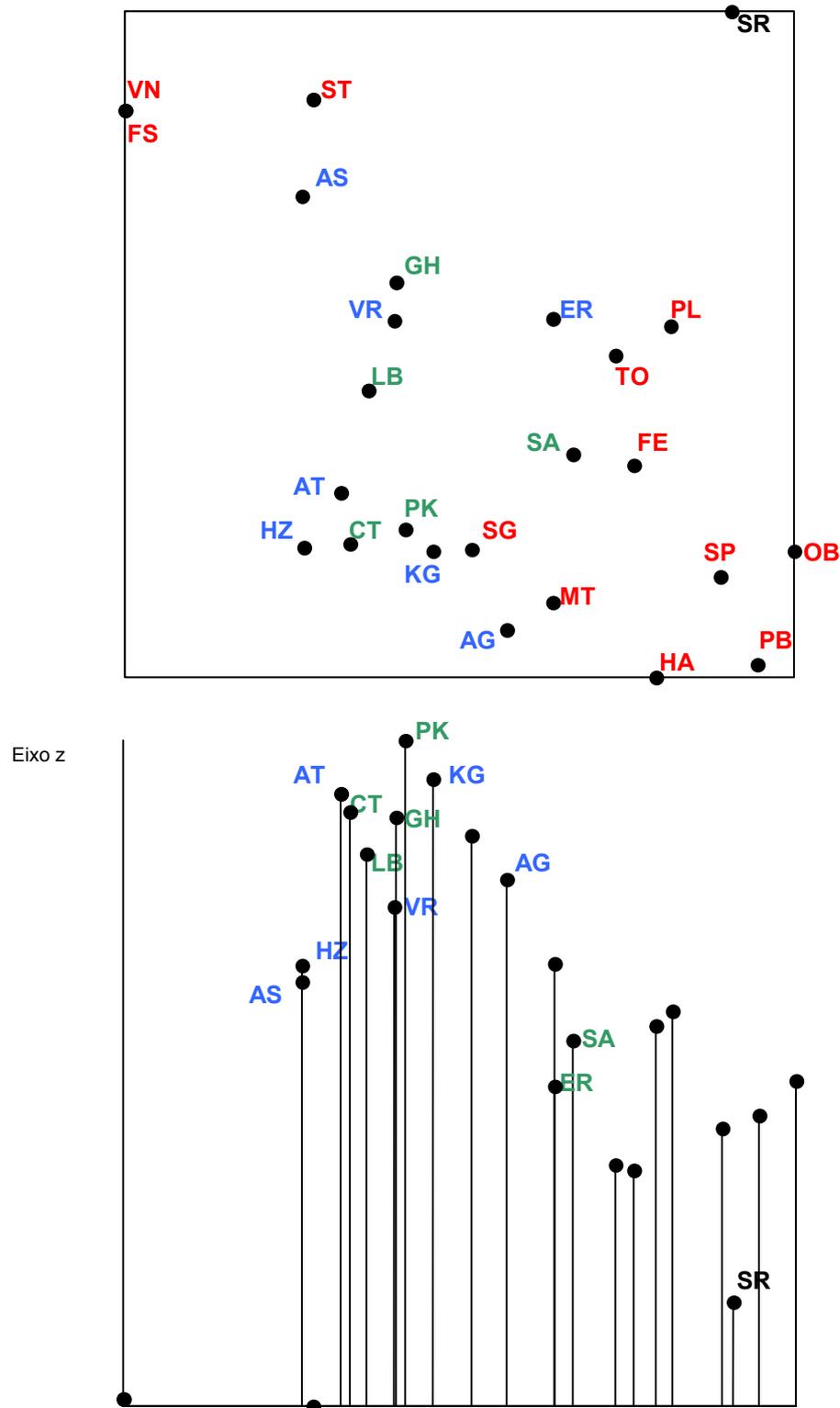


Figura 16 e 17 – Plotagem das amostras, discriminadas por Seção, em dois planos distintos (topo/acima e lateral/abaixo) (azul= *S. Trichoderma*; vermelho=*S. Pachybasium*, verde= *S. Longibrachiatum*)

Quadro 12 – Descritores que apresentaram contribuição mais expressiva à variabilidade do grupo de espécies analisados, em função das componentes principais CP1 e CP2

Variáveis	Componentes Principais (CP1 e CP2)
Conídios	<i>Formato; Comprimento e amplitude de variação e em torno da média; Largura e amplitude de variação e em torno da média; Ornamentação, Pigmentação,</i>
Conidióforo	<i>Cotonoso x Gliocladium-like; Extensões de hifas estéreis e sinuosidade; Pústula em CMA;</i>
Fiálide	<i>Comprimento médio e amplitude de variação; Maior largura média e amplitude de variação e em torno da média; Largura da base, média e variação em torno da média; Comprimento/Largura amplitude e variação</i>
Clamidosporos	<i>Terminais x intercalares</i>

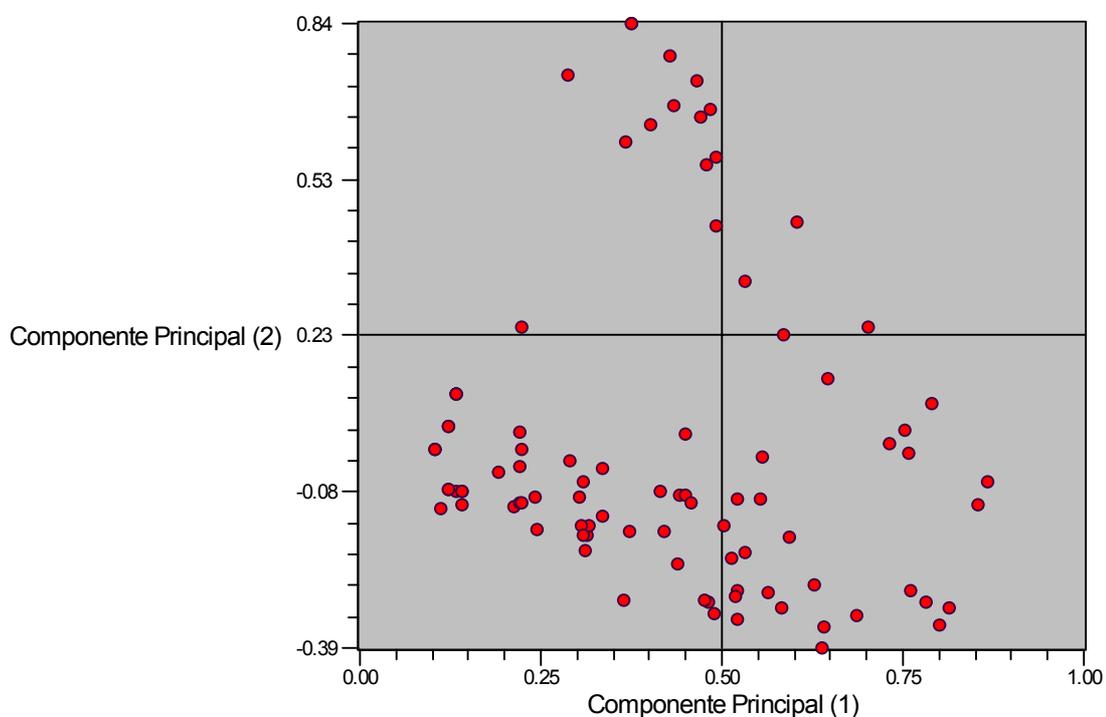


Figura 18 – Dispersão das componentes principais dos descritores utilizados (90) em plotagem bidimensional

5.9 Análise Filogenética

5.9.1 Caracteres Morfológicos

A análise parcimoniosa dos dados morfológicos revelou que dos 90 caracteres considerados, 76 são informativos. Obteve-se 9 árvores mais parcimoniosas (MTP) com 278 passos, apresentando um baixo índice de consistência (CI=0,32), e resultando numa árvore de consenso estrito com 3 politomias (Figura 19, árvore enraizada). Apenas o ramo formado pelas espécies *T. fasciculatum* e *T. virens* e *T. strictipile* (seção *Pachybasium*) foi suportado por valores de *bootstrap* superiores a 70%. O alto índice (100%) do clado originado pelos dois primeiros, é explicado pela grande similaridade morfológica, como observado na análise fenética, no capítulo anterior. Esta seção aparece como polifilética no cladograma confirmando dados de Kindermann et al. (1998) e as politomias observadas podem ser explicadas pela grande interpenetração dos caracteres morfológicos. Entretanto, a árvore como um todo, é pouco suportada devido aos baixos valores de *bootstrap*, o que impede inferências mais consistentes e mais objetivas mesmo sobre a disposição das seções.

5.9.2 Caracteres Moleculares

Após o alinhamento e corte das extremidades, as seqüências submetidas à análise de parcimônia gerou 1 árvore mais parcimoniosa (MTP) com 1116 passos mostrando uma topologia bem resolvida e razoavelmente bem suportada pela análise de *bootstrap*. A solução encontrada, apresentada na Figura 20, considerou 229 caracteres informativos, enquanto 325 se apresentaram invariáveis. A consistência foi bastante superior (CI=0,73 e RI=0,84) aquela da análise morfológica, evidenciando, assim, menor homoplasia. Essa análise apresentou 21 ramificações com índices superiores a 70%, sendo que as espécies do grupo externo (CLR, CM, VL) se dispuseram num clado basal, indicando monofilia. Estas espécies, também pertencem à ordem *Hypocreales* e se dispuseram formando um grupo isolado. A separação observada entre *C. rosea* e outras espécies de anamorfos de *Hypocrea* (*T. virens* e *T. reesei*), apesar da similaridade

morfológica indica que apresentam histórias evolutivas diferentes, mostrando que na realidade não se trata de espécie próxima a *Gliocladium*, conforme observou Samuels (2004). A seção *Longibrachiatum* originou um clado bastante consistente, confirmando a monofilia citada por Kuhls, et al. (1997). A inclusão de *T. saturnisporum* neste grupo demonstrou não ser justificada a colocação numa seção à parte (s. *Saturnisporum*) conforme proposto por Doi et al. (1987). *T. reesei*, antes considerado por Bisset (1984) como sinônimo de *T. longibrachiatum*, apresentou uma separação robusta desta espécie. A proximidade filogenética observada entre *T. reesei* e sua forma teleomórfica (derivativo clonal) *H. jecorina* formaram um ramo consistente como esperado conforme dados anteriores, apresentados por Kuhls et al. (1996). Grande parte das espécies incluídas na seção *Pachybasium* compuseram um grupo irmão da s. *Longibrachiatum*. *T. stromaticum*, curiosamente, não se dispôs próximo às espécies da seção *Pachybasium* embora tenha sido originalmente descrita com sendo *T. viride* ou *T. polysporum*, foi posteriormente considerado como uma nova espécie por Samuels et al. (2000) baseando-se em caracteres morfológicos e sequenciamento de DNA. As espécies da seção *Trichoderma*, à exceção de *T. asperellum*, originaram um clado único evidenciando sua proximidade filogenética a partir dos dados moleculares. *T. viride* e *T. koningii* mostraram uma afinidade maior, enquanto *T. atroviride* pareceu ser uma espécie mais estabilizada, embora Lieckfeldt et al. (1999) tenham sugerido possivelmente que as 3 poderiam se tratar de uma única espécie.

O grupo formado por *T. spirale* e *T. virens*, bastante suportado pelo índice de *bootstrap* (100%), evidencia claramente a limitação dos caracteres morfológicos, de *per se*, na compreensão da filogenia de algumas espécies. *T. virens* anteriormente colocado no gênero *Gliocladium* por sua morfologia, não se posicionou juntamente como *T. fasciculatum* que apresenta o mesmo padrão de ramificações de conidióforos (*gliocladium-like*), entre outras semelhanças (vide análise fenética, no capítulo anterior).

A posição de *T. agressivum*, anteriormente considerada como *T. harzianum*, embora guarde características fisiológicas distintas desta última, sugere que faça parte do complexo *T. harzianum*.

5.9.3 Análise de Evidência Total

A análise combinada originou 1 árvore (MTP) com 1224 passos, apresentando um índice de consistência pouco inferior à análise dos dados moleculares isolados (CI=0,56 RI=0,66) e bastante superiores aos da análise morfológica. Dos 815 caracteres considerados na matriz inicial de dados (morfológicos e moleculares) 301 foram informativos em relação à análise de parcimônia. A Figura 21, mostra o cladograma resultante com as espécies discriminadas por seção conforme a classificação mais reconhecida atualmente (BISSET & GAMS, 1998, SAMUELS et al, 2004, SAMUELS, 2004). Dentre as seções propostas por Bisset (1984, 1991abc) a seção *Longibrachiatum* formou um clado basal bastante robusto, mostrando tratar-se de um grupo natural, e distinto filogeneticamente das outras. A seção *Trichoderma* formou um grupo igualmente consistente, composto pelas espécies *T. atroviride*, *T. erinaceum*, *T. viride* e *T. koningii*, suportado por um alto índice de *bootstrap* (100%).

A ocorrência das espécies pertencentes à seção *Pachybasium* distribuídas, em diferentes grupos irmãos, sugere que seus membros não podem ser distinguidos filogeneticamente também pela análise combinada. Uma vez que a parafilia deste grupo já havia sido considerada por Kuhls et al. (1997), a proximidade filogenética de *T. stromaticum* à *T. harzianum* e *T. virens*, descrita por Samuels et al. (2000), deve ser feita com cautela, uma vez que os autores, analisando a região ITS, trabalharam com reduzido número de táxons pertencentes à esta seção. Inferências considerando a espécie *T. harzianum*, analisado por esta região do DNA, também devem ser cuidadosas pois como constatou Kullnig et al. (2000), presentemente é o membro do gênero com a maior variabilidade genética apresentada, podendo posicionar-se diferentemente em função do biótipo utilizado na análise.

A ocorrência de um clado isolado, mais basal, formado por *T. oblongisporum* e *T. polysporum* não pode ser explicada satisfatoriamente. Os dados, inclusive, divergem daqueles obtidos por Kindermann et al. (1998), embora a árvore apresentada por estes autores mostre um baixo suporte de *bootstrap*. Kullnig-Gradinger et al. (2002), trabalhando numa aproximação multigênica, observaram as duas espécies em subclados distintos, indicando que o resultado obtido no presente estudo pode ter observado algum

equivoco, ou a própria seqüência recuperada no *GenBank* estar com a identificação equivocada.

As espécies *T. reesei* e *H. jecorina* constituíram um ramo consistente, confirmando sua conexão anamorfo-teleomórfica conforme descrita por Kuhls et al. (1996). A inclusão destas espécies na análise propiciou mais suporte às inferências, e aos índices de suporte obtidos na árvore.

Os resultados obtidos concordam com aqueles expostos por Kuhls et al. (1997), no que se refere à seção *Longibrachiatum* ser monofilética e à seção *Pachybasium* ser polifilética, entretanto, o grupo formado pelas espécies da seção *Trichoderma* (*bootstrap* 100%) não mostra isso de maneira clara. Contrariamente, suporta a possibilidade de polifilia, constituindo um grupo filogeneticamente delimitado. Futuros estudos, incluindo outros caracteres, analisados de modo combinado poderão definir melhor a relação destas espécies dentro do conjunto.

As espécies utilizadas como grupos externos, foram selecionadas intencionalmente por apresentarem proximidade fenotípica sob diferentes aspectos com *Trichoderma*, seja pela forma anamórfica ou teleomórfica. Dados analisados na revisão bibliográfica deste trabalho (e.g. SAMUELS et al, 2004), indicam que a morfologia da fase teleomórfica nem sempre reflete correspondência com as respectivas conexões anamórficas, já comprovadas molecularmente (KUHLS et al., 1996, 1997, CHAVERRI et al., 2003). Isto sugere que os dois estados possam estar sofrendo pressões seletivas diferenciadas. A avaliação mais precisa deste fenômeno somente poderá ser esclarecida com estudos multifásicos, envolvendo diversos caracteres dos dois grupos, incluindo também espécies próximas. A análise combinada demonstrou ser uma ferramenta bastante flexível podendo ser utilizada e/ou associada com diferentes grupos de dados neste tipo de estudo.

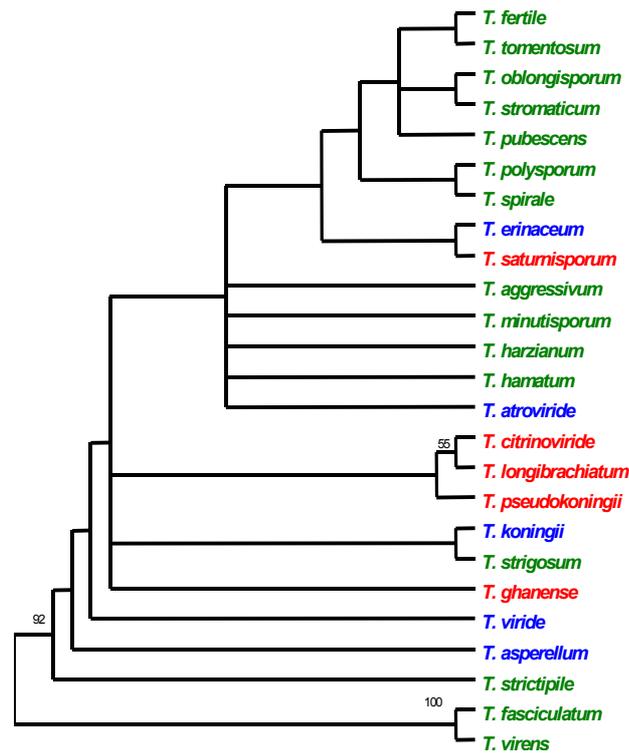


Figura 19 – Dendrograma filogenético de consenso estrito dos caracteres morfológicos com seções discriminadas (azul=*S. Trichoderma*; verde=*S. Pachybasium*, vermelho=*S. Longibrachiatum*; valores sobre dicotomias indicam *bootstrap* > 50%)

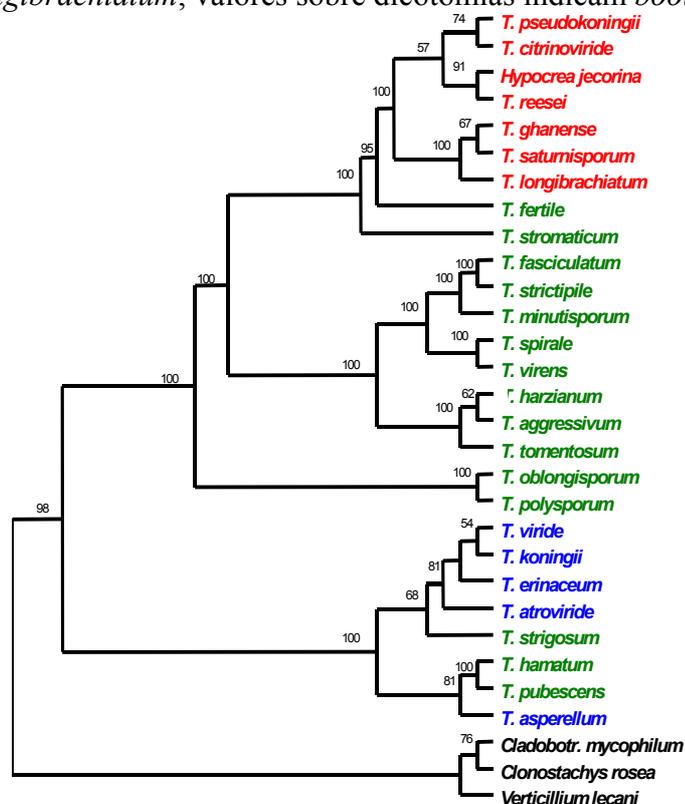


Figura 20 – Dendrograma filogenético de consenso semi-estricto dos caracteres moleculares com grupo externo indicado em preto (legenda vide figura anterior)

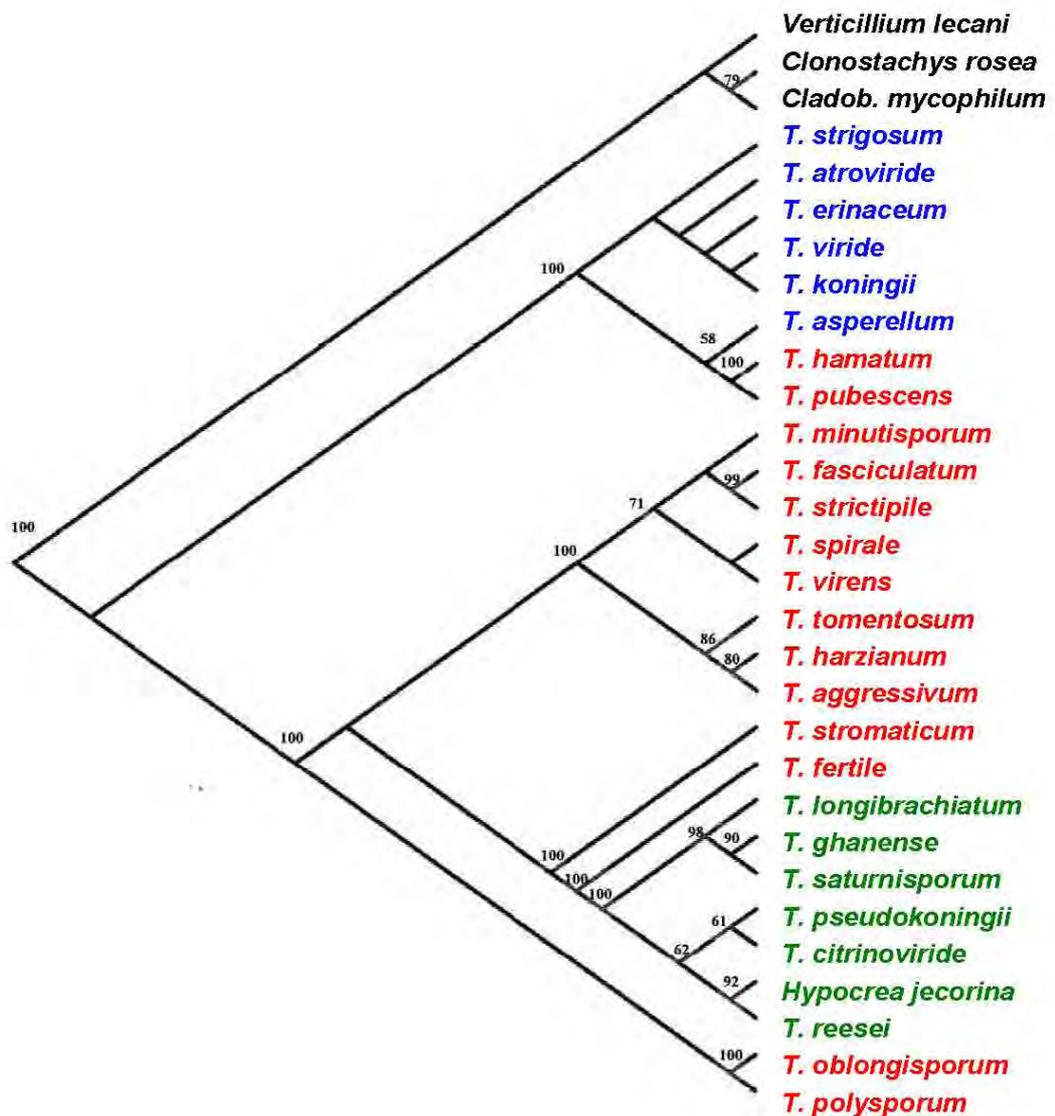


Figura 21 – Cladograma de consenso semi-estrito obtido pela análise de evidência total com seções discriminadas (azul=*S. Trichoderma*; vermelho=*S. Pachybasium*, verde=*S. Longibrachiatum*; grupo externo indicado em preto, valores sobre dicotomias indicam *bootstrap* > 50%)

Estudos anteriores mostraram que as seqüências do tipo ITS são geralmente consistentes com a morfologia (DODD, et al., 2000). O presente estudo não evidenciou isso de maneira clara, mas concorda com aqueles autores no que se refere à importância de se testar a robustez da análise, evitando topologias incongruentes ou desbalanceadas provocadas por seqüências equivocadas ou mal resolvidas. Estes autores também

reforçam a importância da seleção das espécies do grupo externo (*outgroup*) de modo a conter um sinal filogenético suficiente em relação às espécies internas.

Além desses fatores, conforme observou Dodd et al. (2000), nem toda a sequência ITS1-5,8S-ITS2 pode conter informação filogenética suficiente. Entretanto, em diversos artigos pesquisados, verifica-se que os autores utilizaram apenas uma das regiões ITS ou as duas separadamente, o que poderia estar causando uma remodelação na topologia da árvore produzida e, em última análise, gerar inferências deturpadas ou limitadas.

5.10 Análise da Biodiversidade

A Tabela 27 apresenta de modo consolidado o número e frequência das espécies identificadas por ecossistema amostrado, totalizando 200 amostras. Esta tabela, conjuntamente com a Tabela 21, compõem o quadro de distribuição das espécies levantadas no estado de São Paulo.

Na Tabela 21, verifica-se que a ocorrência de espécies da seção *Trichoderma* (63,5%) é bastante superior em relação às outras duas, chegando a ser quase o dobro da seção *Pachybasium* (32,5%). A seção *Longibrachiatum* mostrou-se pouco expressiva (4,0%), sendo que num universo de amostragem menor talvez nem fosse identificada.

Na seção *Trichoderma* as espécies com maior expressividade foram *T. harzianum* e *T. koningii*, com 34,2% e 11,1%, respectivamente. Essa alta ocorrência pode ser explicada pelo fato de se tratar de espécies agregadas (GAMS & BISSET, 1998; SAMUELS, 2004), como visto anteriormente, sendo provável que várias “espécies” estejam envolvidas nestes complexos. Estes são casos típicos, onde a morfologia, considerada isoladamente, demonstra-se limitada para circunscrever as espécies em questão. Um estudo individual e aprofundado de cada um dos agregados, semelhante aquele realizado por Ospina-Giraldo et al. (1998), poderia auxiliar a elucidar quais seriam as variáveis fundamentais e, eventualmente, oferecer uma contribuição mais efetiva na compreensão do fenômeno envolvido, do que talvez estudos com diversas espécies (grupos) simultaneamente. É importante salientar que em vários destes trabalhos, constata-se que os autores não têm conhecimento de quais entidades biológicas realmente estão sendo manipuladas, a não ser pela descrição de

origem (descrição do depósito da coleção utilizada) ou mesmo através de identificação pessoal. A denominação obtida através de identidade molecular (*GenBank*) também apresenta sérias restrições, como discutido no capítulo correspondente. Fatos como esse explicam a dificuldade encontrada em cruzar dados e, até mesmo explique a incongruência de resultados em certos casos.

Tabela 27 – Frequência das espécies isoladas por ecossistema (identificação molecular com base na região ITS1-5,8S-ITS2, os códigos indicam MT=mata, CP=capoeira, CR=cerrado, CO=cerradão, VZ=várzea, RS=restinga; o valor entre parênteses indica o percentual do número de indivíduos daquela espécie no respectivo ecossistema)

Seção	Espécie	Ecossistema - no. de isolados (%)						Total 100%
		MT	CP	CR	CO	VZ	RS	
<i>Trichoderma</i>	<i>T. asperellum</i>	6(60)	1(10)	3(30)	-	-	-	10
	<i>T. atroviride</i>	8(73)	2(18)	-	1(9)	-	-	11
	<i>T. aureoviride</i>	6(50)	5(42)	-	1(8)	-	-	12
	<i>T. erinaceum</i>	-	1(100)	-	-	-	-	1
	<i>T. harzianum</i>	40(59)	21(31)	1(1,5)	2(3)	1(1,5)	3(4,5)	68
	<i>T. koningii</i>	9(41)	8(36)	2(9)	1(4,6)	-	2(9)	22
	<i>T. viride</i>	3(100)	-	-	-	-	-	3
<i>Pachybasium</i>	<i>T. hamatum</i>	3(27)	8(73)	-	-	-	-	11
	<i>T. inhamatum</i>	4(67)	1(17)	1(17)	-	-	-	6
	<i>T. strigosum</i>	-	-	-	-	-	1(100)	1
	<i>T. spirale</i>	13(33)	15(38)	-	3(7,7)	3(7,7)	5(13)	39
	<i>T. tomentosum</i>	-	2(100)	-	-	-	-	2
	<i>T. virens</i>	3(50)	2(33)	-	-	-	1(17)	6
<i>Longibrachiatum</i>	<i>T. ghanense</i>	-	1(100)	-	-	-	-	1
	<i>T. longibrachiatum</i>	-	3(100)	-	-	-	-	3
	<i>T. reesei</i>	1(50)	-	1(50)	-	-	-	2
	<i>T. saturnisporum</i>	2(100)	-	-	-	-	-	2
TOTAIS	17sps.	98(49)	70(35)	8(4)	8(4)	4(2)	12(6)	200

A espécie mais recorrente da seção *Pachybasium*, *T. spirale*, com 19,6%, exemplifica parte desta problemática. Esta espécie descrita por Bisset (1991), ocorreu em quase todas as condições amostradas (exceção do cerradão, que pode ser considerado como um caso particular do cerrado). Pela ampla distribuição observada e sua alta frequência relativa é razoável imaginar que já foi isolada em outras ocasiões em nossas condições, sendo identificada com a chave disponível na época. Caso não tenha ocorrido o depósito da cultura numa coleção oficial, ou ainda que isso tenha sido feito mas não tenha sido atualizada, os trabalhos publicados, que não apresentem a

morfologia e comportamento *in vitro* da entidade estudada, poderão ser comparados somente dentro de certos limites. Latha et al. (2002) relata justamente um exemplo dessa questão no qual isolados depositados no *Microbial Type Culture Collection* (MTCC, Chandigarh, Índia), classificados como *T. harzianum*, foram posteriormente verificados por Hermosa et al. (2000) tratar-se na realidade de *T. inhamatum* e *T. longibrachiatum*. Os primeiros autores, constataram este mesmo problema também na *Indian Type Culture Collection* (ITCC, New Delhi, Índia) em ambos os casos utilizando as técnicas de RAPD e seqüenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2. Ao final, concluem que todos os depósitos destas coleções deveriam ser re-examinados com estas ferramentas moleculares de modo a utilizar efetivamente estes fungos de grande importância agrícola, biotecnológica e industrial.

Uma alternativa para contornar, ou pelo menos minimizar, esse problema, seria o seqüenciamento e depósito em bancos gênicos de regiões do DNA consideradas mais informativas. Embora esta técnica também apresente certas restrições (ver capítulo referente), ela tem a propriedade de caracterizar o organismo mais objetivamente, com um grau interpretativo menor e, portanto, com menos subjetivismo. Estas técnicas somadas poderiam dar uma maior precisão sobre a espécie analisada, uma vez que ela aproxima-se bastante de outras como *T. fertile* e *T. hamatum*, ambas da mesma seção.

A espécie (agregado) *T. harzianum*, descrita por Rifai (1969) foi considerada aqui como pertencente à seção *Trichoderma* devido à afinidade molecular e morfológica demonstrada nos capítulos anteriores. Embora tenha sido incluída por Bisset (1991c), em *Pachybasium*, os dados obtidos neste trabalho somados às observações comparativas feitas pelo próprio Rifai (1969) indicam que este complexo não pode ser incluído categoricamente a uma delas. O próprio Bisset, quem propôs a seção naquele trabalho, em publicação mais recente (GAMS & BISSET, 1998), coloca esta espécie agregada nas 2 chaves referentes às seções *Trichoderma* e *Pachybasium*. Neste trabalho, ele afirma que tanto *T. harzianum* como *T. inhamatum* parecem ocupar uma posição intermediária entre elas.

A seção *Saturnisporum*, descrita por Doi et al. (1987) fundamentada na ornamentação bulada ou semelhante à asa (*wing-like*) dos conídios (*T. saturnisporum* e

T. ghanense), foi verificada estar intimamente relacionada com a *S. Longibrachiatum* e não foi sustentada pela análise molecular feita por Kuhls et al. (1997), além disso o padrão de ramificação dos conidióforos também se encaixa nesta seção, corroborando com os dados destes autores.

A distribuição e frequência por ecossistemas também apresentou diferenças substanciais. Os ambientes de mata e capoeira foram os locais de maior ocorrência representando 84% do total dos isolados avaliados e com a maior diversidade de espécies (16 espécies).

Uma vez que as coletas se realizaram na camada de serapilheira, estes dados confirmam a predominância do grupo pela região rica em matéria orgânica em decomposição e ambiente úmido (KLEIN & EVELEIGH, 1998).

Em termos de temperatura não foi possível observar nenhum efeito determinante na oscilação da frequência das espécies devido a homogeneidade relativa da área amostrada. Entretanto, as espécies *T. polysporum* e *T. viride*, confirmaram dados de literatura que relatam serem espécies de regiões frias (a primeira não foi observada e a segunda apenas 3 constatações) e *T. harzianum* ocorrer predominantemente em áreas quentes (DANIELSON & DAVEY, 1973b).

A baixa ocorrência em regiões de várzea e restinga, de modo generalizado, sugere que em ambientes onde a aeração é restrita seu desenvolvimento é limitado, reduzindo assim, drasticamente, sua distribuição. Isso pareceu ser mais crítico em relação à seção *Longibrachiatum*, a qual não teve expressão nestes 2 ambientes.

Esta seção, caracterizada, entre outros aspectos, pelo alto potencial celulolítico, teve uma ocorrência pouco expressiva em termos gerais. Apesar disso, sua presença se reveste de uma importância muito grande devido à sua raridade e aos resultados obtidos no ensaio de avaliação celulolítica, no qual isolados de *T. longibrachiatum* chegaram a mostrar índices superiores a linhagem de referência (QM9414, ver item 5.5). Isso não seria tão interessante não fosse o fato da linhagem QM9414 já haver sido selecionada, a partir da linhagem selvagem original QM6a, nessa direção. O Quadro 11 ilustra a genealogia da mesma.

Considerando esta seção apresentar alta estabilidade genotípica, verificada pela técnica de RAPD (TURNER et al., 1997, os autores utilizam a expressão “estabilidade

fenotípica”), os dados confirmam sua limitada distribuição no estado por fatores ecofisiográficos.

A análise da diversidade de microrganismos está sujeita à um série de considerações sobre a validade da metodologia utilizada. Os dados aqui apresentados refletem cerca de 4 (em alguns casos até 8) isolados de cada amostra de solo, sendo que algumas espécies podem não ter sido evidenciadas devido ao limite de capacidade operacional. Outro fator que pode interferir nos resultados é o procedimento de isolamento e cultivo, que podem atuar selecionando espécies mais robustas ou mais adaptadas a variações microclimáticas. Para contornar estes elementos procedimentos mais sofisticadas tem sido constantemente desenvolvidos, como o caso de metodologias cultivo-independentes, através da extração direta de DNA da amostra de solo seguida da amplificação de regiões como 18S e posterior genotipagem (e.g. DGGE, HAGN et al., 2003).

Através de estudos comparativos das diversas metodologias disponíveis é de supor que num futuro próximo venha a se ter uma compreensão mais precisa do comportamento de determinada população (dinâmica) e os mecanismos que atuam sobre ela. Achar que as técnicas de DNA por si só possam eliminar essas variáveis parece ser uma linha conceitual equivocada, uma vez que organismos podem estar presentes em determinada comunidade sem necessariamente estar (por diversos motivos) atuando biologicamente no sistema. Krueger & Johansson (1959) e Dommergues et al. (1978) analisam mais detalhadamente os diversos fatores ecofisiográficos que condicionam o crescimento e atividade microbiana no solo, enquanto Klein & Eveleigh (1998) fazem uma breve mas interessante discussão sobre diferentes técnicas e fatores críticos de ordem metodológica. Analisando estes fatores e suas condicionantes, verifica-se a necessidade de uma integração de diferentes técnicas num sentido comum.

Acessar a diversidade, ou pelo menos elaborar possíveis padrões de ocorrência e distribuição exige um conhecimento bastante pontual sobre o organismo estudado, sobretudo de sua ecologia e, num sentido mais amplo, sua ecofisiografia.

Como resultado dessa análise, depreende-se a importância e necessidade, cada vez maior, de um enfoque sistêmico e multidisciplinar, o que geraria além de uma

racionalização de esforços, uma interpretação mais próxima da realidade da situação biológica analisada.

Os dados obtidos nos ensaios do efeito biocontrolador e produção de metabólitos tóxicos/inibidores apresentaram bastante descontinuidade e pouca correspondência com o comportamento *in vitro*. Os dados indicam que estimar a variabilidade, bem como a faixa de variação destes fatores, exigirá o desenvolvimento de metodologias mais eficientes e precisas e, concomitantemente, ensaios em casa de vegetação, inicialmente, e posteriormente a campo. No estágio atual não há um consenso nem mesmo sobre os métodos de recuperação de conídios em solos pós-infectados, ou mesmo sobre sua persistência a campo.

Em termos do espectro da atividade celulolítica, considerando todas as amostras conjuntamente e independente de sua classificação, a Figura 8 mostra claramente um padrão de expressão gênica regular e coerente. A alta produção de celulasas pelas amostras da seção *Longibrachiatum* (*T. longibrachiatum* e *T. ghanense*) sugere que esta característica possa ser associada a caracteres morfológicos.

Em relação ao potencial biotecnológico essas linhagens são bastante promissoras, principalmente por se tratarem de linhagens selvagens, e deveriam ser submetidas a ensaios prospectivos mais específicos para avaliações quantitativas e, eventualmente, submissão a ensaios de melhoramento.

A diversidade de espécies levantadas pela análise da região ITS-5,8S-ITS2, parece ser bastante elevada, visto a ocorrência de diversos táxons incluídos nas três seções consideradas por Bissett (1991), as quais compreendem cerca de 30 táxons anamórficos. Entretanto, como diversas espécies vêm sendo descritas continuamente (vide SAMUELS et al., 1999, SAMUELS et al., 2000, BISSETT et al. 2003), a representatividade da diversidade observada no estado de São Paulo deverá ser periodicamente avaliada, bem como revisões taxonômicas das linhagens depositadas nas coleções oficiais.

6. CONCLUSÃO

O gênero *Trichoderma* compreende um grupo universalmente aceito como apresentando um grande potencial biotecnológico, comprovado em vários campos desde a agricultura, como agente de biocontrole, até aplicações industriais, como a produção de enzimas em escala. Apesar disso, vários aspectos de sua biologia, ciclo vital, comportamento metabólico, taxonomia e filogenia permanecem sem respostas.

O presente trabalho apresentou diversos estudos que, em última análise, demonstram a necessidade de uma abordagem sistêmica para a compreensão do grupo como um todo. Foi constatado pela revisão realizada que pouco se conhece sobre sua diversidade e distribuição em termos nacionais e, a julgar pelos dados obtidos no perímetro estudado, resultados interessantes podem surgir num estudo abrangendo outras regiões.

A dificuldade na obtenção de linhagens de referência (mundiais) para estudos comparativos e estabelecimento de atualizações taxonômicas do material existente em coleções nacionais continua sendo um obstáculo ao avanço de estudos do gênero no Brasil. Constatou-se que em diversos artigos nacionais a classificação citada não se encontra devidamente fundamentada, gerando, portanto, a possibilidade de equívocos e dificuldade na comparação de dados relacionados a(s) espécie(s) em questão ou até mesmo impedindo sua reprodução.

No que se refere a sua aplicação como agente biocontrolador na agricultura, foi verificado que no Brasil não existe uma padronização metodológica ou mesmo normas de certificação de qualidade para sua produção e aplicação em culturas. Critérios de dosagem, avaliação de eficiência, comportamento em diferentes solos, ambientes e culturas, validade do produto, normas de aplicação e cuidados requeridos, são apenas algumas das lacunas identificadas no decorrer do projeto. Urge que órgãos nacionais competentes iniciem programas ou projetos de pesquisa nesse enfoque extensionista principalmente devido ao fato que algumas espécies, sob certas circunstâncias, podem apresentar efeito prejudicial à saúde, como relatado no levantamento bibliográfico realizado.

Foi elaborado um modelo de ficha de coleta, de modo a padronizar os dados das amostras, formando assim um pequeno banco de dados que deverá acompanhar a coleção dos isolados. Entre as informações registradas constam os dados de georeferenciamento, incluindo altitude e precisão no ponto de coleta, o que permitirá futuros estudos ecológicos sobre as espécies obtidas.

A variante do meio de Martin (1950), meio MC, propiciou a recuperação de isolados de *Trichoderma* spp. de todas as amostras. A combinação de componentes utilizados além de eficiente apresentou um custo operacional inferior devido à diminuição do volume de agar utilizado (25-40% em relação aos outros meios).

A coleção de linhagens de referências, organizada para o desenvolvimento deste trabalho, em função de divergências identificadas, observadas entre características morfológicas e identificação molecular, deverá ser cuidadosamente reavaliada tendo por base as chaves taxonômicas e descrições mais atuais (GAMS & BISSET, 1998, KULLNIG et al., 2000, BISSET et al., 2003, SAMUELS et al., 2004, SAMUELS, 2004).

A variante da técnica de Riddell (1950), desenvolvida durante o decorrer do trabalho, mostrou ser uma ferramenta bastante interessante para observação da formação do sistema de ramificação dos conidióforos, característica fundamental na identificação. A modificação proposta, além de melhorar o campo de observação, permitiu o acompanhamento de vários isolados simultaneamente. É sugerido que esta técnica também possa ser testada para o acompanhamento e registro fotográfico (digital) de processos de diferenciação como germinação, conidiogênese, clamidosporogênese etc., onde é exigido o registro dos eventos intermediários de formação.

A dificuldade observada na caracterização precisa do sistema de ramificação dos conidióforos, face ao relativo subjetivismo das descrições reportadas em literatura, apontou para a necessidade de um estudo mais detalhado sobre os mecanismos envolvidos nessa diferenciação. Na revisão realizada não foram localizados, por exemplo, dados referentes a plasticidade fenotípica e seus fatores condicionantes. No sentido de reduzir o grau interpretativo nas descrições são sugeridos estudos envolvendo métodos topológicos na classificação de padrões de diferenciação (sistema

ramificação) e também a aplicação da teoria de sistemas não lineares na interpretação dos mecanismos envolvidos nesse processo.

Os dados de temperatura e velocidade de desenvolvimento, local de semeadura, meios de cultura testados, e intervalos de observação, obtidos a partir da literatura publicada demonstram que alguns autores utilizam técnicas diferentes de observação. Divergências até mesmo entre técnicas de medição de estruturas indicam a necessidade de uma padronização de metodologia para efeito de caracterização das espécies e linhagens além de fornecer dados passíveis de comparação. Pelos experimentos realizados ficou evidenciado que a ausência da descrição de simples detalhes como o local de semeadura (central ou lateral) podem gerar uma variação de até 56% na leitura de velocidade de desenvolvimento (“diâmetro” da colônia).

Após padronizações preliminares necessárias, o meio CA1 comportou-se adequadamente para a avaliação e triagem de isolados celulolíticos. Este meio, além de halos de degradação bem nítidos revelados em solução de vermelho do Congo, apresenta menor custo devido à redução na quantidade de alguns componentes. Os resultados, englobando aproximadamente 50% do isolados da coleção de trabalho, confirmaram não apenas a validade desta técnica comparativa como também permitiram identificar isolados com atividade celulolítica superior a linhagem de referência. Num dos casos, a atividade chegou a superar em 17,6% a linhagem padrão, mostrando um evidente potencial biotecnológico, considerando que se tratam de linhagens selvagens, portanto passíveis de melhoramento (e.g. através de fusão de protoplastos).

Avaliação do potencial de biocontrole, através dos ensaios de pareamento e produção de metabólitos inibidores dos lotes analisados, revelou alguns isolados promissores. Entretanto, a princípio, foi difícil estabelecer uma correspondência nítida destes resultados com a avaliação *in vivo* (casa de vegetação). Pelo fato das variáveis a campo não serem bem conhecidas (comportamento, dinâmica populacional, interações, fatores ecofisiográficos etc.), a extrapolação de dados, sugerindo um possível comportamento eficiente no controle de fitopatógenos, merece reservas. Estas limitações suportam a idéia que uma alternativa para estes estudos seria, a partir de resultados preliminares em laboratório e casa de vegetação, numa segunda etapa, submeter este material a nova avaliação e triagem no local de uso. Outra consideração que merece

destaque diz respeito ao desenvolvimento de um inóculo eficiente. Dados de literatura e a experiência adquirida durante o presente estudo, indicam que a idéia da existência de uma linhagem “milagrosa” é pouco provável no caso do biocontrole. Parece ser mais sensato o desenvolvimento de um inóculo composto por várias linhagens e até mesmo espécies potencialmente ativas (selecionadas), de maneira que ao ser aplicado promoveria uma seleção natural direcionada às condições locais (planta/patógenos-alvo e microambiente).

No Brasil, embora haja diversas empresas comercializando inóculos preparados a base de *Trichoderma* spp., parece não haver um controle normatizado de qualidade dessa produção. Além disso, até mesmo a identificação das espécies veiculadas é controversa, fatores esses que geram resultados à campo sujeitos a questionamentos técnicos diversos. A falta de experimentos sistematizados que regulem sua eficiência e comercialização é um ponto crítico que deverá ser revisto pelos órgãos competentes. Até que isso seja concretizado os inóculos comercializados permanecerão sendo uma caixa preta em termos de eficiência e, os resultados obtidos (campo ou casa de vegetação) sujeitos, a respostas de difícil interpretação científica e reprodutibilidade, seja elas positivas ou negativas.

A análise molecular recebeu vários ajustes até a fase do seqüenciamento estabelecendo um protocolo padrão para os trabalhos com *Trichoderma*. A técnica de purificação mediante a utilização de isopropanol/etanol determinou um seqüenciamento satisfatório, facilitando e possibilitando, em termos de custo operacional, o processamento do grande volume de amostras de DNA manipuladas.

A análise através das seqüências da região ITS1-5,8S-ITS2 foi positiva com pequeno número de falhas, permitindo discriminar 17 espécies diferentes mediante submissão para consulta no *GenBank*. Essa identificação, a qual é feita por critério de similaridade, foi incorporada ao banco de dados da coleção como também as próprias seqüências, para futuras referências e estudos. A precisão, em certos casos, permitiu até mesmo identificar isolados idênticos, como no caso daqueles analisados pela técnica de RAPD. Nas análises de seqüências pelo método comparativo (BLASTN) é importante ter em conta que o procedimento tem limitações metodológicas que devem ser

consideradas na análise dos resultados obtidos, uma vez que podem acarretar em linhas de raciocínio equivocadas.

Os resultados obtidos pela análise de RAPD, com alguns dos iniciadores utilizados, permitiram discriminar linhagens redundantes, corroborando com os dados de literatura. Esta identidade, em relação à sua atividade celulolítica, pode ser confirmada, inclusive, com os dados do seqüenciamento dessas linhagens. A redundância, entretanto, refere-se à seqüência analisada (ITS2-5.8S-ITS2), o que impossibilita prever, com segurança, se os isolados terão uma atividade metabólica similar. No caso estudado, isso ocorreu em relação à atividade celulolítica e, embora não possa ser generalizado, poderá servir de início de um estudo direcionado para esse objetivo (atividade enzimática) ou algum outro interesse. Outros iniciadores poderão ser avaliados (separada ou isoladamente) ou desenhados para essa finalidade específica, otimizando a obtenção de linhagens de alta produção e diminuindo relativamente os recursos dispendidos. Nesse sentido a associação da técnica de RAPD com outras metodologias moleculares, que abrangem regiões mais expressivas ou específicas, pode ser uma alternativa interessante a ser testada no futuro.

A aplicação de métodos de taxonomia numérica dentro do gênero *Trichoderma*, de acordo com o levantamento feito, nunca havia sido avaliada até então. O fenograma obtido pela análise de agrupamento mostrou que a seção *Pachybasium* forma um grupo bastante robusto em relação às outras. Entre elas, a Seção *Longibrachiatum* se mostrou menos consistente, evidenciando ser a Seção com maior interpenetração de caracteres morfológicos. Espécies afins foram confirmadas por agrupamentos bem definidos como no caso de *T. aggressivum* e *T. harzianum*, e *T. virens* e *T. fasciculatum*. Em termos metodológicos e gerais, os valores de *bootstrap* foram considerados baixos. Esse resultado seria esperado, uma vez que reflete a limitação da chave a qual é baseada apenas em caracteres morfológicos. Futuros ajustes nas classes de caracteres e definições mais precisas das espécies poderão fazer dessa técnica uma ferramenta útil e prática na identificação de espécies e grupos afins.

A análise de coordenadas principais apresentou um padrão de distribuição semelhante aquele visualizado no fenograma da análise de agrupamento. Por se tratar de uma análise multidimensional foi possível verificar e visualizar no espaço a similaridade

entre os táxons analisados com maior clareza. Os resultados indicam a possibilidade desta técnica ser utilizada para dar suporte e facilitar a interpretação dos dados obtidos pelo método de agrupamento.

O outro método de ordenação avaliado, a análise de componentes principais, permitiu identificar os principais caracteres e suas participações percentuais na variabilidade do grupo. Por este percentual (31,8%), atribuído aos vários descritores considerados, ter sido relativamente baixo, ficou demonstrada a insuficiência das principais variáveis identificadas, por si só, para a caracterização das espécies. Apesar disso, os resultados mostram que são caracteres informacionais e que podem ser utilizados complementarmente e conjuntamente com outras análises comparativas para fins taxonômicos.

Pela primeira vez é descrita a utilização da análise de evidência total – dados morfológicos e moleculares – aplicada na sistemática filogenética de fungos do gênero *Trichoderma*. Os resultados obtidos, ainda que preliminares e exploratórios, com o gênero, dão suporte e confirmam sua validade no estabelecimento de relações filogenéticas ao de gênero.

A seção *Longibrachiatum* confirmou ser monofilética enquanto a seção *Pachybasium* se mostrou como sendo a seção menos robusta das seções formuladas por Bisset (1984). Dados de literatura confirmam que ela dificilmente comporá um grupo definido, uma vez que agrupa táxons que não evidenciam relação filogenéticas nítidas. Outras análises, somadas à utilização das seqüências ITS, poderão dar mais consistência à esta indicação. A análise da seção *Trichoderma* revelou um clado relativamente robusto, indicando ser prematuro descartar completamente a hipótese da monofilia para esse grupo. Estudos mais amplos, incluindo espécies da seção *Hypocreanum* poderão auxiliar na interpretação deste agrupamento.

O posicionamento de *T. stromaticum* num grupo irmão terminal próximo ao da seção *Longibrachiatum*, fortemente sustentado (*bootstrap*=100%), aliado ao seu afastamento de *T. harzianum* e *T. virens*, indica que a sua inclusão na seção *Pachybasium*, conforme propôs Samuels al. (2000) pode ser prematura, embora sua morfologia se aproxime do padrão geral da seção.

A análise combinada se apresentou como uma ferramenta com um potencial interessante na interpretação de relações complexas, como no caso do gênero em questão. Na medida que outros caracteres moleculares, fisiológicos, morfológicos etc., forem se somando, uma visão sistêmica do processo estudado poderá emergir, alterando assim, a dimensão da interpretação. É provável, que desse modo, os estudos envolvendo caracteres antes considerados e comparados isoladamente, poderão produzir resultados superiores à adição dos mesmos.

Em termos de comparação de resultados, obtidos por diferentes grupos de pesquisa, e aferição da confiabilidade dos próprios resultados, sugere-se a elaboração e utilização de um grupo de espécies de referência mundial. Essas espécies participariam em todos os experimentos envolvendo a sistemática do gênero, possibilitando a criação de uma rede integrada de informação. Essa opção, além de representar a possibilidade de racionalização de recursos, poderia promover um desenvolvimento menos desigual nos locais onde a pesquisa não é prioritária ou até mesmo deficiente.

A análise da diversidade do gênero revelou a ocorrência de 17 espécies em todo o estado de São Paulo. As espécies mais recorrentes foram *T. harzianum*, *T. spirale* e *T. koningii*, em ordem decrescente de frequência. A seção mais observada foi *Trichoderma* (63,5%) seguida por *Pachybasium*, sendo a participação da seção *Longibrachiatum* quase inexpressiva (4,0%).

Os ecossistemas que apresentaram a maior diversidade e número de espécies foram as áreas de mata (49%) e capoeira (35%). Das espécies identificadas nos diferentes ambientes *T. harzianum* e *T. spirale* ocorreram em quase todos os ambientes amostrados. A baixa ocorrência nos ambientes de cerrado e cerradão, várzea e restinga, confirmaram dados de literatura que indicam o gênero não ter preferência por locais muito secos ou excessivamente saturados de umidade (alagados).

O presente estudo buscou, de maneira integrada, abordar diferentes aspectos da diversidade do grupo em questão. Neste percurso, diversas dificuldades metodológicas foram encontradas e, em certa medida, superadas. Além da adequação de diferentes técnicas, foram aplicadas e/ou sugeridas metodologias inéditas no estudo da espécie. Foi constatado que, embora seja um grupo de grande importância, mesmo em termos mundiais, várias aspectos de sua biologia (ciclo vital) permanecem incompreendidos.

A contínua descrição de novas espécies, fundamentadas em detalhes morfológicos desprovidos de uma explicação de seu significado biológico no conjunto das espécies, parece não ser um caminho muito promissor. Essa linha de pesquisa, além de poder levar a resultados fragmentados, portanto parciais, pode vir a gerar mais incongruência que compreensão.

Passados 35 anos da publicação do clássico trabalho de Rifai (1969) e, a julgar pela complexa situação taxonômica atual, questiona-se o tipo de progresso que se obteve no que se refere a compreensão intrínseca de sua morfologia e dos mecanismos que modulam sua expressão fenotípica. Os resultados analisados sugerem que uma mudança de paradigma na interpretação do gênero *Trichoderma*, encarado como um fenômeno biológico, possa vir a trazer novas contribuições para sua compreensão e utilização em benefício da sociedade.

7. LITERATURA CITADA

- ABD-EL MOITY, T.H., PAPAVIDAS, G.C. Induction of new isolates of *Trichoderma harzianum* tolerant to fungicides and their experimental use for control of white rot of onion. *Phytopathology*, v.72, p.396-400, 1982.
- ACINAS, S.G., RODRIGUEZ-VARELA, F., PEDROS-ALIO, C. Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16S rDNA. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v.24, p.27-40. 1997.
- ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W. BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. New York: John Wiley & Sons, 1996. 869p.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, A.A.S., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.*, v.25, p.3389-402, 1997.
- ARISAN-ATAC, I., HEIDENREICH, E., KUBICEK, C.P. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting identifies subgroups of *Trichoderma viride* and other *Trichoderma* sp. capable of chestnut blight biocontrol. *Fems Microbiol. Letters*, v.126, p.246-56, 1995.
- ARRIETA-ESCOBAR, A., BELIN, J.M. Effects of polyphenolic compounds on the growth and cellulolytic activity of a strain of *Trichoderma viride*. *Biotechnology and Bioengineering*, v.24, p.983-9, 1982.
- ASKEW, D.J., LAING, M.D. An adapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* species. *Plant Pathology*, v.42, p.686-90, 1993.
- BAKER, R. Improved *Trichoderma* spp. for promoting crop productivity. *Trends in Biotechnology*, v.7, p.34-8, 1989.
- BAKER, R.H., GATESY, J. Is morphology still relevant? In: DeSALLE, R., GIRIBET, G., WHEELER, W. (Eds.) *Molecular Systematics and Evolution: Theory and Practice*. Switzerland: Birkhäuser-Verlag, 2002. p.163-74.
- BELL D.K., WELLS, H.D., MARKHAM, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, v.72, n.4, p.379-82. 1982.

- BETINA, V., SPISIAKOVÁ, J. Suppression of photo-induced sporulation in *Trichoderma viride* by inhibitors. *Folia Microbiol.*, v.21, p.362-70, 1976.
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. Nov. *Canadian Journal of Botany*, v.62, p.924-31, 1984.
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, v.69, p.2357-72, 1991a.
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachibasium*. *Canadian Journal of Botany*, v.69, p.2373-417, 1991b.
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on Section *Longibrachiatum*. *Canadian Journal of Botany*, v.69, p.2418-20, 1991c.
- BISSET, J., SZACAKS, G., NOLAN, C.A., DRUZHININA, I., GRADINGER, C., KUBICEK, C.P. New species of *Trichoderma* from Asia. *Can. J. Bot.*, v.81, n.6, p.570-86, 2003.
- BRUNS, T.D., WHITE, T.J., TAYLOR, J.W. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v.22, p.525-64, 1991.
- BURGES, A., FENTOM, E. The effect of carbon dioxide on the growth of certain soil fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, v.36, p.104-8, 1953.
- CALDWELL, R. Fate of the spores of *Trichoderma viride* Pers. ex Fr. introduced into soil. *Nature*, v.118, p.1144-5, 1958.
- CAPELLINI, R.A., PETERSON, J.L. Macroconidium formation in submerged cultures by a nonsporulating strain *Giberella zeae*. *Mycologia*, v.57, p.962-6, 1965.
- CARDOSO, E.J.B.N. Ecologia microbiana do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M., NEVES, M.C.P. (Eds.) *Microbiologia do Solo*. Campinas, São Paulo: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. cap.3, p.33-9.
- CBS. *List of Cultures, fungi and yeasts*, 34th ed. Baars, Delft: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1996. 603p.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. *J. Trop. Med. Hyg.*, v.70, p.181-4, 1967.
- CENNIS, J.L. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucl. Acids Res.*, v.20, p.2380, 1992.

- CHANG, P.L., XU, Y., NARASIMHAN, M.I., CHEAH, K.T., D'URZO, M.P., DAMSZ, B., KONONOWICZ, A.K., ABAD, L., HASEGAWA, P.M., BRESSAN, R.A. Induction of pathogen resistance and pathogenesis-related genes in tobacco by a heat-stable *Trichoderma* mycelial extract and plant signal messengers. *Physiologia Plantarum*, v.100, p.341-52, 1997.
- CHAVERRI, P., CASTLEBURY, L.A., OVERTON, B.E., SAMUELS, G.J. *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia*, v.95, n.6, p.1100-40, 2003a.
- CHAVERRI, P., CASTLEBURY, L.A., SAMUELS, G.J., GEISER, D.M. Multilocus phylogenetic structure of *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Mol. Phylogen. Evol.*, v.27, p.302-13, 2003b.
- CHET, I. *Trichoderma* – application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: _____. *Innovative approaches to plant disease control*. New York: Wiley, 1987. p.137-60.
- CHET, I. (Ed.) *Biotechnology in Plant Disease Control*. New York: Wiley-Liss, 1993. 390p.
- COLE, G.T., KENDRICK, W.B. A thin culture chamber for time-lapse photomicrography of fungi at high magnifications. *Mycologia*, v.60, p.340-4, 1968.
- COLE, G.T., RAJ, T.R.N., KENDRICK, W.B. A simple technique for time-lapse photomicrography of microfungi in plate culture. *Mycologia*, v.61, p.726-30, 1969.
- COOK, R.J., BAKER, K.F. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. St. Paul, Minneapolis: American Phytopathological Society, 1983. 539p.
- CORABI-ADELL, C.A. *Utilização de marcadores moleculares RAPD no estudo da variabilidade genética de Laelia (ORCHIDACEAE – subgênero Parviflorae)*. Rio Claro, 1999. 162p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- CORABI-ADELL, C.A., LUCON, C.M., ICHIKAWA, A. Uma técnica simples para observação microscópica de *Trichoderma* spp. (HYPOCREALES) em cultura de lamina. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 16. São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, v.70, supl.3, p.702-6, 2003.
- CURL, E.A., TRUELOVE, B. *The rhizosphere*. Berlin: Springer-Verlag, 1986. 288p.

- DANIELSON, R.M., DAVEY, C.B. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. *Soil Biology and Biochemistry*, v.5, p.505-15, 1973a.
- DANIELSON, R.M., DAVEY, C.B. Nonnutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil Biology and Biochemistry*, v.5, p.495-504, 1973b.
- DANIELSON, R.M., DAVEY, C.B. Effects of nutrients and acidity on phialospore germination of *Trichoderma*. *Soil Biology and Biochemistry*, v.5, p.517-24, 1973c.
- DANIELSON, R.M., DAVEY, C.B. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v.5, p.485-94, 1973d.
- DAVET, P. Technique pour l'analyse des population de *Trichoderma* et *Gliocladium virens* dans le sol. *Annales de Phytopathologie*, v.11, p.529-33, 1979.
- DAVET, P. Parasitic activity of *Trichoderma* clones against sclerotial fungi; correlation with their saprophytic competitive ability in a non-sterile soil. *Agronomie*, v.6, p.863-7, 1986.
- DAVET, P., RAVISÉ, A., BAROUDY, C. La microflore fongique des racines du Haricot au Liban. *Ann. Phytopathol.*, v.12, n.3, p.235-52, 1980.
- DHINGRA, O.D., J.B. Synclair. *Basic Plant Pathology Methods*. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 1985. 355p.
- DICE, L.R. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*, v.26, p.295-302, 1945.
- DODD, S.L., CROWHURST, R.N., RODRIGO, A.G., SAMUELS, G.J., HILL, R.A., STEWART, A. Examination of *Trichoderma* phylogenies derived from ribosomal DNA sequence data. *Mycol. Res.*, v.104, n.1, p.23-34, 2000.
- DODD, S.L., LIECKFELDT, E., SAMUELS, G.J. *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia*, v.95, n.1, p.27-40, 2003.
- DOI, N., DOI, Y. Notes on *Trichoderma* and its allies. 1. A list of teleomorphic species with *Trichoderma* or its allied anamorphs hitherto known. *Bulletin of National Science Museum (Tokyo)*, serie B, v.5, p.117-23, 1979.
- DOI, Y., ABE, Y., SUGIYAMA, J. *Trichoderma* Sect. *Saturnisporum*, sect. nov. and *Trichoderma ghanense*, sp. nov. *Bulletin of National Science Museum (Tokyo)*, serie B, v.13, p.1-9, 1987.

- DOMMERGUES, Y.R., BELSER, L.W., SCHMIDT, E.L. Limiting factors for microbial growth and activity in soil. In: ALEXANDER, M. (Ed.) *Advances in Microbial Ecology*. New York: Plenum Press, 1978, v.2, cap.2, p.49-104.
- DOMSCH, K.H., GAMS, W., ANDERSON, T.H. *Compendium of Soil Fungi*, v.1. London: Academic Press, 1980. v.1, 859p.
- DUMAS, M.T., STRUNZ, G.M., BOYONOSKI, N.W., FINLAY, H.J. *In vitro* interactions between *Cylindrocladium floridanum* and species of *Trichoderma*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v.18, p.325-9, 1996.
- EGGINS, H.O.W., PUGH, G.J.F. Isolation cellulose-decomposing fungi from the soil. *Nature*, v.193, p.94-5, 1962.
- ELAD, Y., CHET, I., HENNIS, Y. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica*, v.9, p.59-67, 1981.
- ELAD, Y., CHET, I., HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, v.28, p.719-5, 1982.
- ELAD, Y., CHET, I. Improved selective media for isolation of *Trichoderma* spp. or *Fusarium* spp. *Phytoparasitica*, v.11, p.55-8, 1983.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, v.39, p.783-91, 1985.
- FIGUEIREDO, M.F. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. *Biologico*, v.33, p.9-15, 1967.
- FITTER, A.H., HARVEY, M.L., NICHOLSON, R. Root system architecture in relation to life history and nutrient supply. *Functional Ecology*, v.2, p.345-51, 1988.
- FITTER, A.H., STICKLAND, T.R. Architectural analysis of plant root systems. 2. Influence of nutrient supply on architecture in contrasting plant species. *New Phytologist*, v.118, p.383-89, 1991.
- FOREYT, W.J., LEATHERS, C.W. *Trichoderma* spp. Infection in the alligator (*Alligator mississippiensis*). *J. Herpet.*, v.19, p.530-1, 1985.
- FUJIMORI, F., OKUDA, T. Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbial screening. I. Fungi. *Journal of Antibiotics of Tokyo*, v.47, p.173-82, 1994.

- FURLANETTO, M.C., PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Intraespecific hybridisation of *Trichoderma pseudokoningii* by anastomosis and by protoplast fusion. *Fems Microbiol. Letters*, v.90, p.191-6, 1992.
- GALLOWAY, L.D., BURGESS, R. 1952. *Applied Mycology and Bacteriology* 3rd.ed. London: Leonard Hill, 1952. p.54-7.
- GAMS, W., MEYER, W. What exactly is *Trichoderma harzianum*? *Mycologia*, v.90, n.5, p.904-15, 1998.
- GAMS, W., BISSETT, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C.P., HARMAN, G.E. (Eds.) *Trichoderma & Gliocladium*. London: Taylor & Francis Ltd., 1998. v.1, chap.1, p.3-34.
- GARCÍA-MARTINEZ, J., ACINAS, S.G., ANTON, A.I., RODRIGUEZ-VALERA, F. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J. Microbiol. Met.*, v.36, p.55-64, 1999.
- GINDRAT, D. Effects de concentrations élevées de sels sur la croissance, la sporulation et la pigmentation de *Trichoderma* spp. *Canadian Journal of Microbiology*, v.23, p.607-16, 1977.
- GIRIBET, G., WHEELER, W.C. On gaps. *Mol. Phylogen. Evol.*, v.13, n.1, p.132-43, 1999.
- GIRIBET, G., WHEELER, W.C., MUONA, J. DNA multiple sequence alignments. In: DeSALLE, R., GIRIBET, G., WHEELER, W. (Eds.). *Molecular Systematic and Evolution*. Switzerland: Birkhäuser Verlag, 2002. p.107-114.
- GLEICK, J. *Chaos: Making a new science*. New York: Penguin Books, 1988. 317p.
- GÓES, L.B., COSTA, A.B.L., FREIRE, L.L.C., OLIVEIRA, N.T. Randomly amplified polymorphic DNA of *Trichoderma* isolates and antagonism against *Rhizoctonia solani*. *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, v.145, n.2, p.151-60, 2002.
- GRESSEL, J.B., HARTMANN, K.M. Morphogenesis in *Trichoderma*: Action spectrum of photoinduced sporulation. *Planta*, v.79, p.271-74, 1968.
- GRESSEL, J.B., RAU, W. Photocontrol of fungal development. p.603-39. In: SHROPSHIRE, W., MOHR, H. (Eds.). *Photomorphogenesis: Encyclopedia of Plant Physiology*. Berlin: Springer-Verlag, 1983. v.16. 832p.

- GRONDONA, I., HERMOSA, M.R., TEJADA, M., GOMIS, M.D., MATEOS, P.F., BRIDGE, P.F., MONTE, E., GARCIA-ACHA, I. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *App. Environ. Microbiol.*, v.63, p.3189-98, 1997.
- GUADET, J., JULIEN, J., LAFAY, J.F., BRYGOO, Y. Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rDNA sequence comparison. *Mol. Biol. Evol.*, v.6, p.227-42, 1989.
- GUARRO, J., ANTOLÍN-AYALA, M.I., GENE, J., GUTIÉRREZ-CALZADA, J., NIEVES-DÍEZ, C., ORTONEDA, M. Fatal case of *Trichoderma harzianum* infection in a renal transplant recipient. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, n.11, p.3751-5, 1999.
- HAGN, A., PRITSCH, K., SCHLOTTER, M., MUNCH, J.C. Fungal diversity in agricultural soil under different farming management systems, with special reference to biocontrol strains of *Trichoderma* spp. *Biol. Fertil. Soils*, v.38, p.236-44, 2003.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, v.41, p.95-8, 1999.
- HANKIN, L., ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production in fungi. *Mycologia*, v.67, p.597-607. 1975.
- HANKIN, L., ANAGNOSTAKIS, S.L. Solid media containing carboxymethyl cellulose to detect cellulase activity of microorganism. *J. Gen. Microbiol.*, v.98, p.109-15. 1977.
- HARKKI, S., MÄNTYLÄ, S., PENTTILÄ, M., MUTTILAINEN, S., BÜHLER, R., SUOMINEN, P., KNOWLES, J., NEVALAINEN, H. Genetic engineering of *Trichoderma* to produce strains with novel cellulase profiles. *Enz. Microbial Technol.*, v.13, p.227-33, 1991.
- HARMAN, G.E., KUBICEK, C.P. (Ed.) *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. London: Taylor & Francis, 1998. v.2, 400p.
- HAWKSWORTH, D.L., KIRK, P.M., SUTTON, B.C., PEGLER, D.N. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of Fungi*. Cambridge: University Press – CAB Int. IMI, 1995. 616p.

- HERMOSA, M.R., GRONDONA, I., ITURRIAGA, E.A., DIAZ-MINGUEZ, J.M., CASTRO, C., MONTE, E., GARCIA-ACHA, I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *App. Environ. Microbiol.*, v.66, n.5, p.1890-8, 2000.
- HOMECHIN, M. *Potencial e emprego de isolados brasileiros de Trichoderma harzianum Rifai para controle de patógenos de soja [Glycine max (L) Merrill]*. Piracicaba, 1987. 183p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Depto. de Fitopatologia, Universidade de São Paulo.
- HUBBARD, J.P., HARMAN, G.E., HADAR, Y. Effect of soilborne *Pseudomonas* spp. on the biological control agent, *Trichoderma hamatum*, on pea seeds. *Phytopathology*, v.73, p.655-9, 1983.
- KIM, J., ROHLF, F.J., SOKAL, R.R. The accuracy of phylogenetic estimation using the neighbor-joining method. *Evolution*, v.47, p.471-86, 1992.
- KINDERMANN, J., EL-AYOUTI, Y., SAMUELS, G.J., KUBICEK, C.P. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA cluster. *Fungal Gen. Biol.*, v.24, p.298-309, 1998.
- KLEIFELD, O., CHET, I. *Trichoderma harzianum* – interaction with plants and effect on growth response. *Plant and Soil*, v.144, p.267-72, 1992.
- KLEIN, D., EVELEIGH, D.E. Ecology of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C.P., HARMAN, G.E. (Eds.) *Trichoderma & Gliocladium*. London: Taylor & Francis Ltd., 1998. v.1, chap.3, p.57-74.
- KNUDSEN, G.R., ESCHEN, D.J. Potential for biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* through colonization of sclerotia by *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*, v.75, n.5, p.466-70, 1991.
- KOMMEDAHL, T., WINDELS, C.E. Introduction of microbial antagonists to specific courts of infection: seeds, seedlings and wounds. In: PAPAIVIZAS, G.C. (Ed.) *Biological Control in Crop Production*, Beltsville Symp. Agr. Res. Totowa, New Jersey: Allanheld, Osmun Co., 1981. v.5, p.227-48.
- KRUEGER, W.W., JOHANSSON, K.R. *Principles of Microbiology*. 2nded. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1959. cap.12, p.189-206.

- KUBICEK, C.P., EVELEIGH, D.E., ESTERBAUER, H., STEINER, W., KUBICEK-PRANZ, E.M. (Ed.) *Trichoderma reesei Cellulases: Biodiversity, Genetics, Physiology and Applications*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1990. 220p.
- KUBICEK, C.P., HARMAN, G.E. (Ed.) *Trichoderma & Gliocladium: Basic biology, taxonomy and genetics*. London: Taylor & Francis, 1998. v.1, 278p.
- KUBICEK-PRANZ, E.M., GRUBER, F., KUBICEK, C.P. Transformation of *Trichoderma reesei* with the cellobiohydrolase II gene as a means for obtaining strains with increased cellulase production and specific activity. *Journal of Biotechnonology*, v.20, p.83-94, 1991.
- KUHLS, K., LIECKFELDT, E., SAMUELS, G.J., KOVACS, W., MEYER, W., PETRINI, O., GAMS, W., BÖRNER, T., KUBICEK, C.P. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, v.93, p.7755-60, 1996.
- KUHLS, K., LIECKFELDT, E., SAMUELS, G.J., MEYER, W., KUBICEK, C.P., BÖRNER, T. Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia*, v.89, p.442-60, 1997.
- KULLNIG, C.M., SZAKACS, G., KUBICEK, C.P. Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycol. Res.*, v.104, n.9, p.1117-25, 2000.
- KULLNIG, C.M., KRUPICA, T., WOO, S.L., MACH, R.L., REY, M., BENÍTEZ, T., LORITO, M., KUBICEK, C.P. Confusion abounds over identities of *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycol. Res.*, v.105, n.7, p.769-72. 2001.
- KULLNIG-GRADINGER, C.M., SZAKACS, G., KUBICEK, C.P. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycol. Res.*, v.106, p.757-67, 2002.
- LATHA, J., VERMA, A., MUKHERJEE, P.K. PCR-fingerprinting of some *Trichoderma* isolates two Indian Type Culture Collections – a need for re-identification of these economically important fungi. *Curr. Sci.*, v.83, n.4, p.372-4, 2002.

- LEWIS, J.A., PAPAVIDAS, G.C. Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma* spp. in liquid and solid growth media. *Soil Biology and Biochemistry*, v.15, p.351-7, 1983.
- LEWIS, J.A., PAPAVIDAS, G.C. Chlamydospore formation by *Trichoderma* spp. in natural substrates. *Canadian Journal of Microbiology*, v.30, p.1-7, 1984.
- LIECKFELDT, E., KUHLS, K., MUTHUMEENAKSHI, S. Molecular taxonomy of *Trichoderma* and *Gliocladium* and their teleomorphs. In: KUBICEK, C.P., HARMAN, G.E. (Ed.) *Trichoderma & Gliocladium*. London: Taylor & Francis Ltd., 1998. v.1, chap.2, p.35-56.
- LIECKFELDT, E., SAMUELS, G.J., BÖRNER, T., GAMS, W. *Trichoderma koningii*: Neotypification and *Hypocrea* teleomorph. *Can. J. Bot.*, v.76, p.1507-22, 1998.
- LOCKWOOD, J.L. Fungistasis in soil. *Biological Review*, v.52, p.1-43, 1977.
- LOEPPKY, C.B., SPROUSE, R.F., EVERETT, E.D. *Trichoderma viride* peritonitis. *South. Med J.*, v.76, p.798-9, 1983.
- LORITO, M., HARMAN, G.E., HAYES, C.K., BROADWAY, R.M., TRONSMO, A., WOO, S.L., DI PIETRO, A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*, v.83, p.302-7, 1993.
- LUMSDEN, R.D., LEWIS, J.A., LOCKE, J.C. Managing soilborne plant pathogens with fungal antagonists. In: R.D. LUMSDEN, J.L. VAUGHN (Eds.). *Pest Management: Biologically Based Technologies*. Washington D.C: American Chemical Society, 1993. p.196-203.
- LUMSDEN, R.D. Mycoparasitism of soilborne plant pathogens. In: CARROLL, G.C., WICKLOW, D.T. (Eds.) *The Fungal Community, Its Organization and Role in the Ecosystem*. New York: Marcel Dekker, 1992. p.275-93.
- MACAULEY, B.J., GRIFFIN, D.M. Effect of carbon dioxide and the bicarbonate ion on the growth of some soil fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, v.53, p.223-8, 1969.
- MANDELS, M., REESE, E.T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J. Bacteriol.*, v.73, p.269-78, 1957.

- MARGOLLES-CLARK, E., HAYES, C.K., HARMAN, G.E., PENTTILA, M. Improved production of *Trichoderma harzianum* endochitinase by expression in *Trichoderma reesei*. *Appl. Env. Microbiol.*, v.62, n.6, p.2145-51, 1996.
- MARTIN, J.P. Use of acid rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Science*, v.134, p.1528-9, 1950.
- MELO, I.S., FAULL, J.L. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. *Scientia Agricola*, v.57, n.1, p.55-9, 2000.
- MELO, I.S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. (Eds.). *Controle Biológico*. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 1998. v.1, p.17-67.
- MEYER, W.R., MORAWETZ, R., BÖRNER, T., KUBICEK, C.P. The use of DNA-fingerprint analysis in the classification of some species of the *Trichoderma* aggregate. *Current Genetics*, v.21, p.27-30, 1992.
- MIGHELI, Q., WHIPPS, J.M., BUDGE, S.P., LYNCH, J.M. Production of inter- and intra-strain hybrids of *Trichoderma* spp. by protoplast fusion and evaluation of their biocontrol activity against soil-borne and foliar pathogens. *Journal of Phytopathology*, v.143, p.91-7, 1995.
- MIRANDA, V.F.O. EASYALIGN v.1.0. Biosciences Institute, Dept. of Botany, Univ. Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2002.
- MITCHELL, C.P., DIX, N.J. Growth and germination of *Trichoderma* spp. under the influence of soil fungistasis. *Transactions of the British Mycological Society*, v.64, p.235-41, 1975.
- MONTENECOURT, B.S., EVELEIGH, D.E. Selective screening for the isolation of high yielding cellulase mutants of *T. reesei*. *Adv. Chem. Ser.*, v.181, p.289-301. 1979.
- MORRELL, J.J. Effects of volatile chemicals on the ability of microfungi to arrest basidiomycetous decay. *Material und Organismen*, v.25, p.267-74, 1990.
- MUNOZ, F.M., DEMMLER, G.J., TRAVIS, W.R., OGDEN, A.K., ROSSMANN, S.N., RINALDI, M.G. *Trichoderma longibrachiatum* infection in a pediatric patient with aplastic anemia. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, n.2, p.499-503, 1997.
- NEI, M. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press, 1987. 512p.

- NEUFELD, P.M., SARQUIS, M.I.M. Preservação em laboratórios de fungos filamentosos pelo método do óleo mineral. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, v.35, n.3, p.147-50, 2003.
- NEI, M., LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v.76, p.5269-73, 1979
- NEVALAINEN, H., SUOMINEM, P., TAIMISTO, K. On the safety of *Trichoderma reesei*. *J. Biotechnol.*, v.37, p.193-200, 1994.
- OKUDA, T., YANAGISAWA, M., FUJIMORI, F., NISHIZUKA, Y., TAKEHANA, Y., SUGIYAMA, M. New isolation methods and polymerase chain reaction strain discrimination techniques for natural products screening programs. *Can. J. Bot.*, v.73, supl.1, S946-54, 1995.
- ORLIKOWSKY, L.B. Studies on the biological control of *Phytophthora cryptogea* Pethybr. et Laff.. II. Effectiveness of *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. in the control of *Phytophthora* foot rot of gerbera. *Journal of Phytopathology*, v.143, p.341-3, 1995.
- OSPINA-GIRALDO, M.D., ROYSE, D.J., THONE, M.R., CHEN, X., ROMAINE, C.P. Phylogenetic relationships of *Trichoderma harzianum* causing mushroom green mold in Europe and North America to other species of *Trichoderma* from worldwide sources. *Mycologia*, v.90, p.76-81, 1998.
- OTT, A., SPENCER-PHILLIPS, P.T.N., WILLEY, N., JOHNSTON, M.A. Topology: a novel method to describe branching patterns in *Peronospora viciae* colonies. *Mycol. Res.*, v.107, n.10, p.1123-31, 2003.
- OUSLEY, M.A., LYNCH, J.M., WHIPPS, J.M. Potential of *Trichoderma* spp. as a consistent plant growth stimulator. *Biology and Fertility of Soil*, v.17, p.85-90, 1994a.
- OUSLEY, M.A., LYNCH, J.M., WHIPPS, J.M. The effects of addition of *Trichoderma* inocula on flowering and shoot growth of bedding plants. *Scientia Horticulturae*, v.59, p.147-55, 1994b.
- PAGE, R.D.M. *TreeView*: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, v.12, p.357-8, 1996.

- PAGE, R.D.M. *TreeView*: Tree drawing software for Apple Macintosh and Microsoft Windows, v. 1.6.6. Institute of Biomedical & Life Sciences, Univ. of Glasgow. Scotl. UK, 1998.
- PAPAVIZAS, G.C., KOVACS, M.F. Stimulation of spore germination of *Thielaviopsis basicola* by fatty acids from rhizosphere soil. *Phytopathology*, v.62, p.688-94, 1972.
- PAPAVIZAS, G.C. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and bean rhizosphere. *Phytopathology*, v.71, p.121-5, 1981.
- PAPAVIZAS, G.C., LUMSDEN, R.D. Improved medium for isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Plant Disease*, v.66, p.1019-20, 1982.
- PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* e *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, v.23, p.23-54, 1985.
- PARKINSON, D., TAYLOR, G.S., PEARSON, R. Studies on fungi in the root region. I. The development of fungi on young roots. *Plant Soil*, v.19, p.322-49, 1963.
- PERSSON, I., TJERNELD, F., HAHN-HÄGERDAL, B. Fungal cellulolytic enzyme production: a review. *Proc. Biochem.*, v.26, p.65-75, 1991.
- PUGH, G.J.F., VAN EMDEN, J.H. Cellulose-decomposing fungi in polder soils and their possible influence on pathogenic fungi. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, v.75, p.287-95, 1969.
- RAYNER, A.D.M. Has chaos theory a place in environmental mycology? In: FRANKLAND, J.C., MAGAN, N., GADD, G.M. (Eds.) *Fungi and Environmental Change*. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1996. chap.19, p.317-341.
- REHNER, S.A., SAMUELS, G.J. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research*, v.98, p. 625-34, 1994.
- REHNER, S.A., SAMUELS, G.J. Molecular systematics of the *Hypocreales*: a teleomorph gene phylogeny and the status of their anamorphs. *Canadian Journal of Microbiology*, v.73, suppl. 1, S.816-S823, 1995.
- RICHTER, S., CORMICAN, M.G.; PFALLER, M.A., LEE, C.K., GINGRICH, R., RINALDI, M.G., SUTTON, D.A. Fatal disseminated *Trichoderma longibrachiatum* infection in an adult bone marrow transplant patient: species identification and review of the literature. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, n.4, p.1154-60, 1999.

- RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*, v.42, p.265-70, 1950.
- RIDOUT, C.J., COLEY-SMITH, J.R., LYNCH, J.M. Enzyme activity and electrophoretic profile of extracellular protein induced in *Trichoderma* spp. by cell walls of *Rhizoctonia solani*. *Journal of General Microbiology*, v.132, p.2345-52, 1986.
- RIFAI, R.W. A revision of the genus *Trichoderma*. *C.M.I. - Mycological Papers*, v.116, p.1-56, 1969.
- ROHLF, F.J. *NTSYSpc v. 2.0: User Guide*. New York: Exeter Software, 1998. 31p.
- ROIGERS, D.J., JEFFERS, S.N. Evaluation of *Trichoderma* spp. for biological control of *Phytophthora* crown and root rot of apple seedlings. *Phytopathology*, v.81, p.910-7, 1991.
- ROIGERS, D.J., JEFFERS, S.N., CALDWELL, R.W. Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v.23, p.352-9, 1991.
- ROS-BARCELÓ, A., ZAPATA, J.M., CALDERÓN, A.A. A basic peroxidase isoenzyme, marker of resistance against *Plasmopara viticola* in grapevines, is induced by an elicitor from *Trichoderma viride* in susceptible grapevines. *Journal of Phytopathology*, v.144, p.309-13, 1996.
- SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, v.4, p.406-25, 1987.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Press, 1989. 3v.
- SAMUELS, G.J., PETRINI, O., MANGUIN, S. Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia*, v.86, n.3, p.421-35, 1994.
- SAMUELS, G.J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.*, v.100, n.8, p.923-35, 1996.
- SAMUELS, G.J., LIECKFELDT, E., NIREMBERG, H.I. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription *T. viride*. *Sidowia*, v.51, p.71-88, 1999.

- SAMUELS, G.J., PARDO-SCHULTHEISS, R.A., HEBBAR, K.P., LUMSDEN, R.D., BASTOS, C.N., COSTA, J.C., BEZERRA, J.L. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycol. Res.*, v.104, p. 760-4, 2000.
- SAMUELS, G.J., DODD, S.L., GAMS, W., CASTLEBURY, L.A., PETRINI, O. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, v.94, p.146-70, 2002.
- SAMUELS, G.J. *Trichoderma: A guide to identification and biology*. Beltsville: USDA/ARS, 2004. 54p. illus. (Apost.)
- SAMUELS, G.J., CHAVERRI, P., FARR, D.F., MCCRAY, E.B. (n.d.) *Trichoderma* Online, Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA. (<http://nt.ars-grin.gov>), 2004.
- SANTOS, I.C. *Avaliação da variabilidade genética de Trichoderma por isoenzimas, RFLP e RAPD*. Piracicaba, 1992. 92p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Depto. Genética e Melhoramento de Plantas – Universidade de São Paulo.
- SCHAFFNER, D.W., TOLEDO, R.T. Cellulase production by *Trichoderma reesei* when supplemented with sorbose. *Biotechnology and Bioengineering*, v.37, p.12-6, 1991.
- SHUKLA, D.D., MISHRA, A. Effects of salts on growth of *Trichoderma viride*. *Friesia*, v.9, p.299-301, 1970.
- SIVAN, A., CHET, I. Biologic control of *Fusarium* spp. in cotton, wheat and muskmelon by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Phytopathology (Berlin)*, v.116, p.39-47, 1986.
- SIVAN, A., CHET, I. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *Journal of General Microbiology*, v.135, p.675-82, 1989.
- SMITH, D., ONIONS, A.H.S. *The Preservation and Maintenance of Living Fungi*. 2nd ed. Wallingford: CAB International, 1994. 122p.
- SMITH, V.L., WILCOX, W.F., HARMAN, G.E. Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology*, v.80(9), p.880-5, 1990.
- SNEATH, P.H.A., SOKAL, R.R. *Numerical Taxonomy*. San Francisco: Freeman, 1973. 573p.

- SWOFFORD, D.L., OLSEN, G.J., WADELL, P.J., HILLIS, D.M. Phylogenetic Inference. In: D.M. HILLIS, MORITZ, C., MABLE, B.K. (Eds.) *Molecular Systematics*. 2nd. ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc., 1996. Cap. 11, p.407-25.
- SWOFFORD, D.L. *PAUP* v.4: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods)*. Massachusetts: Sinauer Associates, 2002. 142p.
- TAUB, D.R., GOLDBERG, D. Root system topology of plants from habitats differing in soil resource availability. *Functional Ecology*, v.10, p.258-64, 1996.
- TEATHER, R.M., WOOD, P.J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Env. Microbiol.*, v.43, n.4, p.777-80, 1982.
- THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.*, v.24, p.4876-82, 1997.
- TUITE, J. *Plant Pathological Methods – Fungi & Bacteria*. Minneapolis: Burgess Publishing Co., 1969. 239pp.
- TURNER, D., KOVACS, W., KUHL, K., LIECKFELDT, E., PETER, B., ARISAN-ATAC, I., STRAUSS, J., SAMUELS, G.J., BÖRNER, T., KUBICEK, C.P. Biogeography and phenotypic variation in *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* and associated *Hypocreae* species. *Mycol. Res.*, v.101, n.4, p.449-59, 1997.
- TYE, R.J., WILLETTS, A.J. Fungal growth on methanol. *J. Gen. Microbiol.*, v.77, 1P, 1973.
- TYE, R.J., WILLETTS, A.J. Fungal growth on C1 compounds: quantitative aspects of growth of a methanol-utilizing strain of *Trichoderma lignorum* in batch culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.33, p.758-61, 1977.
- VALENTIN, J.L. *Ecologia Numérica*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2000. 117p.
- VILGALYS, R., HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, v.172, p.4238-46, 1990.

- WEINDLING, R. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology*, v.24, p.1153-40, 1934.
- WELLS, H.D. *Trichoderma* as a biocontrol agent. In: MUKERJI, K.G., GARG, K.L. (Ed.) *Biocontrol of Plant Disease*. Boca Raton: CRC Press, 1988. 211p.
- WELLS, H.D., BELL, D.K., JAWORSKI, C.A. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, v.62, p.442-7, 1972.
- WHEELER, W.C., GLADSTEIN, D.S. MALIGN: a multiple sequence alignment program. *J. Hered.*, v.85, p.417-8, 1994.
- WHEELER, W.C., GLADSTEIN, D.S. MALIGN ver. 2.7, *American Museum of Natural History*, New York, NY, U.S.A. 1995.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A., GELFAND, J.J., SNINSKY, T.J., WHITE, (Eds.) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990. p.315-22.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.*, v.18, p.6531-5, 1990.
- WINDHAM, M.T., ELAD, Y., BAKER, R. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, v.76, p.518-521, 1986.
- WITTAKER, R.H. New concepts of kingdoms of organisms. *Science*, v.163, p.150-60, 1969.
- XIONG, H. *Production and characterization of Trichoderma reesei and Thermomyces lanuginosus xylanases*. Helsinki, 2004. 46p. Thesis (Doctor of Science in Technology) – Dept. of Chemical Technology, Helsinki, University of Technology.
- XU, J., NOGAWA, M., OKADA, H., MORIKAWA, Y. Regulation of *xyn3* gene expression in *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.54, p.370-75, 2000.
- YAP, I.V., NELSON, R.J. *WinBoot*: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA based programs. *IRRI Discussion Papers*, n.14, 22p. 1996.

ZIMAND, G., VALINSKY, L., ELAD, Y., CHET, I., MANULIS, S. Use of the RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. *Mycological Research*, v.98, p.531-4, 1994.

ANEXOS

ANEXO 1

Ficha de Coleta e Identificação de Amostras



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
 COORDENADORIA DA PESQUISA AGROPECUÁRIA
 INSTITUTO BIOLÓGICO
 Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal

FICHA DE COLETA – REGISTRO
 COLETA: ____ /2001

Projeto: IB ____ / ____
 FAPESP ____ / ____

1. Dados Gerais

autor da coleta _____ data _____
 propriedade _____ proprietário/funcionário _____
 endereço _____ município _____ UF ____
 tel./email _____
 coordenadas: latitude _____ longitude _____
 altitude _____ m precisão GPS ____ f
 área plantada _____ cultura(s) _____

2. Dados Ambientais

unidade de conservação _____ ambiente terrestre
 ecossistema _____ habitat/localização geral _____
 microhabitat/localização particular _____
 proximidade de mata nativa _____ m
 método da coleta _____

3. Dados Agronômicos

cultura _____ cultivar _____ ciclo da cultura ____ dias
 início do plantio ____ culturas anteriores (5 anos) _____
 sistema de plantio _____ tipo de solo/substrato _____
 análise química/física _____ pH ____
 origem das mudas/sementes _____
 adubação-calagem/época _____
 agroquímicos/época/método _____
 ocorrência de pragas/doenças _____

4. Informações adicionais _____

ANEXO 2

**“Uma técnica simples para observação para observação microscópica de
Trichoderma spp. (HYPOCREALES) em cultura de lâminas”**

UMA TÉCNICA SIMPLES PARA OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA DE
Trichoderma spp. (HYPOCREALES) EM CULTURA DE LÂMINAS

C. Corabi-Adell^{1,2}, C.M. Lucon¹, A. Ichikawa¹

¹CPDSV, Instituto Biológico, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, 04014-002, São Paulo, SP;

²Doutorando UNESP, IBC, Depto. Biologia, Av. 24A, 1515, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.
Email: ccorabi@terra.com.br

RESUMO

Com o objetivo de facilitar a observação microscópica de isolados de *Trichoderma* spp. uma modificação da técnica de cultura em lâmina de Riddell foi aqui descrita e ilustrada graficamente. Foram observadas 5 espécies de referência do gênero *Trichoderma*, pertencentes às Seções *Pachybasium*, *Trichoderma* e *Longibrachiatum*, analisando-se o comportamento dos isolados nos meios de batata dextrose, extrato de malte (2% e 4%) e ágar água (2%), e outras técnicas convencionalmente utilizadas na taxonomia de fungos. Os resultados demonstraram que a técnica desenvolvida foi a melhor, pois permitiu a visualização com bastante clareza das estruturas morfológicas das espécies observadas.

PALAVRAS-CHAVE: *Trichoderma*, taxonomia, técnica microscópica

ABSTRACT

With the objective to facilitate the microscopic observation of *Trichoderma* spp. morphological characteristics we are proposing a modification in the Riddell technique. It was observed five reference species of the genus *Trichoderma* belonging to the Sections: *Pachybasium*, *Trichoderma* and *Longibrachiatum*. The observations were done in the PDA, Malt extract agar (MEA) (2% e 4%) and water agar media. We compared the modified technique with the two more routinely used ones in filamentous fungal taxonomy. The results showed that the developed technique was the best one because allowed a very clear observation of the morphological structures of all species used. The physiological principals involved and the advantages in relation to the other techniques were discussed in this paper

KEY WORDS: *Trichoderma*, taxonomy, microscopic technique

INTRODUÇÃO

O gênero *Trichoderma* (*Hypocreales*) inclui espécies com grande potencial biotecnológico. Entre as aplicações de importância econômica destacam-se produção de enzimas, antibióticos, agentes de biodegradação, bem como o seu importante papel como agente de controle biológico de doenças de planta. Tem sido evidenciada também a sua importância na degradação de xenobióticos no solo (SMITH, 1995). A taxonomia do grupo é baseada atualmente em caracteres morfológicos (RIFAI, 1969; BISSET, 1991) e complementarmente através de caracteres moleculares (SAMUELS, 1996). Os principais caracteres considerados são: forma, dimensões, coloração, ornamentação dos conídios, padrão de ramificação dos conidióforos e presença de prolongamentos de hifa estéreis ou férteis, a partir dos conidióforos (RIFAI, 1969; BISSET, 1991). Com base nos caracteres morfológicos, aliando-se ainda características da colônia em meios específicos, o número de espécies descritas atualmente chega a 29, incluindo as espécies agregadas (GAMS & BISSET, 1998). Além disso, há evidências que os *taxa* definidos morfológicamente sejam polifiléticos (ZIMAND *et al.*, 1994), o que torna mais complexa e subjetiva a taxonomia do grupo. Estes fatos sugerem que apenas os caracteres morfológicos convencionais, junto com as características de colônia, não sejam suficientemente confiáveis para uma descrição robusta de determinadas espécies. Atualmente diversos artigos, envolvendo a análise de seqüências gênicas específicas têm contribuído para elucidar alguns casos (OSPINA-GIRALDO *et al.*, 1998, DODD *et al.*, 2000). Apesar disso, a análise micológica convencional, a qual depende da observação experimental *in vivo* para a análise e descrição das espécies, permanece imprescindível no caso do gênero em questão, carecendo, entretanto, de uma padronização experimental mais consistente e com reprodutibilidade.

O presente estudo foi conduzido com o intuito de desenvolver uma técnica de cultura em lâmina para o estudo microscópico de *Trichoderma*, de forma a permitir uma observação mais nítida e

precisa além de um acompanhamento efetivo do crescimento micelial, formação e ramificação de conidióforos e conidiogênese. Também se pretendeu padronizar uma metodologia que permitisse trabalhar com espécies com velocidades e intensidade de crescimento distintas, simultaneamente, sem alterar o procedimento experimental e que prolongasse também o período ótimo de observação.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados de *Trichoderma* spp.

Para o experimento cinco espécies foram selecionadas da Coleção de Referência de *Trichoderma*, Instituto Biológico de São Paulo, compondo um grupo com padrões morfológicos e de crescimento variados (Quadro 1).

Quadro 1. Classificação dos isolados de *Trichoderma* spp. utilizados no presente estudo:

Código	Espécie	Seção	Origem / Acesso
IB-04	<i>T. longibrachiatum</i> Rifai	<i>Longibrachiatum</i>	IMI 302407
IB-07	<i>T. harzianum</i> Rifai	<i>Trichoderma</i>	IMI 373510
IB-08	<i>T. koningii</i> Oud.	<i>Trichoderma</i>	IMI 361084
IB-14	<i>T. stromaticum</i> Samuels & Pardo-Schultheiss	<i>Pachybasium</i>	IMI 373517
IB-17	<i>T. virens</i> (J. Miller, Giddens & Foster) von Arx	<i>Pachybasium</i>	IMI 45553=ATCC 9645

Meios de Cultura

Os meios BDA (batata-dextrose-agar), AA (agar água 2%) e MEA (agar extrato de malte) nas concentrações de 2% e 4% foram testados nos diferentes tratamentos para verificar a estabilidade do micélio e estruturas.

Técnicas de Cultura em Lâmina

No primeiro tratamento foi utilizado o método de Riddell (1950) que consiste na colocação de um pequeno bloco de agar, aproximadamente 6 x 6 x 2mm, no centro de uma lâmina esterilizada. Após a semadura nos quatro lados, uma laminula maior que o bloco foi depositada sobre ele. Na etapa de observação, tanto a laminula como a lâmina, após a remoção do bloco de agar, foram utilizadas para visualização das estruturas, utilizando como corante azul de algodão em ácido láctico conforme RIFAI (1969). No segundo tratamento os meios foram vertidos com auxílio de uma pipeta estéril sobre a superfície das lâminas, originando uma fina e lisa camada de agar onde os isolados foram semeados em um único ponto. O terceiro tratamento constou da colocação de dois segmentos do meio de cultura (aprox. 6 x 30 x 1-2mm) dispostos paralelamente ao longo de uma lâmina estéril, mantendo-se a distância entre eles de 5mm. Uma laminula foi depositada sobre uma das extremidades dos segmentos, conforme ilustra a Figura 1, ultrapassando 2-3mm os blocos de meio de cultura, sendo os fialoconídios semeados alternadamente conforme indicado pelas setas. Os três sistemas foram mantidos em câmara úmida esterilizada, ou seja, dentro de placas de Petri sobre um disco de papel filtro embebido em solução de glicerol 20% e incubadas no escuro a 28°C. As observações iniciaram 48h após para acompanhamento da ramificação do micélio e formação das fialides, em microscópio óptico comum (400X). As fotos digitais foram obtidas em microscópio de contraste de fase (*Nikon, Eclipse E200*).

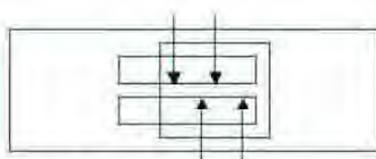


Figura 1. a) Representação esquemática do novo modelo de cultura em lâmina. Os pontos assinalados indicam o local de semeadura e b) fotomicrografia do isolado IB-04 mostrando o sistema de ramificação das fialides típico da Seção *Longibrachiatum*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 1. Dos meios testados, os que permitiram uma melhor observação do desenvolvimento das estruturas morfológicas, em todos os tratamentos, foram os meios BDA e MEA 2% e 4%, sendo esse último meio a 4% ligeiramente superior. Quanto ao fato deles terem propiciado uma maior conidiogênese em alguns isolados, é importante citar que esta foi observada quase que somente nas porções expostas dos blocos e na superfície externa dos mesmos. Além disso, este fato não impediu uma distribuição gradual no interior da canaleta no tratamento 3, ambos podendo ser utilizados satisfatoriamente.

Tabela 1. Avaliação dos isolados IB-04, IB-07, IB-08, IB-14 e IB-17, submetidos aos Tratamentos (1) e (3), em diferentes meios de cultura.

Critério de avaliação: (a) *Aspecto da Hifa:* ausência=0, colapsada=1, alterada=2, íntegra=3; (b) *Crescimento Micelial:* pouco ou nenhum=1, médio=2, denso=3; (c) *Sistema de Ramificação do Conidióforo:* nenhum=0, adensado com difícil visualização=1, médio=2, esparsos com boa visualização=3; (d) *Fialoconidiogênese:* pouca/nenhuma=1, média=2, alta=3; (e) *Clamidósporos:* presentes (+), ausentes (-); t=terminais; i=intercalares.

Tratamento →	Meios	IB-04		IB-07		IB-08		IB-14		IB-17	
		(1)	(3)	(1)	(3)	(1)	(3)	(1)	(3)	(1)	(3)
a) Aspecto da Hifa	BDA	3	3	2	3	1	3	3	3	2	3
	AA	0	3	1	3	1	3	3	3	2	3
	MEA 2%	2	0	3	3	3	3	3	3	3	2
	MEA 4%	3	3	3	3	2	3	3	3	3	2
b) Crescimento Micelial	BDA	3	3	3	3	3	3	1	2	2	3
	AA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	MEA 2%	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1
	MEA 4%	3	2	2	3	3	3	2	2	2	3
c) Sistema de Ramificação do Conidióforo	BDA	1	3	3	1	3	1	1	3	3	1
	AA	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	MEA 2%	0	0	3	3	3	3	3	3	0	3
	MEA 4%	1	1	0	1	3	3	3	3	3	1
d) Fialoconidiogênese	BDA	3	2	3	3	2	3	1	1	1	1
	AA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	MEA 2%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	MEA 4%	3	1	2	3	2	3	1	1	1	2
e) Clamidósporos	BDA	-	-	-	-	-	-	-	-	+(t)	-
	AA	-	-	+	-	-	-	-	-	+(t)	+(t)
	MEA 2%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+(t)
	MEA 4%	-	-	-	-	-	-	-	-	+(t)	+(t)

Os melhores tratamentos foram, sem dúvida, os de número 1 e 3. Isso porque o micélio aéreo formado permitiu visualizar de forma mais satisfatória as estruturas fialídicas. No tratamento 2 não foi possível uma focalização exata do plano de observação, ou seja, não foi possível uma visualização adequada. Isso devido tanto ao crescimento rápido e generalizado como à homogeneidade na distribuição das estruturas formadas, principalmente nos meios BDA e MEA. É importante notar que para uma perfeita observação das estruturas fialídicas é necessário captar o início da conformação do sistema de ramificação do conidióforo. Como esse processo, uma vez iniciado, ocorre rápida e simultaneamente, o que varia dependendo da espécie e condições de cultura, fica difícil estabelecer um momento ideal de observação para os diferentes isolados. Nesse sentido o tratamento 3 foi superior por favorecer uma observação mais nítida e consistente em relação ao tratamento 1 e 2 nos três períodos avaliados, facilitando o acompanhamento simultâneo dos isolados com comportamentos variados de diferenciação. É provável que isso tenha sido possível devido ao fato da canaleta ter restringido a circulação de ar na região periférica à superfície dos blocos de meio de cultura, originando um gradiente de

centro inferior da laminula em direção às saídas. Assim, na medida que o micélio foi se desenvolvendo em direção às extremidades uma indução diferencial foi ocorrendo. A condição de maior umidade, decorrente da menor exposição ao ambiente parece ter contribuído para a melhor preservação das estruturas.

Em relação à formação de clamidósporos puderam ser observados somente nos isolados IB-07 e IB-17. Entretanto por questões metodológicas não foi possível concluir se sua formação se deveu a aspectos nutricionais do meio de cultura, fatores externos ou mesmo características intrínsecas dos mesmos, conforme aponta PAPAIVIZAS (1985).

CONCLUSÃO

Os resultados observados indicam que a modificação proposta para a técnica de RIDDELL (1950) produziu os efeitos desejados para uma observação morfológica adequada e rotineira de fungos do gênero *Trichoderma* e pode ser utilizada satisfatoriamente para a maioria das espécies descritas. O método também pode ser utilizado para o acompanhamento de processos de diferenciação de estruturas específicas, no qual microfotografias na região da canaleta podem ser feitas em intervalos específicos, de maneira menos trabalhosa e onerosa do que aquele proposto por COLE *et al.* (1969), descrito para esta finalidade. Além disso, possibilita a visualização de diferentes condições e planos, quer seja sobre o ágar ou sobre a laminula.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Mário Barreto Figueiredo, do Laboratório de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico, por disponibilizar o equipamento microscópico e fotográfico para este estudo e à FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can. J. Bot.*, v.69, p.2357-2372, 1991a.
- COLE, G.T.; NAG-RAJ, T.R.; KENDRICK, W.B. A simple technique for time-lapse of photomicrography of microfungi in plate culture. *Mycologia*, v.61, p.726-730, 1969.
- DODD, S.L.; CROWHURST, R.N.; RODRIGO, A.G.; SAMUELS, G.J.; HILL, R.A.; STEWART, A. Examination of *Trichoderma* phylogenies from ribosomal DNA sequence data. *Mycol. Res.*, v.104, n.1, p.23-34, 2000.
- GAMS, W.; BISSETT, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. Ch.1. In: *Trichoderma & Gliocladium*, ed. C.P. KUBICEK and G.E. HARMAN. Taylor & Francis Ltd.: London. 278pp. 1998.
- OSPINA-GIRALDO, M.D.; ROYSE, D.J.; THON, M.R.; CHEN, X.; ROMAINE, C.P. Phylogenetic relationships of *Trichoderma harzianum* causing mushroom green mold in Europe and North America to other species of *Trichoderma* from world-wide sources. *Mycologia*, v.90, p.76-81, 1998.
- RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*, v.42, p.265-270, 1950.
- RIFAÍ, M.A. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.*, v.116, p.1-116, 1969.
- PAPAIVIZAS, G.C. *Trichoderma* e *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.*, v.23, p.23-54, 1985.
- SAMUELS, G.J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.*, v.100, p.923-935, 1996.
- SMITH, W.H. Forest occurrence of *Trichoderma* species: emphasis on potential organochlorine (xenobiotic) degradation. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, v.32, p.179-183, 1995.
- ZIMAND, G.; VALINSKY, L.; ELAD, Y.; CHET, I.; MANULIS, S. Use of RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. *Mycol. Res.*, v.98, p.531-534, 1994.

ANEXO 3

**Atlas de Identificação das Principais Espécies de *Trichoderma*
(parcial, ref. SAMUELS et al., 2004)**

T. spirale # 1

Colony radius on PDA in darkness for 72 h, 25-30 C 45-55 mm diam, 30 mm at 20 C, temperature optimum 30 C, not growing at 35 C; conidia forming at 72-96 h at 25-30 C in more or less distinct concentric rings, a yellow pigment tending to diffuse through the agar within 48 h in darkness at 25-30 C. No distinctive odor noted. Colonies grown two weeks on CMD, 20-21 C, 12 h darkness/12 h cool white fluorescent light with pustules forming around the periphery of the colony and a synanamorph forming abundantly in the aerial mycelium; no pigment or odor noted on CMD.

Pustules typically formed on CMD, pulvinate to subglobose, gray-green, 0.5-2.0(-3.5) x 0.5-1.5(-3.0) mm, compact, easily removed from the culture, with sterile hairs conspicuously arising from the entire pustule.

Fertile extensions of conidiophores absent or infrequently produced.

Sterile hairs conspicuous, typically spiraled or sinuous, septate, thin-walled, infrequently branched, subacute at the tip.

Conidiophores on CMD typically comprising a sterile hair from the base of which arise short, broad fertile branches. Fertile branches progressively longer with distance from the tip of the sterile hair, the shortest branches comprising 2-3 cells from which arise a few secondary branches that . comprise 1-2 cells; the secondary branches may rebranch to form single-celled fertile branches; phialides arise singly, directly from any of the branches, or they arise in whorls at the ends of branches; phialides often doliform when clustered in grape-like fashion, when not densely clustered they are ampulliform. The cell from which phialides arise (2.5-)3.0-4.5(-5.7) μ m wide.

Phialides arising from secondary branches in dense clusters, doliform, (3.2-)4.5-6.5(-8.3) μ m long, L/W = (1.0-)1.3-2.0(-2.7), (2.7-)3.0-3.8(-4.6) μ m wide at the widest point, (1.5-)2.0-3.0(-4.2) μ m wide at the base, arising from a cell (2.7-)3.0-4.5(-6.0) μ m wide.

Intercalary phialides not formed.

Conidia on CMD green, oblong to narrowly ellipsoidal, 3.5-4.5 x (2.0-)2.5-3.0(-3.7) μ m, L/W = 1.4-1.5, smooth.

Chlamydospores typically abundant on CMD, intercalary, often forming in chains of several, globose to subglobose, minute, (4.5-)7.0-15.0(-22) μ m diam.

Synanamorphs abundant in the aerial mycelium, conidiophores mononematous, 50-100 μ m long, bearing a single, terminal vertical or penicillus of phialides. Phialides cylindrical to slightly swollen in the middle, , (6.8-)8.0-15.0(-22.0) μ m long, (2.0-)2.5-3.5(-4.5) μ m in the middle, (1.5-)2.0-2.5(-3.5) μ m wide at the base, arising from a cell (1.5-)2.2-3.2(-4.0) μ m wide, tip often flared and sometimes pigmented green. Conidia of synanamorph ellipsoidal, (3.4-)4.0-5.0(-6.2) x (2.2-)3.0-3.5(-4.0) μ m.

Stromata not formed.

Stroma surface not known.

Asci not known.

Part-ascospores not known.

Nomenclator: *Trichoderma spirale* Bissett, Canad. J. Bot. 69: 2408, Figs. 112-120. 1991.

Habitat: Soil, endophytic within trunks of *Theobroma cacao* trees.

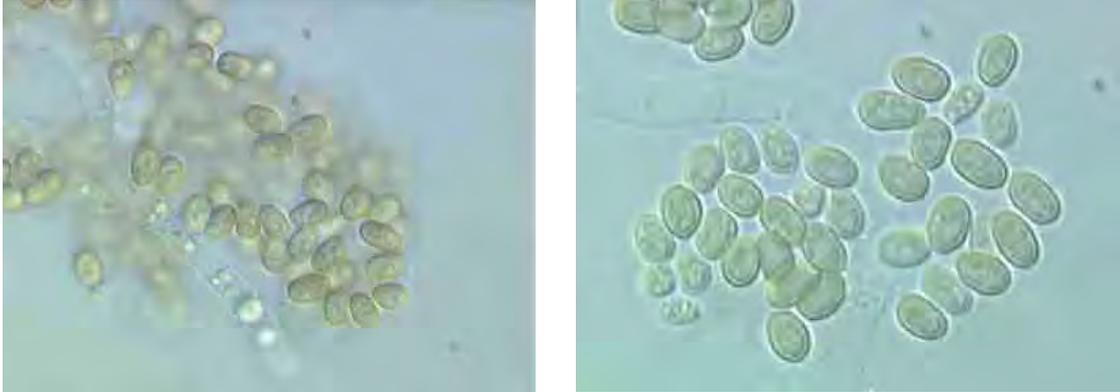
Known distribution: Cosmopolitan.

Distribution records from the SBML [Fungus-Host database](#):

Trichoderma spirale - soil: Costa Rica - [33355](#); NC - [33355](#); Thailand - [33355](#). unknown: Canada, Quebec - [33355](#)

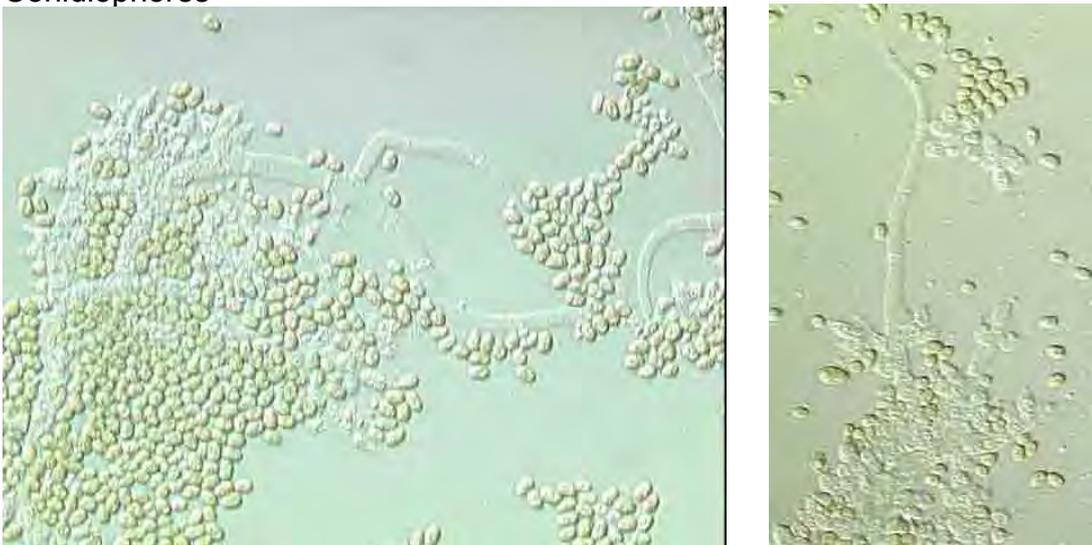
T. spirale # 2

Conidia



Conidia formed in (produced from) pustules of *Trichoderma spirale* are oblong and smooth.

Conidiophores



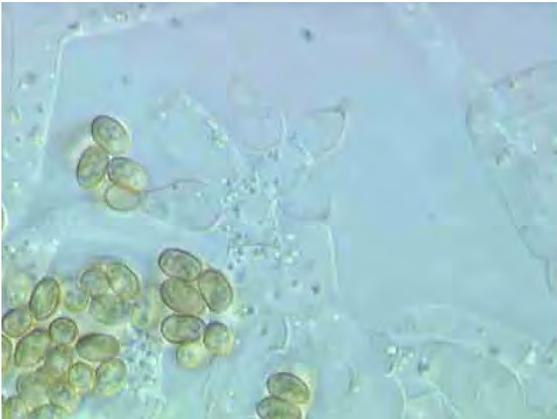
Conidiophores of *Trichoderma spirale* comprise an infrequently branched sterile part with fertile branches arising at its base.



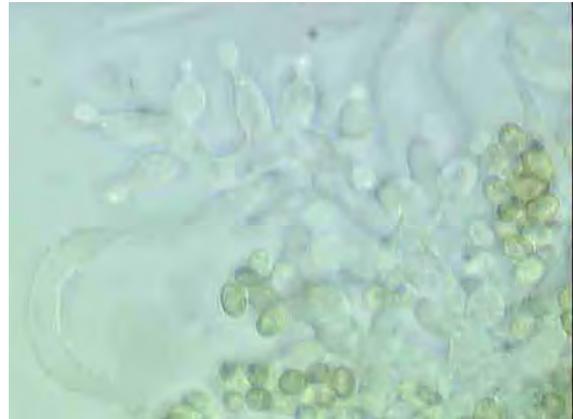
Conidiophores of *T. spirale* typically a sterile hair with fertile branches at the base.

T. spirale # 3

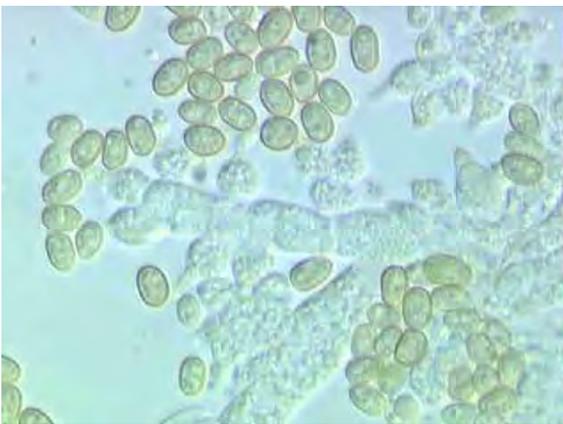
Phialides



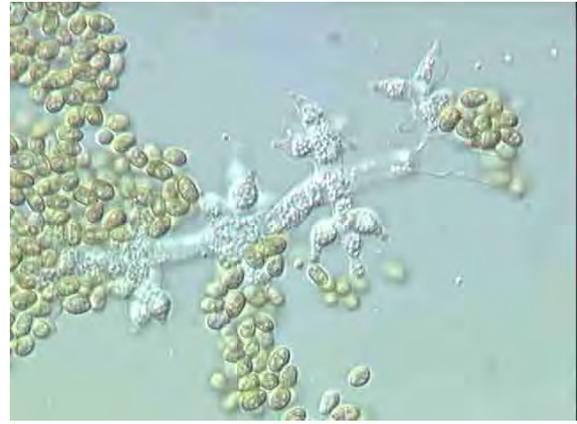
Phialides of *Trichoderma spirale* are often doliform and arise from broad cells.



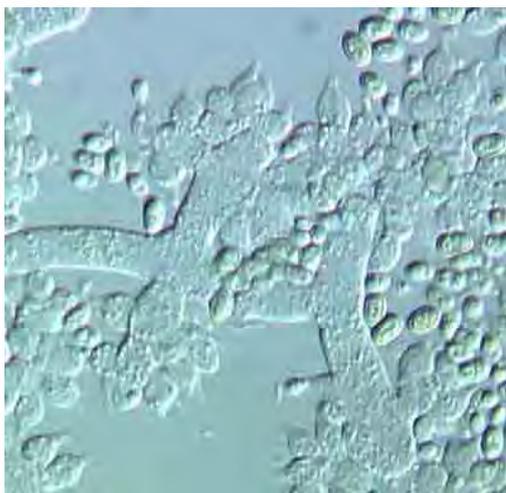
Phialides of *T. spirale* often arise directly from fertile branches and are ampulliform to doliform.



Phialides of *T. spirale* are doliform when crowded. Often they arise directly from broad branches.



Phialides of *T. spirale* are often formed in whorls at the tips of short branches. They are ampulliform when not crowded.



Phialides of *T. spirale* are often clustered the ends of short and broad branches, then the phialides are doliform.



Phialides of *T. spirale* are short and broad clustered at the tips of short branches. When phialides are not densely clustered, they are ampulliform.

T. spirale # 4

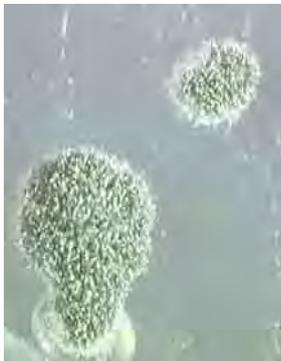
Pustules



Conidia of *T. spirale* formed on CMD are typically held in pustules. Adjacent pustules may become confluent. They are easily removed from the agar.



Conidia of *T. spirale* typically form in discrete pustules.



Spiraled sterile hairs arise from the pustules.

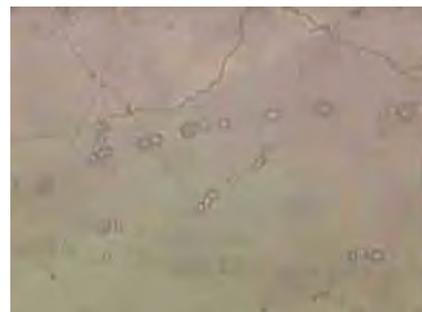


Sterile hairs are conspicuously produced from pustules of *T. spirale*. A synanamorph is typically formed in the aerial mycelium apart from the pustules.

Chlamydospores



Chlamydospores of *T. spirale* are typically abundant on CMD and intercalary within hyphae.



They are typically abundant in *T. spirale* intercalary and globose to subglobose.



Chlamydospores are typically abundant in *T. spirale*, intercalary and globose to subglobose.



T. spirale # 5

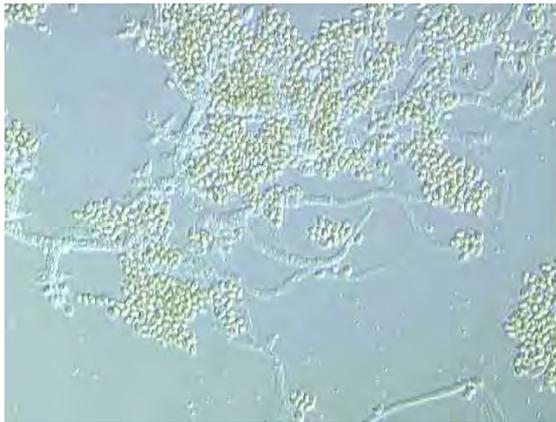
Sterile Hairs



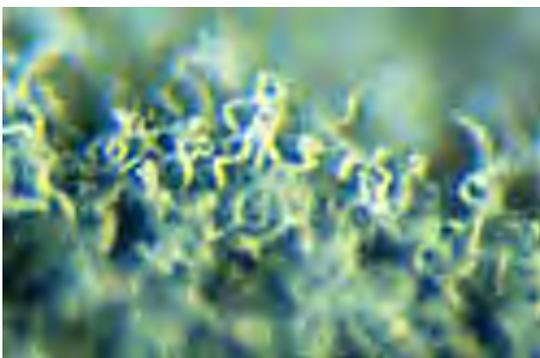
The hairs arising from pustules of *T. spirale* are typically sterile, but sometimes may bear a phialide at the tip.



Occasionally the sterile hair of *T. spirale* bears one or a few phialides at its tip.



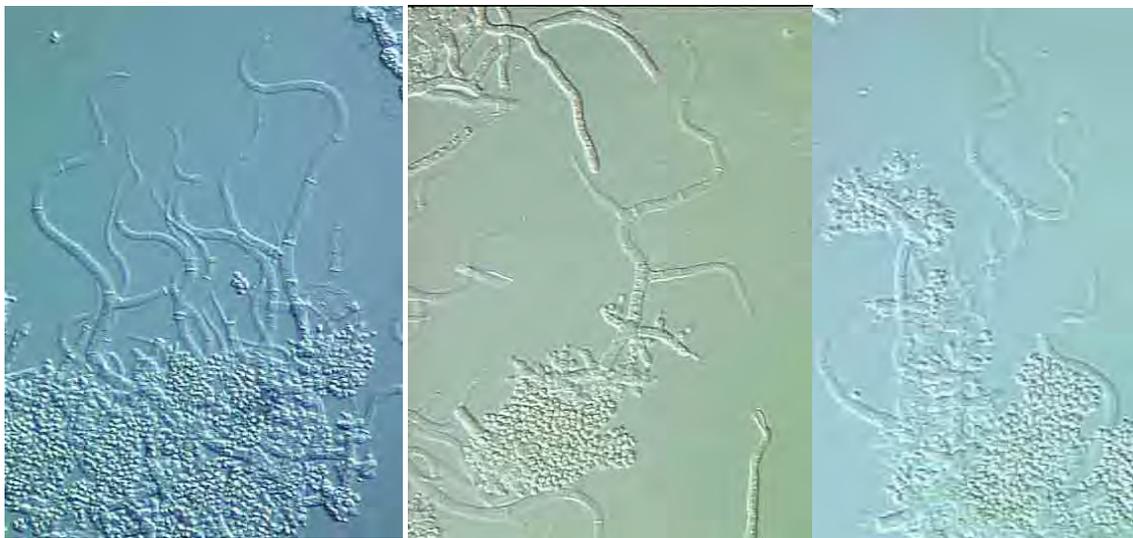
Sterile hairs of *T. spirale* typically are spiraled and bear fertile branches at the base.



Sterile hairs of *Trichoderma spirale* are typically spiraled.

T. spirale # 6

Sterile Hairs



Sterile hairs of *T. spirale* are typically spiraled. Fertile branches arise at the base of the sterile hairs.



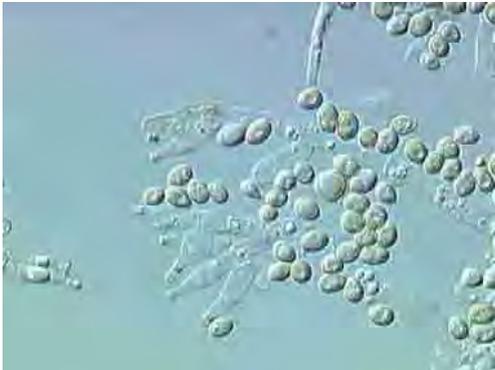
Sterile hairs of *T. spirale* are typically spiraled.



Fertile branches arise at the base of the sterile hairs.

T. spirale # 7

Synanamorphs



Phialides of the synanamorph of *T. spirale* are slightly swollen in the middle. The tip is often flared and pigmented green.



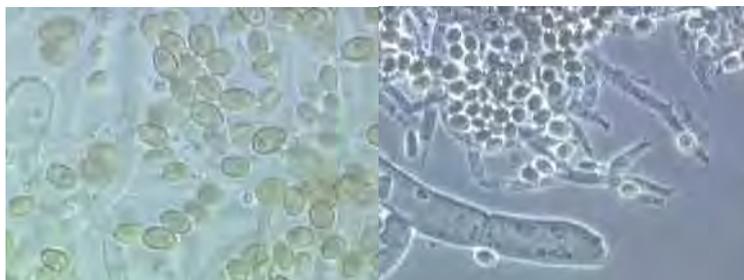
Conidiophores of the synanamorph of *T. spirale* are typically verticillately branched, but sometimes branching is very irregular.



Conidia of the synanamorph of *T. spirale* tend to be ellipsoidal and bigger than those formed from pustules.



Conidiophores of the synanamorph are verticillately or penicillately branched.



Conidia of the synanamorph of *T. spirale* are ellipsoidal.



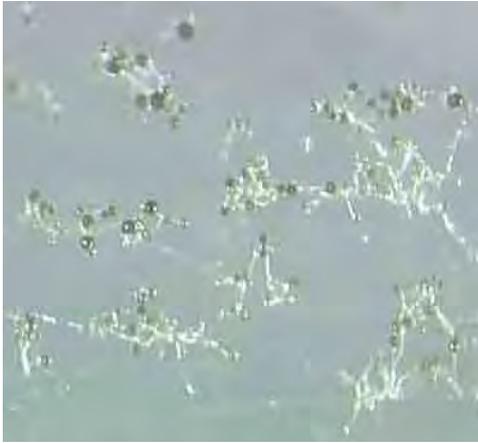
Phialides of the synanamorph are often flared at the tip.



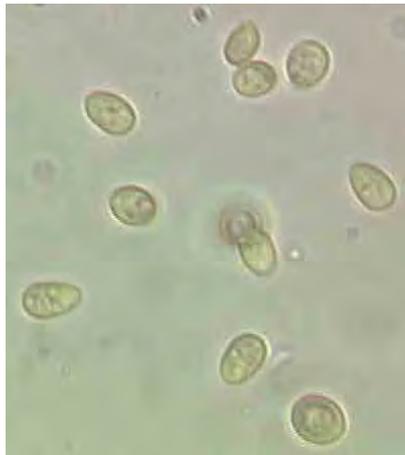
Conidiophores of the synanamorph of *T. spirale* are verticillately to penicillately branched. Phialides are cylindrical or slightly swollen in the middle; the tip is often flared and pigmented green.

T. spirale # 8

Synanamorphs



Conidiophores of the synanamorph of *T. spirale* form abundantly in the aerial mycelium. Conidia are held in drops of clear, watery, green, liquid.



Conidia of the synanamorph of *Trichoderma spirale* tend to be ellipsoidal and bigger than those formed from pustules.



Conidiophores of the synanamorph of *Trichoderma spirale* are verticillately or penicillately branched.

T. stromaticum # 1

Colony radius on PDA 25 C in darkness after 72 h 40-55 mm, at 20 C 28-35 mm, at 30 C 18-25 mm, not growing at 35 C; mycelium dense, appressed, off-white, with conidia forming in a dense white shelf around the center and in a more or less dense broad band around the margin of the colony (dependent on the strain); conidia typically forming moderately well in concentric rings within 96 h at 25-30 C on PDA in darkness; diffusing yellow pigment not noted; no odor detected.

Pustules formed on CMD and PDA discrete, adjacent pustules not confluent, tuberculate to subglobose, 1-2 mm diam, forming throughout the colony, formed of loosely joined chains of vesiculose cells, very easily detached, slowly passing from white through yellow to gray-green with many remaining white or yellow; sterile or fertile elongations of conidiophores conspicuously protruding from all over each pustule; some pustules only partly fertile.

Fertile extensions of conidiophores typically 80-140 μm long, 6-7 μm wide at the base, thin-walled, septate, straight, smooth, terminated in a single phialide that tapers uniformly from base to tip.

Sterile hairs similar to fertile extensions of conidiophores but shorter, 50-100 μm and obtuse to subacute at the tip.

Conidiophores on CMD arising from pseudoparenchymatous cells of the pustule, comprising a chain of short, nearly rectangular cells from which phialides arise laterally and at the tip, singly or in penicillate whorls of 2-3; the conidiophore frequently terminating in a stiff, straight, septate, thin-walled, unbranched or infrequently branched, 50-140 μm long, sterile or fertile elongation; when fertile, only a single phialide terminates the elongation. When elongations are produced, fertile branches arise from the base of the elongation on short, lateral branches that comprise a few cells that produce phialides or in penicillate whorls of 2-3. The cell from which phialides arise (3-)3.7-4.5(-7) μm wide.

Phialides typically terminating cells of branches singly or in pairs, often very densely disposed, ampulliform, often sharply constricted below the tip, 5.5-7.0 μm long, L/W = (0.9-)1.3-2.3(-4.2), 3.5-4.0 μm at the widest point, 3.0-3.5 μm at the base, arising from a cell (3.0-)3.7-5.0(-7.0) μm wide.

Intercalary phialides not formed.

Conidia on CMD slowly passing from white through yellow to green, with many conidia remaining white or yellow, oblong to ellipsoidal, 4.0-4.5 x 2.5-3.0 μm , L/W (1.1-)1.3-1.7(-2.0), smooth.

Chlamydospores forming in abundance, either as discrete subglobose thick walled, terminal or intercalary, cells or when intercalary, conforming to the shape of the cell in which it is formed; frequently also as knots of swollen hyphal cells, (4-)5-15(-45) μm diam.

Synanamorphs scantily formed as mononematous conidiophores arising in the aerial mycelium apart from the pustules, sometimes resembling the conidiophores produced in the pustules and other times appearing to be longer and narrower, more or less verticillately branched.

Stromata crowded, turbinate to discoidal, somewhat constricted at the base, 0.5-1.0 mm diam, white but with many, orange perithecia, not reacting to 3% KOH.

Stroma surface tuberculate from the perithecial mounds.

Asci: no data.

Part-ascospores hyaline.

Nomenclator: *Trichoderma stromaticum* Samuels et al., Mycol. Res. 104: 762, Figs. 2-13. 2000

Teleomorph: *Hypocrea stromatica* Bezerra, Costa & Bastos in Bezerra et al., Fitopatol. Braz. 82: 409. 2003. The *Hypocrea* teleomorph of *T. stromaticum* has been found on brooms on cacao trees in Bahia State of Brazil.

This species is easily recognized by its minute stromatic pustules that form in great numbers in Petri dishes.

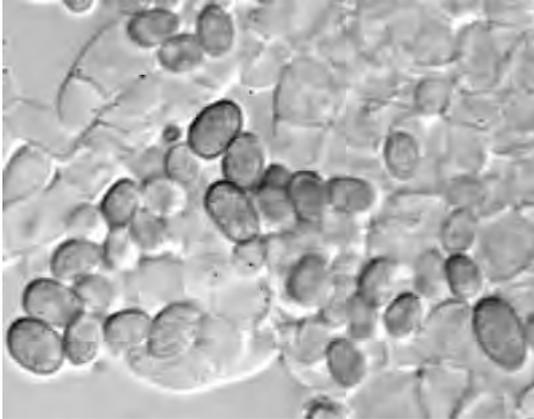
Habitat: Witches brooms of *Theobroma cacao* and living endophytically within trunks of *T. cacao* and pods of a species of the closely related genus, *Herrania*.

Known distribution: Brazil (Bahia, Pará) and Ecuador.

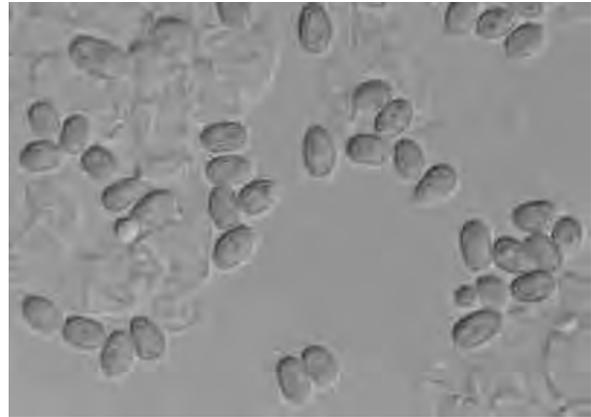
No distribution records are available from the SBML Fungus-Host database.

T. stromaticum # 2

Conidia



Conidia of *T. stromaticum* are ellipsoidal smooth and green.

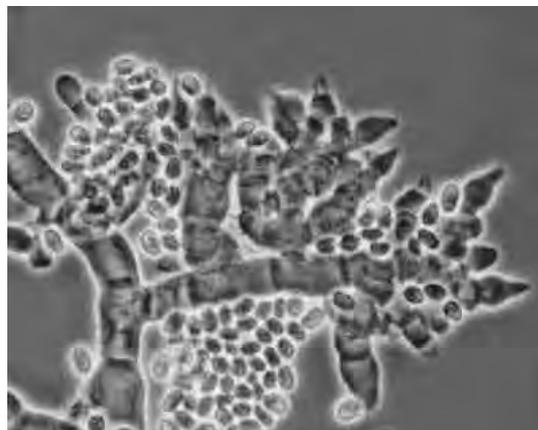
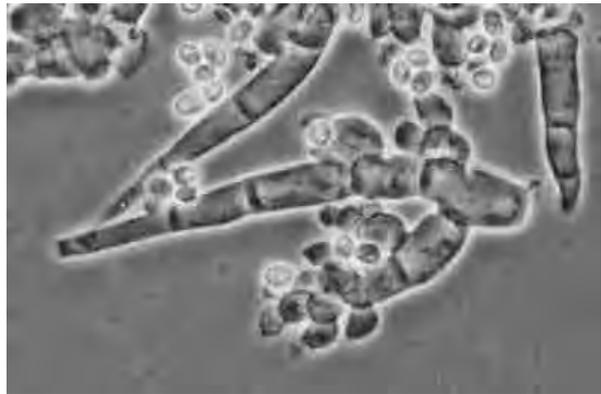


Conidia of *T. stromaticum* are oblong to ellipsoidal and smooth.

Phialides



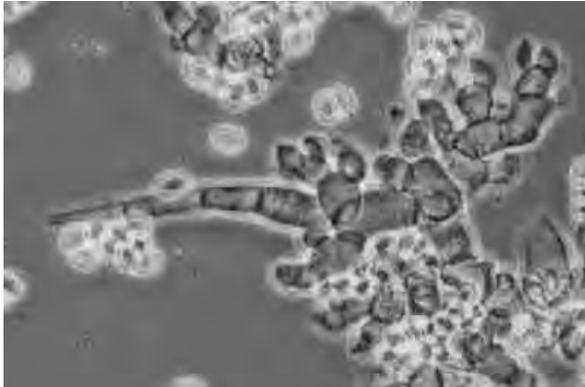
Phialides of *T. stromaticum* form at the tips of short branches and are typically held in penicillate whorls.



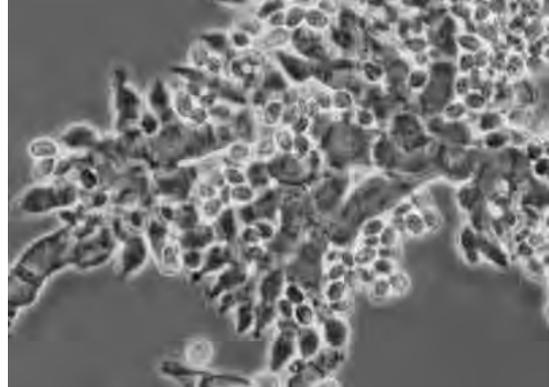
Phialides of *T. stromaticum* are ampulliform and often densely clustered at the tips of short branches of conidiophores.

T. stromaticum # 3

Conidiophores



Conidiophores of *T. stromaticum* typically comprise a sterile or terminally fertile elongation with fertile branches arising from the base of the elongation.



Conidiophores of *T. stromaticum* arise from vesiculate cells of the pustule and terminate in a penicillus of densely disposed phialides.

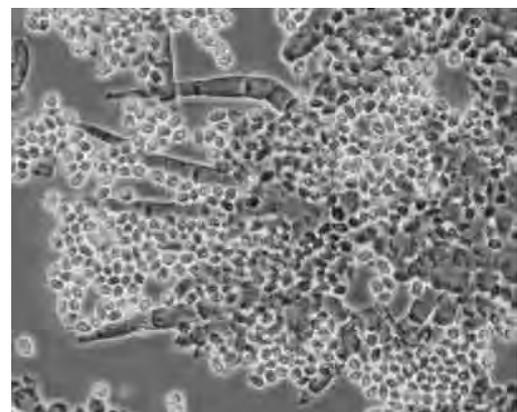


Conidiophores of *T. stromaticum* typically comprise a sterile or terminally fertile elongation with fertile branches arising from the base of the elongation.

Sterile Hairs



Stout, sterile or fertile elongations of conidiophores are typical of *T. stromaticum*.



A distinctive feature are the stout projecting conidiophores or fertile hairs.

T. stromaticum # 4

Pustules



Pustules of *T. stromaticum* are discrete and easily dislodged from the agar. They pass slowly from white through yellow to green and many of each color may be found at the same time in a colony.



In *T. stromaticum* the conidia form at the surface of the pustule. Conspicuous stiff sterile hairs or conidiophores that are fertile only at the tip arise from the pustule.



Pustules of *T. stromaticum* are seen with the unnamed *Hypocrea* teleomorph on artificially inoculated broome tissue in the laboratory. Fertile Extensions of Conidiophores



The conidia form at the surface of the pustule. Conspicuous stiff sterile hairs or conidiophores that are fertile only at the tip arise from the pustule.



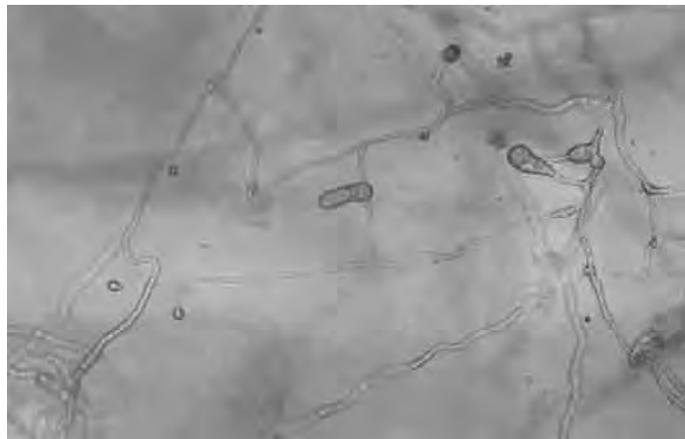
Fertile extensions of conidiophores of *T. stromaticum* extend beyond the surface of the pustule and bear a single, terminal droplet of conidia.



Fertile extensions of conidiophores project from the pustule. Phialides arise at the base of these conidiophores and a single phialide is borne at the tip.

T. stromaticum # 5

Chlamydo spores



Chlamydo spores of *T. stromaticum* may be unicellular or may comprise a small knot of cells.

Chlamydo spores of *T. stromaticum* are terminal or intercalary within hyphae, or chlamydo spores are frequently formed of knots of cells.

Synanamorphs



Short conidiophores arise in the aerial mycelium apart from the pustules.

Stromata



The teleomorph of *T. stromaticum* is an undescribed *Hypocrea* species. It has only been found on broome tissue in Bahia state of Brazil.

T. viride # 1

Colony radius on PDA in darkness after 72h at 25 C 30-40 m, at 20 C 25-35 mm, at 30 C 15-25 mm, not growing at 35 C; after 144 h in darkness conidia form abundantly in conspicuous concentric rings; no diffusing pigment noted, occasionally with a sweet, 'coconut' odor or no distinctive odor noted. Colonies grown on CMD 7-10 da at 20-21 C, alternating darkness/12 h cool white fluorescent light forming conidia abundantly around the margin of the colony in confluent to discrete, 0.5-1.0 mm diam, cottony pustules.

Pustules formed on CMD typically 0.5-1.0 mm diam, hemispherical, uniformly cottony an difficult to remove from the agar, typically with projecting terminally fertile conidiophores.

Fertile extensions of conidiophores inconspicuous in microscopic preparations but visible in macroscopic views of pustules.

Sterile hairs absent.

Conidiophores on CMD typically comprising a fertile central axis or the central axis 100-150 μm long and flexuous, with lateral branches paired or not and typically arising at an angle at or near 90° with respect to its supporting branch, sometimes lateral branches at widely-spaced intervals when near the tip of the conidiophore and arising at closer intervals when more distant from the tip; phialides arising singly from the main axis or in whorls of 2-3 at the tips of lateral branches or at the tip of the conidiophore. The central axis (1.7-)2.2-3.2(-4.5) μm wide.

Phialides typically arising singly directly from the main axis or at the tip of a short lateral branch or in whorls of 2-3 at the tips of short branches, cylindrical to somewhat swollen in the middle and sometimes with an elongated neck, straight, hooked or sinuous, (4.8-)7.0-11.5(-16.7) μm long, L/W = (1.3-)2.0-4.5(-13.2), (1.8-)2.5-3.5(-4.0) μm wide at the widest point, (1.3-)1.8-2.5(-3.3) μm wide at the base, arising from a cell (1.7-)2.2-3.2(-4.5) μm wide.

Intercalary phialides not formed.

Conidia dark green, subglobose, on CMD, (3.0-)3.5-4.5(-5.0) x (2.7-)3.2-4.0(-4.8) μm , L/W = (0.8-)1.0-1.2(-1.5), conspicuously tuberculate.

Chlamyospores typically not forming on CMD, globose to subglobose, (8.0-)8.5-10.5(-16.0) μm diam.

Synanamorphs not formed.

Stromata solitary to gregarious, initially slightly effused, pale tan and velvety, gradually becoming darker brown, pulvinate, 0.5-1.5 mm. diam, not changing color in 3% KOH.

Stroma surface plane or somewhat tuberculate from perithecial mounds, initially velvety but becoming glabrous (short hyphal hairs on stroma surface seen in microscope); ostiolar openings not visible or at most barely visible, the openings often signaled by the presence of minute white balls of exuded ascospores., not changing color in 3% KOH.

Asci cylindrical, (70-)85-105(-115) x (4.2-)6-8(-10) μm , apex slightly thickened and with a pore; ascospores uniseriate with slightly overlapping ends, completely filling the ascus.

Part-ascospores hyaline, finely spinulose, dimorphic; distal part conical to subglobose, (3.7-)4.2-5.2(-6.8).x (3.5-)4.0-4.5(-5.2) μm ; proximal part wedge-shaped to conical, (4.0-)5.0-5.7(-7.7) x (3.0-)3.5-4.2(-5.0) μm .

Nomenclator:

Hypocrea rufa (Pers.: Fr.) Fries, Summa veg. Scand. 383. 1849.

=*Sphaeria rufa* Persoon, *Observ. mycol.* p. 20. 1796: Fries, *Syst. mycol.* 2: 335. 1823.
Anamorph: *Trichoderma viride* Persoon in Roemer, *Neu. Mag. Bot.* 1: 92. 1794: Fries, *Syst. mycol.* 3: 215. 1832.

=*Trichoderma lignorum* Harz, *einige neue Hyphomyceten.* P. 29. 1871 (fide Domsch et al., 1980).

=*Trichoderma glaucum* E.V. Abbott, *Iowa State College J. Sci.* 1: 27. 1926 (fide Domsch et al., 1980).

Trichoderma viride is characterized by its large, nearly globose, coarsely warted conidia, by the irregularly branched conidiophores; and by the hooked to sinuous, often solitary phialides. It can be confused with *T. asperellum*, which has finely warted, subglobose to ovoidal conidia, uniformly branched conidiophores and straight phialides and an as yet undescribed species that has globose to ovoidal, coarsely warted conidia and regularly branched conidiophores with straight phialides. The teleomorph of the undescribed *Trichodermae* is indistinguishable from that of *T. viride* but the undescribed *Hypocrea/Trichoderma* is more widely distributed and common than *H. rufa/T. viride*.

Description: Samuels et al., *Sydowia* 51: 82, Figs. 1-4, 9, 10, 20-28. 1999.

Habitat: Soil, the *Hypocrea* occurs on wood with bark.

Known distribution: The species is reported to be cosmopolitan but all records may not refer to *T. viride* s. str. *Hypocrea rufa* is reported to be cosmopolitan but most records are certainly in error. True *H. rufa* is a species of north and south temperate regions.

Distribution records from the SBML [Fungus-Host database](#):

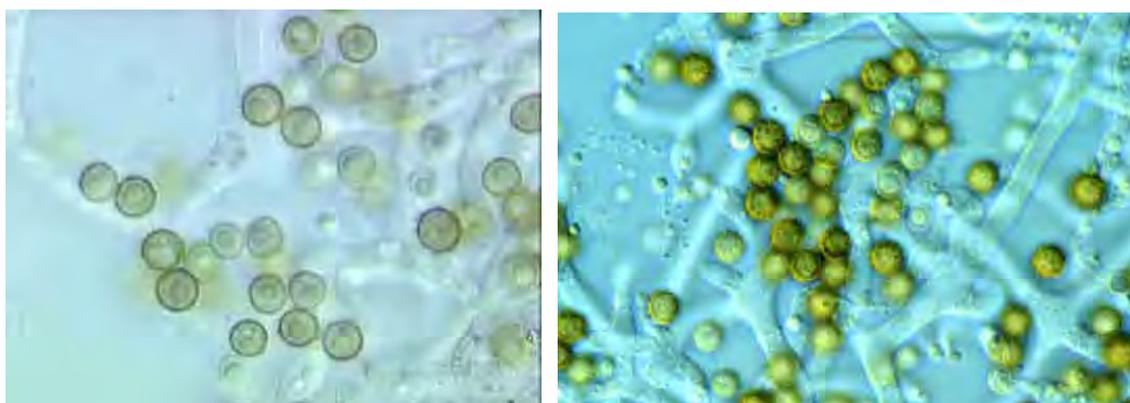
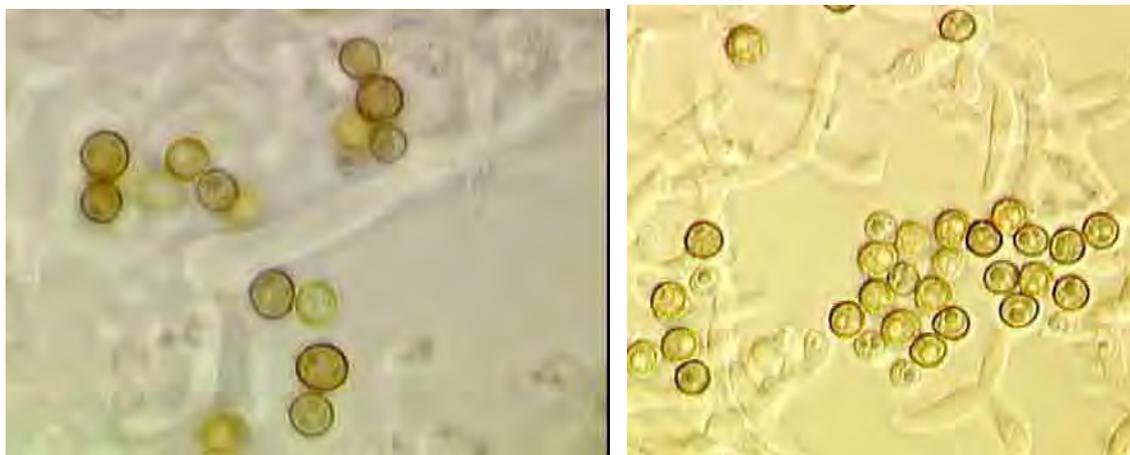
Hypocrea rufa - **Acer negundo**: Canada - [7870](#). **Acer sp.**: United Kingdom - [8539](#). **Alnus rugosa**: Canada - [7870](#). **Alnus sp.**: United Kingdom - [8539](#); Canada - [8376](#). **Betula sp.**: United Kingdom - [8539](#). **Cocos nucifera**: Puerto Rico - [5824](#); Virgin Islands - [5824](#). **Fagus grandifolia**: Canada - [8376](#). **Fagus sp.**: United Kingdom - [8539](#). **Fraxinus sp.**: United Kingdom - [8539](#). **Nothofagus obliqua**: Chile - [6792](#), [7847](#). **Pinus sp.**: United Kingdom - [8539](#). **Quercus sp.**: United Kingdom - [8539](#); Lithuania - [37452](#); LA - [813](#). **Rhododendron maximum**: NC - [3164](#). **Roystonea borinquena**: Virgin Islands - [5824](#); Puerto Rico - [5824](#). **Saccharum officinarum**: Virgin Islands - [5824](#); Puerto Rico - [5824](#). **Sorbus sp.**: United Kingdom - [8539](#). **wood**: Indonesia - [33025](#). **wood, decayed**: Poland - [33170](#)

Trichoderma viride - **Abies balsamea**: Canada - [8376](#). **Abies magnifica var. shastensis**: CA - [3395](#). **Acacia koa**: HI - [3490](#). **Acacia koa var. hawaiiensis**: HI - [1710](#). **Acacia mearnsii**: Kenya - [6774](#). **Acer rubrum**: NH - [216](#); ME - [216](#). **Acer saccharum**: Canada - [8376](#). **Agaricus bisporus**: New Zealand - [6224](#). **Allium sativum**: TX - [94](#). **Alnus rubra**: OR - [99](#). **Alnus sp.**: Canada - [8376](#). **Ananas comosus**: HI - [94](#). **Ananas sativus**: Africa - [5185](#). **Arachis hypogaea**: Brazil - [34636](#); SC - [94](#). **Araucaria cunninghamii**: Australia - [6767](#). **Arctostaphylos patula**: CA - [3395](#). **Avicennia germinans**: TX - [15965](#). **Betula lutea**: NY - [441](#). **Betula papyrifera**: Canada - [8376](#). **Brachiaria brizantha**: Brazil - [34636](#). **Camellia sinensis**: Kenya - [6774](#). **Capsicum annuum**: Brazil - [34636](#). **Cheirodendron trigynum**: HI - [3490](#). **Cheirodendron trigynum var. trigynum**: HI - [1710](#). **Citrus limonia**: South Africa - [6959](#). **Citrus nobilis**: China - [8097](#). **Citrus sinensis**: China - [8097](#); South Africa - [6959](#). **Citrus sp.**: United States - [94](#); South Africa - [34234](#). **Cucumis melo**: MN - [94](#). **Cucumis sativus**: NC - [3599](#). **Daucus carota**: Brazil - [34636](#). **Elaeis guineensis**: Malaysia - [6784](#). **Eleocharis plantaginea var. tuberosa**: Taiwan - [8303](#). **Fagus grandifolia**: NH - [3461](#); PA - [3461](#); MI - [3461](#); OH - [3461](#). **Fagus sp.**: Canada - [8376](#). **Gossypium hirsutum**: MS - [2437](#); Range of host - [94](#); MS - [1188](#). **Hordeum vulgare**: MN - [94](#). **Ipomoea batatas**: Malaysia - [6772](#). **Jacaranda mimosifolia**: Kenya - [6774](#). **Juncus roemerianus**: FL - [3491](#). **Liquidambar styraciflua**: Mexico - [28165](#). **Malus sylvestris**: Kenya - [6774](#). **Metrosideros collina**: HI - [3490](#). **Metrosideros collina subsp. polymorpha**: HI - [1710](#). **Musa xparadisica**: West Indies - [6649](#); Brazil - [34636](#).

Narcissus sp.: Range of host - 94. **Nicotiana tabacum:** Brunei - 6778. **Nothofagus solandri var. cliffortioides:** New Zealand - 37464. **Nothofagus truncata:** New Zealand - 37464, 6895. **Oryza sativa:** TX - 94; LA - 94; AR - 94. **Phaseolus vulgaris:** Brazil - 34636. **Phoenix dactylifera:** Pakistan - 6232. **Picea abies:** Finland - 6475; Germany - 6588. **Pinus ponderosa:** WA - 44. **Pinus radiata:** Kenya - 6774. **Pinus sp.:** Greece - 8187. **Pinus sylvestris:** Czechoslovakia - 8488. **Piper nigrum:** Malaysia - 7282. **Pistacia vera:** CA - 37224. **Pseudotsuga menziesii:** OR - 135. **Quercus chrysolepis:** CA - 3395. **Quercus germana:** Mexico - 28165. **Quercus sartorii:** Mexico - 28165. **Rhizophora mangle:** HI - 669. **Rhododendron mucronatum:** NC - 94; SC - 94. **Rhododendron obtusum:** SC - 94; NC - 94. **Ribes nigrum:** USSR - 7066. **Sassafras albidum:** NY - 2570. **Sechium edule:** Brazil - 34636. **soil:** Italy - 32562; Canada, Ontario - 33255; WA - 33355; Mexico - 37485. **Splitgerbera denudata:** Chile - 6792. **Splitgerbera sp.:** Chile - 6792. **Spondias mombin:** Brazil - 37677. **Theobroma cacao:** Malaysia - 6784. **Triticum aestivum:** MN - 94; Australia - 6765. **unknown:** Israel - 33355; Sweden - 33355; Solomon Islands - 33355. **Urtica excelsa:** Chile - 6792. **Vitis vinifera var. vinifera:** Greece - 8187. **Zea mays:** VA - 32149; China - 8097; KS - 1134; FL - 3128; Brazil - 34636; WI - 2819; IL - 2819; NY - 2819; KS - 2819; NE - 2819; IA - 1873; United States - 94; IA - 2907, 2819; IN - 1937, 2819; NC - 282; MD - 2819; MN - 2819; SC - 2819. **Ziziphus jujuba:** China - 8097

T. viride # 2

Conidia



Conidia of *T. viride* are globose and coarsely warty.

Phialides



Phialides of *T. viride* s. str are cylindrical solitary or in pairs.

Phialides of *T. viride* arise singly from the main axis or in whorls of 2-3. They may be slightly cylindrical or swollen and are straight or hooked.

T. viride # 3

Conidiophores



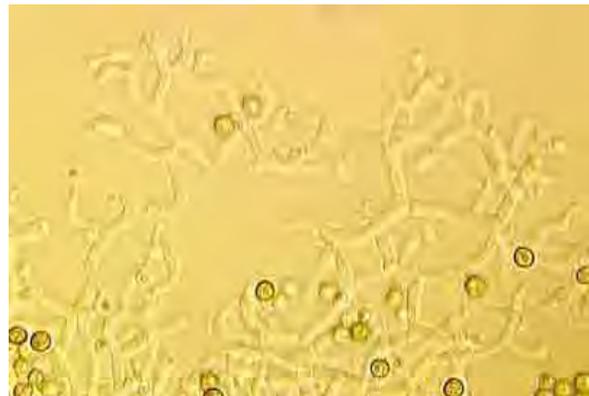
Conidiophores may have a long central axis that is infrequently branched and that terminates in one or a few phialides.



Toward their extremities, conidiophores of *T. viride* are sparingly branched and the branches tend not to be paired. Note the hooked phialides.



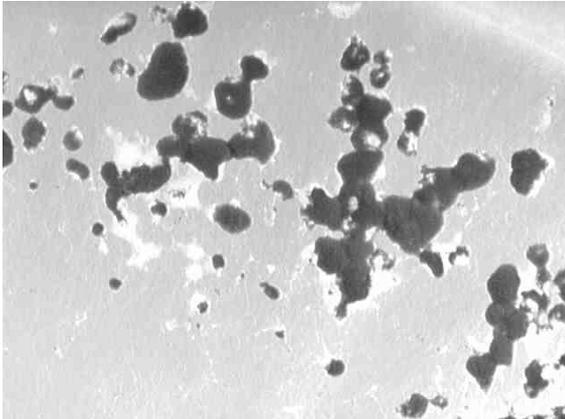
In *T. viride* it is often difficult to see a main axis because branches tend not to be paired. Phialides are often hooked or sinuous.



In *T. viride* it is often difficult to see a main axis because branches tend not to be paired.

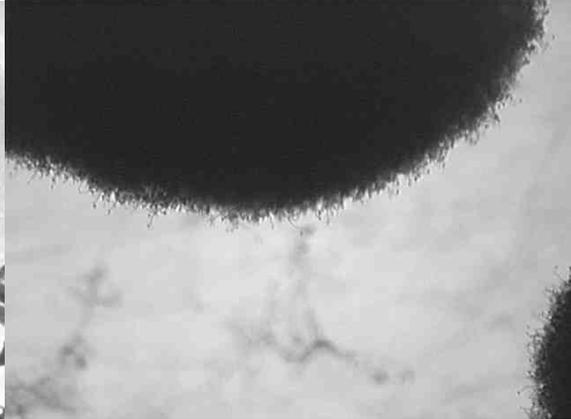
T. viride # 4

Pustules



In *T. viride*, when grown on CMD, pustules form in abundance around the margin of the colony. They are discrete to confluent, 0.5-1.0 mm diam. and cottony. Conidia appear to form at the surface of the pustule. Conidia are dark green.

Fertile Extensions of Conidiophores



Conidiophores extend beyond the surface of the pustule of *T. viride*.

Asci



Asci of *Hypocrea rufa* are cylindrical. The part ascospores are uniseriate with slightly overlapping ends; they completely fill the ascus.

The ascus apex of *Hypocrea rufa* is slightly thickened and has a pore. This is most easily seen in young asci mounted in lactic acid and viewed with phase contrast microscopy.

Part-Ascospores



Part-ascospores of *Hypocrea rufa* are hyaline, slightly spinulose and dimorphic. The distal part, which is most distant from the base, is conical to subglobose, the proximal part, which is closest to the base, is wedge-shaped to subglobose.

T. viride # 5**Stromata**

Stromata of *Hypocrea rufa* form on bark. They are solitary to gregarious, pulvinate and dark brown or rufous. The stroma surface is velvety initially but becomes glabrous with age. Ostiolar openings are not visible when fresh and moist.



Young stromata of *Hypocrea rufa* are semi-effused, pale tan and velvety. As the stroma mature it becomes more pulvinate and darker brown.



Young stromata are semi-effused, nearly white to pale tan and velvety. As the stroma matures it more pulvinate and darker brown.



The mature stroma of *Hypocrea rufa* is dark brown or rufous, pulvinate to tuberculate and becomes velutinous, ostiolar openings are not visible.



The mature stroma of *H. rufa* is more or less pulvinate, dark brown or rufous, the surface may be plane or slightly tuberculate. Initially the surface of the stroma is velvety but becomes glabrous with age, ostiolar openings are not visible but often.



The stromata of *Hypocrea rufa* are brown to rufous, pulvinate to tuberculate, the surface is plane to tuberculate from perithecial mounds and velutinous. Ostiolar openings are not visible.

ANEXO 4

**Resultado da análise das seqüências submetidas ao *GenBank*
através do programa BLASTN**

Anexo 4 – Resultado da análise comparativa no *GenBank* das seqüências obtidas (programa BLASTN, Altschul et al., 1997) incluindo os registros de depósito, o *score* e o *e-value* do alinhamento de maior consenso. Na coluna em destaque são indicados os isolados submetidos ao ensaio de atividade enzimática. (# = falha)

Coleta IB	Isol.	No. Seq.	BLAST-N / score / e-value
01	02	214	gi 5327276 emb AJ230669.1 TVI230669 Trichoderma asperellum ... 914 0.0
02	03	199	gi 5327276 emb AJ230669.1 TVI230669 Trichoderma asperellum ... 987 0.0
	10	003	gi 27448767 gb AF443922.1 Trichoderma harzianum G.J.S. 00-... 789 0.0
	14	004	gi 30525793 gb AY266673.1 Trichoderma asperellum strain 3D... 624 e-176
03	01	200	gi 30525793 gb AY266673.1 Trichoderma asperellum strain 3D... 652 0.0
	02	005	gi 30525793 gb AY266673.1 Trichoderma asperellum strain 3D... 710 0.0
	04	006	gi 4321697 gb AF057637.1 AF057637 Trichoderma harzianum Th4... 56 1e-04
04	01	204	#
	03	007	gi 30525793 gb AY266673.1 Trichoderma asperellum strain 3D... 200 4e-48
	08	008	#
	10	206	gi 30525793 gb AY266673.1 Trichoderma asperellum strain 3D... 240 4e-60
	11	010	gi 5327276 emb AJ230669.1 TVI230669 Trichoderma asperellum ... 995 0.0
05	02	011	gi 9230634 gb AF194014.1 AF194014 Trichoderma aureoviride s... 789 0.0
	03	012	gi 9230639 gb AF194019.1 AF194019 Trichoderma aureoviride s... 706 0.0
	05	013	gi 22596133 gb AF414310.1 Trichoderma koningii strain CCRC... 716 0.0
06	01	209	gi 32394919 gb AY154933.1 Trichoderma spirale Ir. 394 18S ... 1033 0.0
	02	210	gi 32394940 gb AY154954.1 Trichoderma spirale Ir. 291 D 18... 1076 0.0
	05	217	gi 32394919 gb AY154933.1 Trichoderma spirale Ir. 394 18S ... 622 e-175
07	01	218	gi 21239368 gb AF501329.1 Trichoderma atroviride strain CB... 708 0.0
	02	219	gi 16580101 gb AY027784.1 Trichoderma harzianum GJS 99-227... 349 3e-93
	10	221	gi 21239368 gb AF501329.1 Trichoderma atroviride strain CB... 959 0.0
	12	222	gi 30525766 gb AY266646.1 Trichoderma harzianum strain 3DA... 299 3e-78
	13	223	gi 21239368 gb AF501329.1 Trichoderma atroviride strain CB... 930 0.0
08	01	225	gi 32394923 gb AY154937.1 Trichoderma hamatum Ir. 183 D 18... 1029 0.0
	02	226	gi 32394923 gb AY154937.1 Trichoderma hamatum Ir. 183 D 18... 1013 0.0
	03	227	gi 32394923 gb AY154937.1 Trichoderma hamatum Ir. 183 D 18... 1047 0.0
	04	228	gi 27448757 gb AF443912.1 Trichoderma harzianum G.J.S. 00-... 916 0.0
09	01	229	gi 33317593 gb AF456923.1 Trichoderma koningii isolate G.J... 1059 0.0
	10	232	gi 30525793 gb AY266673.1 Trichoderma asperellum strain 3D... 500 e-138
10	01	233	gi 3095170 gb AF055211.1 AF055211 Trichoderma koningii 18S ... 1074 0.0
	02	234	gi 32394918 gb AY154932.1 Trichoderma tomentosum Ir. 690 C... 454 e-125
	03	235	gi 22596133 gb AF414310.1 Trichoderma koningii strain CCRC... 392 e-106
	04	015	gi 3095170 gb AF055211.1 AF055211 Trichoderma koningii 18S ... 1072 0.0
11	02	016	gi 16580097 gb AY027780.1 Trichoderma harzianum GJS 99-230... 961 0.0
	04	017	gi 27448757 gb AF443912.1 Trichoderma harzianum G.J.S. 00-... 1059 0.0
	09	018	gi 32394934 gb AY154948.1 Trichoderma harzianum Ir. 561 18... 1007 0.0
	10	019	gi 27448757 gb AF443912.1 Trichoderma harzianum G.J.S. 00-... 967 0.0
12	01	020	gi 20126991 gb AF483580.1 Trichoderma asperellum isolate C... 910 0.0
13	05	021	gi 32394940 gb AY154954.1 Trichoderma spirale Ir. 291 D 18... 1045 0.0
	08	022	gi 32394940 gb AY154954.1 Trichoderma spirale Ir. 291 D 18... 1013 0.0
	10	023	gi 32394934 gb AY154948.1 Trichoderma harzianum Ir. 561 18... 969 0.0
	12	024	gi 32394940 gb AY154954.1 Trichoderma spirale Ir. 291 D 18... 1019 0.0
14	01	025	gi 19880084 gb AF359400.1 Trichoderma aureoviride strain T... 1078 0.0
	02	026	gi 19880063 gb AF359263.1 Trichoderma atroviride strain CB... 1088 0.0
	04	027	gi 32394940 gb AY154954.1 Trichoderma spirale Ir. 291 D 18... 1031 0.0
	05	028	gi 32394940 gb AY154954.1 Trichoderma spirale Ir. 291 D 18... 1013 0.0
15	06	029	gi 21239365 gb AF501326.1 Trichoderma aureoviride strain K... 948 0.0
	15	030	gi 32394940 gb AY154954.1 Trichoderma spirale Ir. 291 D 18... 1029 0.0
16	01	031	gi 27448758 gb AF443913.1 Trichoderma harzianum G.J.S. 00-... 1055 0.0
	04	032	gi 27448757 gb AF443912.1 Trichoderma harzianum G.J.S. 00-... 1053 0.0
	05	033	gi 19880065 gb AF359265.1 Trichoderma aureoviride strain T... 920 0.0
	08	034	gi 19880144 gb AF362101.1 Trichoderma inhamatum strain KAC... 1061 0.0
17	01	035	gi 32394941 gb AY154955.1 Trichoderma inhamatum Ir. 286 18... 999 0.0
	03	036	gi 16580101 gb AY027784.1 Trichoderma harzianum GJS 99-227... 1033 0.0
	05	037	gi 27448770 gb AF443925.1 Trichoderma harzianum G.J.S. 92-... 1039 0.0
	07	038	gi 32394934 gb AY154948.1 Trichoderma harzianum Ir. 561 18... 1130 0.0

18	02	039	gii32394934 qbiAY154948.1	Trichoderma harzianum Ir. 561 18...	1027	0.0
	03	046	gii19880063 qbiAF359263.1	Trichoderma atroviride strain CB...	1057	0.0
	05	040	gii32394940 qbiAY154954.1	Trichoderma spirale Ir. 291 D 18...	1078	0.0
	07	041	gii5327277 emb AJ230673.1 TVI230673	Trichoderma viride (str...	995	0.0
	08	042	gii32394923 qbiAY154937.1	Trichoderma hamatum Ir. 183 D 18...	1072	0.0
	09	043	#			
	11	044	gii32394923 qbiAY154937.1	Trichoderma hamatum Ir. 183 D 18...	1035	0.0
	12	045	gii32394923 qbiAY154937.1	Trichoderma hamatum Ir. 183 D 18...	1043	0.0
19	01	049	#			
	02	050	gii32394935 qbiAY154949.1	Trichoderma harzianum Ir. 112 C ...	924	0.0
	04	051	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	1025	0.0
	05	052	gii19880084 qbiAF359400.1	Trichoderma aureoviride strain T...	1070	0.0
20	01	053	gii32394919 qbiAY154933.1	Trichoderma spirale Ir. 394 18S ...	898	0.0
	02	054	gii32394919 qbiAY154933.1	Trichoderma spirale Ir. 394 18S ...	1027	0.0
	05	055	gii32394919 qbiAY154933.1	Trichoderma spirale Ir. 394 18S ...	1086	0.0
	08	056	gii32394923 qbiAY154937.1	Trichoderma hamatum Ir. 183 D 18...	1078	0.0
21	01	057	gii32394919 qbiAY154933.1	Trichoderma spirale Ir. 394 18S ...	1035	0.0
	03	058	gii32394940 qbiAY154954.1	Trichoderma spirale Ir. 291 D 18...	886	0.0
	08	059	gii19880065 qbiAF359265.1	Trichoderma aureoviride strain T...	878	0.0
	11	060	gii32394940 qbiAY154954.1	Trichoderma spirale Ir. 291 D 18...	916	0.0
22	01	061	gii32394918 qbiAY154932.1	Trichoderma tomentosum Ir. 690 C...	930	0.0
	09	062	gii16580101 qbiAY027784.1	Trichoderma harzianum GJS 99-227...	1029	0.0
	10	063	gii32394935 qbiAY154949.1	Trichoderma harzianum Ir. 112 C ...	839	0.0
	11	064	gii30525766 qbiAY266646.1	Trichoderma harzianum strain 3DA...	763	0.0
23	02	066	gii32394919 qbiAY154933.1	Trichoderma spirale Ir. 394 18S ...	884	0.0
	03	067	gii32394940 qbiAY154954.1	Trichoderma spirale Ir. 291 D 18...	876	0.0
	05	068	gii3095170 qbiAF055211.1 AF055211	Trichoderma koningii 18S ...	977	0.0
24	06	069	gii4323322 qbiAF099008.1 AF099008	Trichoderma virens strain...	961	0.0
	15	071	gii32394919 qbiAY154933.1	Trichoderma spirale Ir. 394 18S ...	1066	0.0
	16	072	gii32394919 qbiAY154933.1	Trichoderma spirale Ir. 394 18S ...	995	0.0
25	01	073	gii32394919 qbiAY154933.1	Trichoderma spirale Ir. 394 18S ...	839	0.0
	02	074	gii32394940 qbiAY154954.1	Trichoderma spirale Ir. 291 D 18...	920	0.0
	07	075	gii32394940 qbiAY154954.1	Trichoderma spirale Ir. 291 D 18...	549	e-153
	08	076	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	751	0.0
26	10	077	gii19880084 qbiAF359400.1	Trichoderma aureoviride strain T...	650	0.0
	01	078	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	712	0.0
	05	079	gii4323322 qbiAF099008.1 AF099008	Trichoderma virens strain...	961	0.0
	08	080	gii6979031 qbiAF057597.1 AF057597	Trichoderma virens isolat...	809	0.0
	09	081	gii27448757 qbiAF443912.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 00-...	1110	0.0
27	04	082	gii27448757 qbiAF443912.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 00-...	1094	0.0
	08	083	gii1771820 emb Z68188.1 TH51818RR	T.inhamatum rRNA genes an...	870	0.0
	11	084	gii19880067 qbiAF359267.1	Trichoderma aureoviride strain T...	882	0.0
28	15	085	gii27448757 qbiAF443912.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 00-...	1098	0.0
	03	086	gii22596171 qbiAF414348.1	Trichoderma strigosum strain CCR...	735	0.0
	05	087	gii32394919 qbiAY154933.1	Trichoderma spirale Ir. 394 18S ...	1102	0.0
	10	088	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	1065	0.0
29	15	089	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	1082	0.0
	04	090	gii32394919 qbiAY154933.1	Trichoderma spirale Ir. 394 18S ...	1112	0.0
	08	091	gii33317593 qbiAF456923.1	Trichoderma koningii isolate G.J...	1110	0.0
	10	092	gii32394919 qbiAY154933.1	Trichoderma spirale Ir. 394 18S ...	1051	0.0
	11	093	gii27448757 qbiAF443912.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 00-...	1110	0.0
30	16	094	gii3287287 emb Z95926.1 TK18SRRN1	Trichoderma koningii 18S ...	670	0.0
	05	095	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	1084	0.0
	06	096	gii32394940 qbiAY154954.1	Trichoderma spirale Ir. 291 D 18...	632	e-178
	08	097	gii3095170 qbiAF055211.1 AF055211	Trichoderma koningii 18S ...	1065	0.0
31	12	098	gii32394940 qbiAY154954.1	Trichoderma spirale Ir. 291 D 18...	999	0.0
	03	099	gii32394923 qbiAY154937.1	Trichoderma hamatum Ir. 183 D 18...	1078	0.0
	06	100	gii32394923 qbiAY154937.1	Trichoderma hamatum Ir. 183 D 18...	1100	0.0
	07	101	gii32394923 qbiAY154937.1	Trichoderma hamatum Ir. 183 D 18...	1078	0.0
32	08	102	gii27448757 qbiAF443912.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 00-...	1066	0.0
	01	103	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	1063	0.0
	03	104	gii33317593 qbiAF456923.1	Trichoderma koningii isolate G.J...	1104	0.0
	06	105	gii33317593 qbiAF456923.1	Trichoderma koningii isolate G.J...	1114	0.0
33	10	106	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	1076	0.0
	12	107	gii27448757 qbiAF443912.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 00-...	1108	0.0
	03	108	gii32394919 qbiAY154933.1	Trichoderma spirale Ir. 394 18S ...	1112	0.0
	09	109	#			
	10	110	gii27448757 qbiAF443912.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 00-...	1088	0.0

	14	111	gii33317593 qbiAF456923.1	Trichoderma koningii isolate G.J...	1094	0.0
34	02	112	gii32394940 qbiAY154954.1	Trichoderma spirale Ir. 291 D 18...	1059	0.0
	03	113	#			
	06	114	gii27448757 qbiAF443912.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 00-...	1102	0.0
	08	115	gii27448757 qbiAF443912.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 00-...	1082	0.0
35	04	116	gii22596152 qbiAF414329.1	Trichoderma inhamatum strain CCR...	664	0.0
	13	117	gii27448757 qbiAF443912.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 00-...	1106	0.0
	14	118	gii27448757 qbiAF443912.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 00-...	1120	0.0
36	01	120	gii27448757 qbiAF443912.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 00-...	1110	0.0
	03	121	gii1771857 embIZ48726.1 TSRRNAITS	T.saturnisporum genes for...	833	0.0
	06	122	gii22596118 qbiAF414295.1	Trichoderma saturnisporum strain...	157	3e-35
	10	123	gii27448757 qbiAF443912.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 00-...	1078	0.0
37	01	124	gii1771829 embIX93929.1 TLRRN2606	T.longibrachiatum rRNA ge...	904	0.0
	02	125	gii21667402 qbiAF486012.1	Trichoderma ghanense isolate TUB...	936	0.0
	04	126	gii4138604 embIX93933.1 TLRR91157	T.longibrachiatum rRNA ge...	997	0.0
	05	127	gii1518412 embIZ48935.1 TLBITS12R	T.longibrachiatum (ATCC 5...	1017	0.0
38	01	128	gii3095170 qbiAF055211.1 AF055211	Trichoderma koningii 18S ...	1072	0.0
	04	129	gii1518427 embIZ48933.1 TRITS12RR	T.reesei (ATCC 24449 and ...	856	0.0
	09	130	gii21239365 qbiAF501326.1	Trichoderma aureoviride strain K...	710	0.0
	11	131	gii27448757 qbiAF443912.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 00-...	1110	0.0
	13	132	gii27448757 qbiAF443912.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 00-...	1112	0.0
39	03	133	gii27448757 qbiAF443912.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 00-...	1102	0.0
	06	134	gii32394919 qbiAY154933.1	Trichoderma spirale Ir. 394 18S ...	1124	0.0
	07	135	gii32394919 qbiAY154933.1	Trichoderma spirale Ir. 394 18S ...	1094	0.0
	10	136	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	1051	0.0
	15	137	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	1061	0.0
40	01	138	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	1061	0.0
	03	139	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	1061	0.0
	08	140	gii32394919 qbiAY154933.1	Trichoderma spirale Ir. 394 18S ...	1094	0.0
	12	141	gii4323322 qbiAF099008.1 AF099008	Trichoderma virens strain...	1078	0.0
	16	142	gii32394923 qbiAY154937.1	Trichoderma hamatum Ir. 183 D 18...	1043	0.0
	16	142	gii32394923 qbiAY154937.1	Trichoderma hamatum Ir. 183 D 18...	1043	0.0
41	01	143	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	1082	0.0
	02	144	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	1080	0.0
	03	145	gii33317593 qbiAF456923.1	Trichoderma koningii isolate G.J...	1092	0.0
	05	146	gii32394919 qbiAY154933.1	Trichoderma spirale Ir. 394 18S ...	1102	0.0
42	04	147	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	1057	0.0
	05	148	gii32394919 qbiAY154933.1	Trichoderma spirale Ir. 394 18S ...	1100	0.0
	06	149	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	1065	0.0
	11	150	gii16580101 qbiAY027784.1	Trichoderma harzianum GJS 99-227...	969	0.0
43	01	151	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	1080	0.0
	05	152	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	1078	0.0
	07	153	gii33317593 qbiAF456923.1	Trichoderma koningii isolate G.J...	1092	0.0
	16	154	gii33317593 qbiAF456923.1	Trichoderma koningii isolate G.J...	1092	0.0
	17	155	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	1074	0.0
44	01	156	gii21239367 qbiAF501328.1	Trichoderma atroviride strain KA...	325	1e-86
	18	157	gii37622238 qbiAY391827.1	Trichoderma atroviride isolate T...	797	0.0
45	01	158	gii27448757 qbiAF443912.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 00-...	946	0.0
	03	159	gii32394938 qbiAY154952.1	Trichoderma atroviride Ir. 570 1...	1080	0.0
	09	160	gii32394938 qbiAY154952.1	Trichoderma atroviride Ir. 570 1...	1066	0.0
	10	161	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	1088	0.0
	14	162	gii21239365 qbiAF501326.1	Trichoderma aureoviride strain K...	761	0.0
46	01	163	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	1086	0.0
	07	164	gii21239368 qbiAF501329.1	Trichoderma atroviride strain CB...	216	3e-53
	10	165	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	755	0.0
	17	166	gii27448757 qbiAF443912.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 00-...	829	0.0
47	06	168	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	1078	0.0
	07	169	gii32394919 qbiAY154933.1	Trichoderma spirale Ir. 394 18S ...	1102	0.0
	10	170	gii27448770 qbiAF443925.1	Trichoderma harzianum G.J.S. 92-...	553	e-154
48	12	171	gii22596152 qbiAF414329.1	Trichoderma inhamatum strain CCR...	741	0.0
	11	172	gii33317593 qbiAF456923.1	Trichoderma koningii isolate G.J...	1086	0.0
	16	173	gii4323322 qbiAF099008.1 AF099008	Trichoderma virens strain...	1078	0.0
	20	174	gii22596112 qbiAF414289.1	Trichoderma atroviride strain N8...	46	0.031
49	22	175	gii32394934 qbiAY154948.1	Trichoderma harzianum Ir. 561 18...	777	0.0
	08	176	gii30525778 qbiAY266658.1	Trichoderma erinaceum strain 3DK...	375	e-101
	09	177	gii16580097 qbiAY027780.1	Trichoderma harzianum GJS 99-230...	864	0.0
	11	178	gii9230631 qbiAF194011.1 AF194011	Trichoderma harzianum str...	767	0.0
	15	179	gii3095170 qbiAF055211.1 AF055211	Trichoderma koningii 18S ...	1059	0.0
	16	180	gii32394919 qbiAY154933.1	Trichoderma spirale Ir. 394 18S ...	1066	0.0

	17	181	gii32394940 qbiAY154954.1 Trichoderma spirale Ir. 291 D 18... 666 0.0
50	03	182	gii5327279 embIAJ230676.1 TVI230676 Trichoderma viride (str... 1055 0.0
	06	183	gii32394940 qbiAY154954.1 Trichoderma spirale Ir. 291 D 18... 971 0.0
	11	184	gii3095170 qbiAF055211.1 AF055211 Trichoderma koningii 18S ... 333 2e-88
	15	185	gii16580101 qbiAY027784.1 Trichoderma harzianum GJS 99-227... 856 0.0
	20	186	gii5327279 embIAJ230676.1 TVI230676 Trichoderma viride (str... 1043 0.0
51	02	187	gii19880084 qbiAF359400.1 Trichoderma aureoviride strain T... 724 0.0
	07	188	gii4323322 qbiAF099008.1 AF099008 Trichoderma virens strain... 1041 0.0
	09	189	gii27448757 qbiAF443912.1 Trichoderma harzianum G.J.S. 00-... 940 0.0
	15	190	gii3095170 qbiAF055211.1 AF055211 Trichoderma koningii 18S ... 1068 0.0
52	04	191	gii22596152 qbiAF414329.1 Trichoderma inhamatum strain CCR... 680 0.0
	10	192	gii3095170 qbiAF055211.1 AF055211 Trichoderma koningii 18S ... 1043 0.0
	11	193	gii3095170 qbiAF055211.1 AF055211 Trichoderma koningii 18S ... 1061 0.0
	12	194	gii1518427 embIZ48933.1 TRITS12RR T.reesei (ATCC 24449 and ... 700 0.0
IB	01	237	gii9230639 qbiAF194019.1 AF194019 Trichoderma aureoviride s... 1039 0.0
IB	02	238	gii22596162 qbiAF414339.1 Trichoderma album strain CCRC336... 878 0.0
IB	03	239	gii19880146 qbiAF362103.1 Trichoderma citrinoviride strain... 1051 0.0
IB	04	240	gii1518427 embIZ48933.1 TRITS12RR T.reesei (ATCC 24449 and ... 735 0.0
IB	05	241	gii27448767 qbiAF443922.1 Trichoderma harzianum G.J.S. 00-... 862 0.0
IB	06	242	gii5106872 qbiAF097911.1 AF097911 Trichoderma stromaticum s... 1068 0.0
IB	09	245	gii9230639 qbiAF194019.1 AF194019 Trichoderma aureoviride s... 985 0.0
IB	10	197	gii4321693 qbiAF057633.1 AF057633 Trichoderma harzianum Th4.. 62 1e-06
IB	11	195	gii1518412 embIZ48935.1 TLBITS12R T.longibrachiatum (ATCC 5... 948 0.0
IB	12	246	gii9230631 qbiAF194011.1 AF194011 Trichoderma harzianum str... 801 0.0
IB	13	247	gii9230631 qbiAF194011.1 AF194011 Trichoderma harzianum str... 753 0.0
IB	14	248	gii5106872 qbiAF097911.1 AF097911 Trichoderma stromaticum s... 969 0.0
IB	15	249	gii19880145 qbiAF362102.1 Trichoderma longibrachiatum stra... 948 0.0
IB	16	196	gii21239368 qbiAF501329.1 Trichoderma atroviride strain CB... 948 0.0
IB	17	250	gii4323322 qbiAF099008.1 AF099008 Trichoderma virens strain... 977 0.0
IB	18	251	gii27448757 qbiAF443912.1 Trichoderma harzianum G.J.S. 00-... 938 0.0
IB	20	253	gii19032418 qbiAF345950.1 Trichoderma harzianum isolate GJ... 910 0.0
IB	21	254	gii30525766 qbiAY266646.1 Trichoderma harzianum strain 3DA... 182 5e-43
IB	22	255	gii27448757 qbiAF443912.1 Trichoderma harzianum G.J.S. 00-... 908 0.0
IB	23	256	gii5106872 qbiAF097911.1 AF097911 Trichoderma stromaticum s... 668 0.0
IB	24	257	gii30525793 qbiAY266673.1 Trichoderma asperellum strain 3D... 642 0.0
IB	26	259	gii1771829 embIX93929.1 TLRRN2606 T.longibrachiatum rRNA ge... 1037 0.0
IB	27	260	gii19880145 qbiAF362102.1 Trichoderma longibrachiatum stra... 1033 0.0
IB	28	261	gii32394934 qbiAY154948.1 Trichoderma harzianum Ir. 561 18... 918 0.0
IB	30	263	gii5106872 qbiAF097911.1 AF097911 Trichoderma stromaticum s... 823 0.0

ANEXO 5

**Avaliação *in vitro* da atividade celulolítica pelo método da
hidrólise da carboximetilcelulose**

ANEXO 5

Atividade celulolítica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. em meio CA1 contendo carboximetilcelulose (1º. lote)

(continua)

Código IB	Ø colônia (mm)									Ø total (mm)									Halo degrad. (mm)				
	1			2			3			x	1			2			3			y	y - x	%rel. IB11	
IB 11	16	16	15	17	17	17	18	18	19	17,0	37	38	38	36	38	37	40	40	40	38,2	21,2	100,0	
39-03	26	26	26	25	25	26	24	24	25	25,2	34	35	36	34	34	34	35	36	37	35,0	9,8	46,1	
39-06	23	23	24	22	23	23	23	23	23	23,0	24	25	25	24	23	23	24	24	24	24,0	1,0	4,7	
39-07	25	25	25	24	25	26	25	25	25	25,0	25	25	25	24	25	26	25	25	25	25,0	0,0	0,0	
39-10	27	27	27	36	36	37	27	27	27	30,1	39	39	39	36	37	39	40	41	40	38,9	8,8	41,4	
40-01	27	27	27	25	26	26	27	27	27	26,6	38	39	39	36	36	36	34	35	36	36,6	10,0	47,2	
40-03	26	26	27	28	28	29	27	27	27	27,2	36	37	38	38	38	39	38	38	38	37,8	10,6	49,8	
40-08	26	26	26	27	27	27	27	27	27	26,7	31	32	32	33	33	33	34	34	34	32,9	6,2	29,4	
40-12	26	27	27	27	28	29	27	28	29	27,6	37	38	38	38	38	38	36	37	38	37,6	10,0	47,2	
40-16	0	0	0	23	24	24	25	25	25	24,3	0	0	0	33	34	34	35	36	36	34,7	10,3	48,7	
41-01	29	30	31	28	28	28	29	29	30	29,1	42	42	42	41	41	41	38	39	40	40,7	11,6	54,5	
41-02	28	28	28	27	27	28	26	26	27	27,2	38	38	38	37	37	37	38	38	38	37,7	10,4	49,3	
41-03	0	0	0	25	26	27	26	24	24	25,3	0	0	0	36	37	37	34	35	34	35,5	10,2	48,0	
41-05	0	0	0	0	0	0	21	22	23	22,0	0	0	0	0	0	0	28	28	29	28,3	6,3	29,9	
42-04	29	29	29	28	28	28	28	28	29	28,4	33	34	35	37	38	38	34	35	35	35,4	7,0	33,0	
42-05	28	28	29	28	29	29	28	28	28	28,3	34	35	36	34	34	34	35	36	36	34,9	6,6	30,9	
42-06	26	27	27	24	25	26	26	26	27	26,0	35	35	36	37	37	38	35	36	36	36,1	10,1	47,7	
42-11	29	30	31	27	28	29	32	32	32	30,0	39	40	40	39	39	39	40	40	41	39,7	9,7	45,6	
43-01*	27	28	28	35	34	34	30	30	30	30,7	39	40	40	47	47	47	41	41	41	42,6	11,9	56,1	
43-05	31	31	32	29	29	30	29	30	30	30,1	36	37	37	38	39	39	39	40	40	38,3	8,2	38,8	
43-07	0	0	0	23	24	24	25	26	26	24,7	0	0	0	36	36	36	35	36	36	35,8	11,2	52,7	
43-16	24	24	24	24	25	26	24	24	24	24,3	36	36	36	36	37	37	36	36	36	36,2	11,9	56,1	
43-17	29	29	29	29	30	30	30	30	30	29,6	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39,0	9,4	44,5	
44-01	23	24	24	23	24	25	24	25	25	24,1	32	33	33	33	34	34	34	34	35	33,6	9,4	44,5	
44-18	25	25	25	26	26	26	25	26	26	25,6	40	40	40	41	41	41	41	42	42	40,9	15,3	72,3	
46-01	29	30	30	29	30	30	29	30	30	29,7	38	39	39	40	40	40	38	39	39	39,1	9,4	44,5	
46-07	26	27	27	25	25	25	25	26	25	25,7	40	40	41	39	40	40	39	39	39	39,7	14,0	66,0	
46-10	27	28	28	27	27	27	27	26	27	27,1	36	35	35	34	35	35	36	36	36	35,3	8,2	38,8	
46-17	29	29	30	29	29	29	28	28	28	28,8	39	39	39	39	39	39	39	38	39	39	38,9	10,1	47,7
46-18	24	24	24	23	23	24	24	24	24	23,8	36	37	37	36	36	36	38	39	39	37,1	13,3	62,9	
47-06	26	26	26	28	29	29	28	28	29	27,7	34	34	34	39	40	40	38	39	39	37,4	9,8	46,1	
47-07	27	27	27	27	27	27	28	28	29	27,4	36	36	37	35	35	36	37	38	38	36,4	9,0	42,5	
47-10	30	31	31	30	31	31	30	31	31	30,7	41	41	41	42	42	42	41	41	41	41,3	10,7	50,3	
49-11	27	27	28	27	27	27	28	28	28	27,4	38	38	39	32	32	33	34	35	35	35,1	7,7	36,2	
49-17*	29	32	30	35	25	34	25	26	31	29,7	36	37	39	43	35	41	43	35	40	38,8	9,1	43,0	
50-03	19	20	20	22	22	22	20	20	20	20,6	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34,0	13,4	63,4	
50-06	27	27	27	29	29	29	31	30	31	28,9	30	31	31	34	35	35	33	34	33	32,9	4,0	18,9	
50-11	25	26	26	25	26	26	26	26	26	25,8	34	35	35	36	36	36	35	35	35	35,2	9,4	44,5	
50-20	16	16	16	18	19	19	20	20	21	18,3	25	25	25	29	29	30	29	30	31	28,1	9,8	46,1	
51-07	27	27	27	29	29	28	27	28	28	27,8	36	36	36	38	39	39	37	39	39	37,7	9,9	46,6	
51-09	27	28	28	29	29	29	28	28	28	28,2	37	38	38	40	40	40	39	40	40	39,1	10,9	51,4	
52-04*	0	0	0	0	0	0	26	27	27	26,7	0	0	0	0	0	0	38	39	39	38,7	12,0	56,6	
52-11	23	23	23	23	23	23	24	24	24	23,3	34	34	34	34	34	34	35	35	35	34,3	11,0	51,9	
52-12	0	0	0	17	18	18	20	21	21	19,2	0	0	0	32	32	32	34	35	35	33,3	14,2	66,8	
Média																				45,2			
Desvio Padrão																				14,1			

Atividade celulolítica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. em meio CA1 contendo carboximetilcelulose (2º. lote) (continua)

Código IB	Ø colônia (mm)								Ø total (mm)								Halo degrad. (mm)					
	1		2		3		x		1		2		3		y	y - x	%rel. IB11					
IB 11	16	15	16	16	16	15	14	16	15,4	33	34	33	32	32	33	32,7	17,2	100,0				
30 05	26	27	27	27	27	28	26	26	26,7	37	32	37	38	39	38	38	38	37,2	10,6	61,4		
30 06	28	29	28	29	31	30	28	28	28,9	33	33	34	33	36	35	34	34	34,0	5,1	29,7		
30 08	22	21	21	21	21	21	19	19	20,6	32	32	32	34	33	33	29	29	29	31,4	10,9	63,3	
33-03	22	21	23	23	23	23	22	23	22,6	24	23	24	24	24	24	24	23	24	23,8	1,2	7,1	
33-09	25	24	24	24	25	24	24	24	24,3	39	40	39	40	39	39	39	39	39,2	14,9	86,6		
33-10	26	27	26	27	27	27	27	27	26,8	37	37	37	38	36	37	37	37	37,0	10,2	59,4		
33-14	20	20	19	0	0	0	19	21	19	19,7	34	34	34	0	0	0	33	33	33	33,5	13,8	80,4
34-02	29	29	28	30	28	30	28	27	27	28,4	33	33	33	32	33	32	32	32	32,4	4,0	23,3	
34-03	29	29	29	30	29	30	30	29	30	29,4	38	39	39	40	38	40	39	39	40	39,1	9,7	56,2
34-06	26	26	26	27	26	27	27	27	28	26,7	38	39	39	37	36	37	38	38	38	37,8	11,1	64,6
34-08	27	26	27	27	27	26	26	26	26,4	37	37	37	38	38	37	37	37	37,3	10,9	63,3		
35-04	28	28	29	28	28	28	29	29	29	28,4	40	40	40	40	40	40	41	41	40	40,2	11,8	68,5
35-13	26	26	26	26	27	26	26	26	26,1	37	36	37	37	37	36	36	36	36	36,4	10,3	60,1	
35-14	26	26	26	26	26	26	27	27	27	26,3	36	36	36	35	35	35	37	37	38	36,1	9,8	56,8
37-01	18	18	17	16	17	17	17	17	17,1	36	36	36	38	38	38	38	38	38	37,3	20,2	117,6	
37-02	20	21	20	20	21	20	19	20	20,1	38	37	36	39	39	39	37	38	38	37,9	17,8	103,4	
37-04	23	22	23	22	22	22	21	22	23	22,2	41	40	41	40	40	40	41	41	41	40,6	18,3	106,6
37-05	15	15	16	15	15	15	16	16	15	15,3	35	36	35	35	34	35	35	35	35,0	19,7	114,3	
39-15	27	26	27	26	27	27	27	27	26,8	36	36	37	37	36	36	38	39	38	37,0	10,2	59,4	
43-01	28	28	29	30	30	30	28	28	27	28,7	38	38	39	40	41	40	39	40	39	39,3	10,7	62,0
50-15	27	28	29	27	27	27	27	27	27,3	37	37	37	37	38	37	37	37	37	37,1	9,8	56,8	
52-04	27	26	27	27	27	28	28	27	28	27,2	40	40	40	40	40	40	41	41	41	40,3	13,1	76,2
31 03	24	23	24	24	25	25	24	23	24	24,0	35	36	35	38	38	38	35	35	34	36,0	12,0	69,8
31 08	29	29	29	30	29	29	29	29	29,1	38	38	38	38	38	39	38	38	38	38,1	9,0	52,3	
32-03	26	27	27	26	27	26	25	26	27	26,3	36	36	36	36	37	36	37	36	37	36,3	10,0	58,1
32-06	24	24	25	24	25	24	23	24	25	24,2	35	36	35	37	36	37	34	34	35	35,4	11,2	65,2
32-10	27	27	27	28	28	28	28	28	28	27,7	37	37	37	40	39	40	39	39	39	38,6	10,9	63,3
32-12	29	30	29	29	29	29	29	28	29	29,0	40	39	39	37	38	38	38	38	38,3	9,3	54,3	
36-01	14	15	16	12	11	12	13	14	14	13,4	23	24	23	18	18	17	23	23	24	21,4	8,0	46,5
36-03	15	14	15	15	16	15	15	16	15	15,1	25	24	25	25	26	25	27	27	27	25,7	10,6	61,4
36-06	18	19	18	0	0	0	0	0	0	18,3	30	29	29	0	0	0	0	0	0	29,3	11,0	64,0
36-09	28	28	28	29	29	29	30	30	30	29,0	39	39	39	40	40	40	39	39	39	39,3	10,3	60,1
36-10	29	29	29	28	28	28	27	28	28	28,2	38	39	39	39	39	40	38	37	37	38,4	10,2	59,4
38-01	22	22	22	18	18	18	18	19	18	19,4	35	34	34	31	32	32	30	30	30	32,0	12,6	73,0
38-04	20	20	20	20	20	20	20	20	20,0	35	35	35	35	36	35	36	36	36	36	35,4	15,4	89,8
38-09	28	28	28	29	28	29	27	28	27	28,0	39	39	39	40	40	41	38	39	39	39,3	11,3	65,9
38-11	25	25	25	25	24	25	25	25	25	24,9	36	36	36	36	36	36	37	36	37	36,2	11,3	65,9
38-13	29	28	28	28	28	28	29	28	28	28,2	37	37	37	40	39	40	39	39	39	38,6	10,3	60,1
45-01	27	27	27	27	27	27	27	28	27	27,1	40	39	40	38	39	40	38	39	39	39,1	12,0	69,8
45-03	24	24	25	25	25	25	25	25	24	24,7	40	41	40	40	40	40	40	40	40	40,1	15,4	89,8
45-09	25	25	25	24	24	24	25	25	25	24,7	41	41	40	39	39	39	37	38	38	39,1	14,4	84,0
45-10	28	28	28	29	29	29	28	28	29	28,4	40	39	39	40	40	40	38	39	39	39,3	10,9	63,3
45-14	27	27	27	27	27	27	27	27	27,0	38	39	38	40	39	39	40	40	40	39,2	12,2	71,1	
47-12	31	31	30	31	31	31	30	30	30	30,6	39	39	39	39	39	39	38	39	38	38,8	8,2	47,8
48-11	25	25	25	26	26	26	26	26	25	25,6	34	34	34	35	35	35	36	35	35	34,8	9,2	53,6
48-12	29	29	29	29	30	29	29	29	29	29,1	38	37	37	38	39	39	38	38	38	38,0	8,9	51,7
48-16	30	30	29	28	28	28	30	30	30	29,2	37	37	38	36	36	37	38	38	37	37,1	7,9	45,9
48-20	24	24	24	24	24	23	23	23	23	23,6	35	36	37	35	35	35	35	35	35	35,3	11,8	68,5
49-08	23	24	24	24	23	24	24	24	24	23,8	37	38	38	40	39	39	38	39	38	38,4	14,7	85,3
49-09	27	26	27	25	26	26	26	26	26	26,1	38	37	38	36	36	37	37	38	37	37,1	11,0	64,0
49-15	23	22	24	0	0	0	0	0	0	23,0	31	32	31	0	0	0	0	0	0	31,3	8,3	48,4
49-16	28	28	28	28	28	28	0	0	0	28,0	34	34	34	32	33	32	0	0	0	33,2	5,2	30,0
49-17	27	28	28	27	28	27	0	0	0	27,5	34	35	35	35	36	36	0	0	0	35,2	7,7	44,6
51-02	27	28	27	28	29	28	28	28	28	27,9	39	39	39	39	39	39	39	39	38	38,9	11,0	64,0
51-15	25	25	25	25	25	25	24	24	24	24,7	38	38	38	36	36	36	36	37	37	36,9	12,2	71,1
Média																	64,3					
Desvio Padrão																	20,1					

Atividade celulolítica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. em meio CA1 contendo carboximetilcelulose (3^o. lote)

Cód. IB	Ø colônia (mm)									Ø total (mm)									Halo degrad. (mm)			
	1			2			3			x	1			2			3			y	y - x	%rel. IB11
IB 11	16	16	17	16	16	16	16	16	16,1	34	34	34	35	35	35	35	36	35	34,8	18,7	100,0	
01 01	24	25	24	25	24	24	24	23	23	24,0	39	38	39	39	38	39	37	37	37	38,1	14,1	75,5
01 03	24	24	24	24	24	25	23	23	23,8	38	38	38	40	39	39	38	38	39	38,6	14,8	79,0	
01 04	22	24	22	22	22	23	22	22	22,4	36	36	36	37	36	36	37	36	37	36,3	13,9	74,3	
01 06	25	25	24	24	24	24	23	24	24	24,1	39	39	39	40	40	40	39	39	39,3	15,2	81,4	
01 07	25	23	24	23	25	25	24	24	24,1	40	40	40	40	40	40	39	38	39	39,6	15,4	82,6	
01 08	23	23	23	25	25	25	25	24	24	24,1	38	38	38	38	38	38	38	38	38,0	13,9	74,3	
01 09	21	20	21	20	20	21	20	22	21	20,7	23	22	23	22	22	23	22	24	22,7	2,0	10,7	
01 13	25	25	24	21	21	23	24	23	24	23,3	38	38	39	40	38	38	39	39	38,7	15,3	82,0	
02 03	23	24	24	22	24	24	24	22	23	23,3	36	36	36	36	36	36	37	36	36,1	12,8	68,3	
02 05	23	23	23	23	22	23	24	23	24	23,1	37	37	37	37	37	37	38	38	39	37,4	14,3	76,6
02 10	24	24	24	24	24	23	25	25	24	24,1	36	36	36	37	37	38	38	38	37,0	12,9	68,9	
02 14	23	22	23	22	23	22	24	23	23	22,8	37	37	37	37	37	38	37	38	37,2	14,4	77,2	
03 01	24	25	25	25	24	24	25	24	26	24,7	38	38	38	40	39	39	39	40	38,9	14,2	76,1	
03 02	24	25	25	24	26	24	25	24	24	24,6	39	40	39	39	38	39	39	40	39,1	14,6	77,8	
03 04	24	25	25	24	24	24	24	25	24	24,3	37	37	38	36	36	36	37	37	36,8	12,4	66,5	
04 01	24	24	25	25	25	24	24	24	25	24,4	39	39	40	38	38	39	39	39	38,8	14,3	76,6	
04 03	24	24	24	24	25	24	23	22	23	23,7	38	38	38	36	36	36	36	36	36,7	13,0	69,5	
04 04	25	25	26	24	24	25	26	25	25	25,0	37	37	37	38	38	38	38	38	37,7	12,7	67,7	
04 08	25	26	24	29	22	30	24	26	25	25,7	40	40	40	43	42	43	39	40	40,8	15,1	80,8	
04 09	23	23	24	25	24	24	23	23	24	23,7	39	39	39	39	39	39	39	39	39,0	15,3	82,0	
04 10	23	23	23	23	22	23	23	23	23	22,9	38	38	38	37	37	38	37	37	37,4	14,6	77,8	
04 11	23	23	23	23	24	23	22	22	20	22,6	38	38	38	37	36	37	37	37	37,2	14,7	78,4	
05 01	24	23	24	26	26	27	26	27	28	25,7	37	36	36	39	39	39	40	40	38,4	12,8	68,3	
05 04	27	26	27	28	28	27	28	28	27	27,3	40	40	40	40	40	40	41	41	42	40,4	13,1	70,1
09 01	24	24	24	23	23	23	24	24	24	23,7	40	40	40	38	38	39	40	40	39,4	15,8	84,4	
09 02	21	21	21	23	22	22	23	22	22	21,9	32	32	32	34	34	34	33	33	33,0	11,1	59,4	
09 04	22	22	22	21	22	22	22	22	22	21,9	34	34	34	34	34	34	35	35	35	34,3	12,4	66,5
09 09	22	21	20	0	0	0	21	20	20	20,7	32	32	32	0	0	0	32	32	32,0	11,3	60,6	
09 10	21	22	22	21	21	21	0	0	0	21,3	34	34	34	32	32	32	0	0	33,0	11,7	62,4	
11 02	28	28	28	28	28	28	27	28	28	27,9	38	38	38	37	37	36	37	37	37,2	9,3	49,9	
11 04	28	28	28	29	28	28	27	27	27	27,8	38	38	39	39	39	39	38	39	38	38,6	10,8	57,6
11 09	27	26	26	27	28	27	27	27	27	26,9	38	38	38	38	38	38	39	38	38	38,1	11,2	60,0
11 10	27	27	27	28	28	28	27	26	27	27,2	38	38	38	39	39	39	38	40	39	38,7	11,4	61,2
12 01	22	22	22	22	23	22	22	22	22	22,1	35	35	35	34	35	35	35	35	34,9	12,8	68,3	
13 05	29	30	29	30	29	29	32	30	31	29,9	35	35	35	35	35	34	36	35	36	35,1	5,2	27,9
13 10	26	26	26	27	27	26	27	26	27	26,4	37	37	37	37	37	37	36	37	36,9	10,4	55,9	
13 12	30	29	31	29	30	31	30	30	30	30,0	35	35	35	35	34	35	35	35	34,9	4,9	26,1	
14 04	28	28	28	28	28	28	29	28	29	28,2	34	34	34	34	34	33	35	35	34	34,1	5,9	31,5
15 06	28	28	29	29	29	28	29	28	28	28,4	40	41	40	40	40	39	41	40	41	40,2	11,8	63,0
16 01	30	30	30	30	30	30	29	29	29	29,7	39	38	39	39	39	39	38	38	39	38,7	9,0	48,1
16 04	29	29	30	30	30	30	30	30	30	29,8	39	39	39	39	39	39	39	39	39,0	9,2	49,3	
16 05	31	30	30	30	30	30	30	30	30	30,1	40	39	39	39	39	40	40	40	39,6	9,4	50,5	
16 08	29	28	28	30	29	28	27	27	28	28,2	39	40	38	41	40	41	40	39	39,7	11,4	61,2	
17 01	28	29	28	28	29	29	29	28	28	28,4	38	38	38	39	39	39	38	38	39	38,4	10,0	53,5
17 03	29	29	28	30	30	30	30	30	30	29,6	38	38	38	40	40	40	40	41	39,6	10,0	53,5	
17 05	29	28	29	28	27	28	28	28	28	28,1	39	39	40	40	40	40	39	39	40	39,6	11,4	61,2
17 07	29	29	29	29	29	29	29	29	30	29,1	39	40	40	39	38	39	38	38	39	38,9	9,8	52,3
18 02	27	27	27	27	27	27	26	26	26	26,7	38	38	38	38	38	38	37	37	38	37,8	11,1	59,4
18 03	24	24	24	23	23	23	25	24	25	23,9	26	26	26	25	25	25	27	26	27	25,9	2,0	10,7
18 05	29	28	29	29	29	29	30	31	29	29,2	36	36	36	36	36	34	34	34	35,3	6,1	32,7	
18 07	21	21	22	20	20	20	21	20	20	20,6	26	26	24	20	20	20	21	20	21,9	1,3	7,1	
18 08	23	23	23	24	24	23	23	24	24	23,4	36	37	37	36	36	36	38	37	36	36,6	13,1	70,1
18 09	27	27	27	27	27	27	0	0	0	27,0	40	40	40	39	40	39	0	0	0	39,7	12,7	67,7
18 11	23	23	23	23	23	24	23	23	23	23,1	32	32	32	31	32	32	33	32	32,1	9,0	48,1	
18 12	19	19	19	20	20	20	18	19	19	19,2	20	20	20	21	21	21	19	20	20,2	1,0	5,3	
19 01	32	31	31	32	30	32	31	30	31	31,1	41	40	41	41	40	41	40	40	40,4	9,3	49,9	
19 04	29	29	28	28	29	28	27	28	28	28,2	40	41	41	39	39	40	39	39	39,7	11,4	61,2	
20 05	23	23	23	24	25	25	23	24	23	23,7	25	25	25	26	27	27	25	26	25,7	2,0	10,7	
20 08	24	25	24	24	23	23	24	23	23	23,7	39	39	39	38	38	39	38	38	39	38,6	14,9	79,6

Atividade celulolítica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. em meio CA1 contendo carboximetilcelulose (3^o. e 4^o. lotes)

21 01	32	31	32	33	34	32	32	31	32	32,1	37	38	37	37	37	38	37	38	38	37,4	5,3	28,5
21 08	31	31	32	32	32	32	32	31	31	31,6	42	42	42	42	42	41	42	41	41,8	10,2	54,7	
21 11	30	31	31	31	30	31	32	32	31	31,0	35	35	34	35	35	36	36	36	36	35,3	4,3	23,2
22 09	29	28	28	29	29	29	29	30	29	28,9	38	38	38	38	38	38	39	38	39	38,2	9,3	49,9
22 10	25	25	25	23	23	23	0	0	0	24,0	34	33	34	29	29	29	0	0	0	31,3	7,3	39,2
22 11	28	28	28	29	29	30	28	28	28	28,4	37	38	37	37	36	37	38	38	38	37,3	8,9	47,5
23 01	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16,0	30	30	30	30	30	30	30	30	30,0	14,0	74,9	
23 02	10	10	10	9	10	9	9	10	10	9,7	11	11	11	11	11	12	12	11	11,2	1,6	8,3	
23 03	26	27	26	27	26	27	27	27	27	26,7	33	33	33	33	34	34	34	33	34	33,4	6,8	36,2
24 06	28	28	28	27	27	27	27	27	27	27,3	38	39	38	38	37	38	38	38	38	38,0	10,7	57,0
24 07	29	29	29	30	30	30	29	31	29	29,6	40	40	40	40	40	40	39	39	39	39,7	10,1	54,1
24-15	30	30	29	30	29	30	30	30	29	29,7	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36,0	6,3	33,9
25 01	29	28	28	27	28	27	28	26	26	27,4	29	29	29	28	29	28	29	27	27	28,3	0,9	4,8
25 03	30	30	30	29	29	29	30	30	30	29,7	39	39	39	38	38	38	38	38	38	38,3	8,7	46,3
25 05	29	29	30	30	28	30	30	29	30	29,4	35	36	35	36	36	35	36	36	35	35,6	6,1	32,7
25 06	24	22	25	25	23	24	23	22	23	23,4	36	35	36	36	36	36	36	37	36	36,0	12,6	67,1
25 08	30	31	30	30	30	29	30	30	30	30,0	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40,0	10,0	53,5
25 09	29	29	29	30	29	30	29	30	30	29,4	35	35	36	35	35	35	35	36	35	35,2	5,8	30,9
25 10	32	31	32	31	30	30	31	31	30	30,9	42	41	41	40	40	40	41	40	40	40,6	9,7	51,7
25 11	32	35	36	27	26	25	0	0	0	30,2	37	38	37	30	29	29	0	0	0	33,3	3,2	16,9
25 14	25	25	25	25	25	25	24	25	25	24,9	35	35	36	36	36	36	36	35	35	35,6	10,7	57,0
25 16	30	29	29	30	30	29	29	29	28	29,2	40	40	40	41	40	41	40	40	39	40,1	10,9	58,2
26 01	29	29	29	30	29	29	29	29	29	29,1	40	41	41	39	39	39	40	39	39	39,7	10,6	56,4
26 05	32	32	33	32	30	30	31	30	31	31,2	36	36	36	36	35	35	36	36	35	35,7	4,4	23,8
26 08	23	23	22	22	22	23	25	23	24	23,0	33	32	32	33	32	32	35	33	34	32,9	9,9	52,9
26 09	29	28	28	27	28	28	28	28	28	28,0	39	38	38	38	38	39	37	38	38	38,1	10,1	54,1
27 04	30	29	30	30	30	30	29	29	29	29,6	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38,0	8,4	45,2
27 08	27	27	28	28	28	27	27	28	28	27,6	40	41	41	40	41	40	41	41	41	40,7	13,1	70,1
27 11	28	28	28	0	0	0	0	0	0	28,0	39	39	39	0	0	0	0	0	0	39,0	11,0	58,8
28 03	27	27	28	27	27	27	27	28	28	27,3	37	37	36	36	36	37	37	36	37	36,6	9,2	49,3
28 05	30	29	30	31	30	33	0	0	0	30,5	35	36	37	37	36	37	0	0	0	36,3	5,8	31,2
28 10	29	28	29	29	28	29	28	28	28	28,4	38	39	38	37	37	37	37	38	37	37,6	9,1	48,7
28 15	27	27	28	28	28	28	27	27	27	27,4	36	37	36	37	37	37	35	36	36	36,3	8,9	47,5
29 04	30	28	30	30	30	29	31	31	31	30,0	36	35	36	37	36	36	37	37	38	36,4	6,4	34,5
29 08	27	27	28	27	27	27	22	22	22	25,4	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37,0	11,6	61,8
29 10	29	28	27	29	28	28	27	29	30	28,3	35	35	34	35	36	36	36	37	35	35,4	7,1	38,0
29 11	30	30	30	29	30	30	29	30	29	29,7	40	40	40	40	39	40	40	39	40	39,8	10,1	54,1
																				Média	53,8	
																				Desvio Padrão	20,4	

(4^o. lote)

Cód. IB	Ø colônia (mm)										Ø total (mm)								Halo degrad. (mm)			
	1			2			3			x	1		2		3		y	y - x	%rel. IB11			
IB 11	18	18	17	17	16	17	19	17	17	17,3	36	36	37	36	35	36	37	37	37	36,3	19,0	100,0
10 01	24	24	24	23	23	22	0	0	0	23,3	35	35	24	34	34	33	0	0	0	32,5	9,2	48,2
10 02	30	28	29	28	28	28	29	28	28	28,4	40	39	40	38	38	39	39	39	39	39,0	10,6	55,6
10 03	22	22	22	23	22	22	22	23	22	22,2	35	35	35	34	34	34	35	34	34	34,4	12,2	64,3
10 04	23	23	23	24	23	24	22	23	22	23,0	34	34	35	35	35	35	34	35	34	34,6	11,6	60,8
18 07	22	22	22	0	0	0	0	0	0	22,0	29	29	29	0	0	0	0	0	0	29,0	7,0	36,8
23 02	8	9	9	8	8	9	10	10	9	8,9	10	11	11	10	10	11	12	12	11	10,9	2,0	10,5
25 11	29	29	29	29	29	30	29	30	28	29,1	33	33	34	34	35	34	34	33	33	33,7	4,6	24,0
27 11	27	27	27	27	27	27	29	28	28	27,4	37	37	37	35	35	35	39	39	40	37,1	9,7	50,9
36-06	20	21	21	22	21	21	0	0	0	21,0	33	33	32	34	34	35	0	0	0	33,5	12,5	65,8
38-01	23	23	23	23	24	24	22	22	23	23,0	36	36	35	35	35	36	34	34	34	35,0	12,0	63,2
48-22	30	30	30	30	29	28	29	30	30	29,6	39	39	39	39	38	39	39	39	38	38,8	9,2	48,5
49-15	18	18	18	20	20	20	20	20	20	19,3	18	21	18	20	20	20	20	20	20	19,7	0,3	1,8
49-16	30	30	30	29	30	31	30	29	30	29,9	37	37	37	38	38	38	37	37	37	37,3	7,4	39,2
49-17	27	27	27	28	29	30	28	29	29	28,2	36	36	36	37	37	37	37	37	37	36,7	8,4	44,4
																				Média	43,9	
																				Desvio Padrão	19,9	

Atividade celulolítica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. em meio CA1 contendo carboximetilcelulose (5^o. lote)

Cód. IB	Ø colônia (mm)									Ø total (mm)									Halo degrad. (mm)			
	1			2			3			x	1			2			3			y	y - x	%rel. IB11
IB 11	19	17	18	18	17	18	18	18	17	17,8	35	35	35	35	35	35	35	35	35,0	17,2	100,0	
01 01	24	25	26	24	25	25	25	24	25	24,8	42	40	41	39	39	40	39	39	39,8	15,0	87,2	
01 02	27	26	26	27	26	26	26	25	25	26,0	40	40	40	40	39	40	40	40	40,0	14,0	81,4	
01 05	25	25	25	25	25	26	25	25	26	25,2	40	40	39	41	41	41	41	40	40,3	15,1	87,9	
01 09	22	21	20	21	21	22	23	22	21	21,4	23	22	21	22	22	23	24	23	22	22,4	1,0	5,8
01 13	24	25	26	25	24	25	0	0	0	24,8	41	41	40	40	40	39	0	0	40,2	15,3	89,1	
05 02	28	28	28	28	29	28	28	29	28	28,2	40	40	40	40	40	40	40	40	40,0	11,8	68,5	
05 03	28	28	28	28	28	29	28	28	29	28,2	43	43	43	42	42	43	43	43	42	42,7	14,4	84,0
05 05	22	22	21	24	23	25	24	23	22	22,9	30	30	28	31	29	30	30	33	32	30,3	7,4	43,3
06 01	29	28	28	29	28	28	34	35	34	30,3	34	33	34	34	34	33	39	38	38	35,2	4,9	28,4
06 02	13	13	14	13	12	13	13	14	14	13,2	23	24	23	23	23	23	23	23	23,1	9,9	57,5	
06 03	26	27	28	26	28	30	28	29	28	27,8	32	33	34	33	35	35	33	35	33	33,7	5,9	34,2
06 04	29	29	28	32	32	32	31	30	32	30,6	34	34	35	37	37	37	36	35	35	35,6	5,0	29,1
06 05	29	28	29	28	29	29	29	29	29	28,8	35	35	34	35	34	35	35	35	34	34,7	5,9	34,2
07 01	25	25	25	25	25	25	26	25	26	25,2	40	40	40	40	40	40	42	42	42	40,7	15,4	89,8
07 02	27	27	26	27	27	27	27	27	28	27,0	34	34	33	34	34	33	35	34	35	34,0	7,0	40,7
07 09	26	25	25	26	26	26	27	27	25	27	25,9	40	40	40	40	40	40	40	40	40,0	14,1	82,0
07 10	23	23	23	23	23	23	23	24	23	23,1	39	39	39	38	38	39	40	40	40	39,1	16,0	93,0
07 11	24	24	24	24	24	24	24	23	24	23,9	40	40	39	40	40	40	40	40	40	39,9	16,0	93,0
07 12	29	28	28	29	28	28	28	28	28	28,2	40	39	40	40	41	41	39	39	40	39,9	11,7	67,8
07 13	24	23	23	25	24	24	25	24	25	24,1	40	41	40	41	40	41	40	39	40	40,2	16,1	93,7
07 14	25	24	25	25	24	24	24	25	24	24,4	41	41	40	40	40	40	40	40	41	40,3	15,9	92,4
08 01	23	23	23	23	24	23	24	25	24	23,6	33	33	34	35	35	34	34	35	35	34,2	10,7	62,0
08 02	25	26	25	25	26	27	26	25	25	25,6	35	35	36	35	36	35	35	34	34	35,0	9,4	54,9
08 03	20	19	18	0	0	0	0	0	0	19,0	31	31	31	0	0	0	0	0	0	31,0	12,0	69,8
08 04	26	25	25	27	26	26	26	25	26	25,8	36	36	37	36	36	36	37	36	37	36,3	10,6	61,4
08 06	27	26	27	26	26	26	26	26	27	26,3	37	36	36	36	36	37	37	37	37	36,6	10,2	59,4
13 08	25	25	25	26	25	26	26	26	26	25,6	32	33	33	32	32	32	32	32	33	32,3	6,8	39,4
14 01	29	30	30	30	30	30	30	29	30	29,8	38	38	39	38	38	38	38	38	38	38,1	8,3	48,4
14 02	24	25	25	25	24	25	26	25	25	24,9	41	43	41	42	42	41	42	42	43	41,9	17,0	98,8
14 05	32	33	34	35	34	36	29	28	28	32,1	36	38	38	39	38	39	34	34	34	36,7	4,6	26,5
15 15	29	30	29	27	28	29	28	28	30	28,7	34	35	34	33	34	35	34	34	34	34,1	5,4	31,7
19 02	32	32	32	32	31	32	32	32	32	31,9	41	41	32	42	42	42	42	42	43	40,8	8,9	51,7
19 05	32	33	32	32	31	32	31	30	31	31,6	43	43	43	41	42	41	40	40	41	41,6	10,0	58,1
20 01	29	29	28	28	30	31	27	29	30	29,0	36	35	35	37	36	35	34	36	35	35,4	6,4	37,5
20 02	25	24	24	26	25	25	24	25	25	24,8	32	32	32	33	33	33	33	33	33	32,7	7,9	45,9
21 03	27	27	27	27	28	27	0	0	0	27,2	33	33	33	34	34	33	0	0	0	33,3	6,2	35,9
22 01	22	22	22	22	22	22	23	22	23	22,2	23	23	23	23	23	23	24	23	24	23,2	1,0	5,8
23 05	23	24	24	22	23	24	24	24	23	23,4	34	34	33	32	32	33	34	33	33	33,1	9,7	56,2
24 16	29	29	29	29	29	29	30	30	30	29,3	31	31	31	31	31	31	32	32	32	31,3	2,0	11,6
25 02	27	27	26	27	28	27	27	27	27	27,0	34	34	34	34	34	35	34	34	35	34,2	7,2	42,0
25 07	20	20	20	20	20	20	22	21	20	20,3	22	22	22	22	22	22	24	23	22	22,3	2,0	11,6
27 15	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27,0	39	39	39	40	40	40	39	39	39	39,3	12,3	71,7
29 16	26	27	27	27	26	27	26	27	26	26,6	35	36	35	36	37	36	37	35	36	35,9	9,3	54,3
30 12	30	30	30	29	30	30	32	32	31	32	37	37	37	36	36	37	37	37	37	36,8	6,1	35,5
31 06	20	22	23	21	20	21	21	21	21	21,1	29	32	32	31	30	30	32	32	31	31,0	9,9	57,5
31 07	21	21	21	0	0	0	0	0	0	21,0	31	30	30	0	0	0	0	0	0	30,3	9,3	54,3
32 01	31	31	31	32	31	30	30	31	31	30,9	42	42	42	42	43	43	41	42	42	42,1	11,2	65,2
35 15	32	32	32	31	31	31	32	32	32	31,7	37	37	37	36	36	36	37	37	37	36,7	5,0	29,1
52 10	18	16	16	17	17	15	16	16	15	16,2	29	29	29	30	30	30	28	28	28	29,0	12,8	74,3
Média																				55,8		
Desvio Padrão																				25,3		

ANEXO 6

Guia para Identificação Infragenérica de *Trichoderma***Parte 1** Aspectos Gerais**Parte 2** Chave Morfológica das Seções**Parte 3** Chave Morfológica das Espécies**Parte 4** Descrição das Espécies (em andamento)**Parte 5** Chave Morfológica das Espécies**Parte 6** Listas de Espécies Válidas (principais)**Item 1** Relação das Espécies Válidas (cf. Gams & Bisset, 1998)**Item 2** Relação das Espécies Válidas (cf. Samuels *et al.* 2004)

Item 3 Relação das Espécies Depositadas no GenBank (até 11/2003, cf. informação de origem)

Bibliografia Consultada:

- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. Nov. **Canadian Journal of Botany**, v.62, p.924-31, 1984.
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. **Canadian Journal of Botany**, v.69, p.2357-72, 1991a.
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. **Canadian Journal of Botany**, v.69, p.2373-417, 1991b.
- RIFAI, R.W. A revision of the genus *Trichoderma*. **C.M.I. - Mycological Papers**, v.116, p.1-56, 1969.
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on Section *Longibrachiatum*. **Canadian Journal of Botany**, v.69, p.2418-20, 1991c.
- FIDALGO, O., FIDALGO, M.E.P.K. Dicionário Micológico. **Rickia**, supl.2:232p. 1967.
- GAMS, W.; BISSETT, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. Ch.1. In: ***Trichoderma & Gliocladium***, ed. C.P. KUBICEK and G.E. HARMAN. Taylor & Francis Ltd.: London. 278pp. 1998.
- GAMS, W., AA, H.A. VAN DER, PLAATS-NITERINK, A.J. VAN DER, SAMSON, R.A. & STALPERS, J.A. **CBS Course of Mycology**. Centraalbureau voor Schimmelcultures: Baarn, Netherlands. 110p. 1987.
- SAMUELS, G.J. ***Trichoderma: A guide to the identification and biology***. Beltsville, MD: USDA/ARS, 2004. 54p. ilus. (Apost.).
- VIEGAS, A.P. **Dicionário de Fitopatologia e Micologia**. Ed. Ceres: Piracicaba, SP. 882p. 1979.

Parte 1 – Aspectos Gerais

O gênero *Trichoderma*

Trichoderma Pers.: Fr.

Trichoderma Persoon, Römer's Neues Mag. Bot. 1:92. 1794: Fries, Syst. mycol. 1:xliv. 1821 e Syst. mycol. 3:214. 1929.

SINONÍMIA, ver Rifai (1969).

LECTOTIPO: *T. lignorum* (Tode) Harz *fide* Clements e Shear (1931), nome não sancionado, os quais referem-se ao mesmo fungo como *Trichoderma viride* Pers.: Fr. designado por Hughes (1958).

Colônias usualmente com crescimento rápido, micélio inicialmente submerso, eventualmente com textura variada, micélio aéreo hialino aracnóide, flocoso ou lanoso, dependendo da linhagem e meio da cultura. Reverso não colorido ou variando amarelo amarronzado, amarelo, âmbar, opaco avermelhado ou verde-amarelo. Odores principalmente pronunciados ou fracos, característico do gênero, sugerindo côco ou cânfora. Conidiogênese espalhada ou agrupada ou formando pústulas compactas; tipicamente em matizes de verde, ou menos freqüentemente brancas, cinzas ou marrons. Conidióforos na maioria das espécies com eixo principal largo, ramificado em intervalos regulares, usualmente com sucessivos ramos os quais se encurtam e afinam progressivamente apical e distalmente; ramos mais ou menos divergentes, solitários, pareados ou em verticilos; ramificações verticiladas repetitivas podem resultar numa estrutura piramidal ramificada; a ramificação em outras espécies é menos regular, com ramos solitários ou pareados e não extensivamente re-ramificados. Na seção *Pachybasium*, o eixo principal do conidióforo e ramos primários são freqüentemente terminados por prolongamentos estéreis de conidióforos os quais podem ser simples ou ramificados, retos, flexuosos, ondulados, hamatos ou espiralados; podendo ocorrer anastomose entre conidióforos adjacentes. Freqüentemente fiáides e ramos férteis também surgem a partir de outras hifas aéreas não diferenciadas em áreas de conidiogênese efusa. Células fialídicas conidiogênicas tipicamente dispostas em verticilos divergentes terminais sobre os ramos do conidióforo, ou em espirais

diretamente abaixo do septo ao longo do conidióforo e ramos; ou então pareadas ou solitárias e dispostas irregularmente; cilíndricas, subuladas, lageniformes, ampuliformes ou subglobosas; usualmente atenuando-se até um gargalo estreito, curto e cilíndrico de sustentação dos conídios. Conídios unicelulares, tipicamente verdes, ou então incolores, cinzentos ou amarronzados; parede lisa até tipicamente rugosa ou com projeções sinuosas, buladas ou em forma de asa a partir da parede externa; subglobosos, obovóides, elipsóides, oblongos ou cilíndricos-curtos; acumulando-se cabeças gloeóides, algumas vezes contidos em um estojo semelhante a um saco visível somente em grande aumento (MEV). Clamidósporos usualmente presentes e freqüentemente abundantes, especialmente no micélio submerso; intercalares, ou terminais sobre pequenos ramos laterais da hifa vegetativa; globosos a elipsóides, incolores a amarelado ou esverdeado pálido, com parede lisa ou algumas vezes espessa (até 4 μm). Hifa vegetativa usualmente hialina, paredes lisas, (1-)2-10 μm de largura, menos freqüentemente (ou no micélio submerso) amarelo pálido, com espessuras de parede irregulares acima de 16 μm de largura. Teleomorfo, quando conhecido, *Hypocrea*, *Podostroma* ou *Sarawakus*.

Classificação infra-genérica de *Trichoderma*: – Rifai (1969) dividiu o gênero em nove agregados de espécies definidos principalmente pela morfologia do conidióforo. O sistema de Rifai é ainda empregado para identificação, embora não acomode toda a faixa de variação morfológica atualmente reconhecida. Bissett (1991a) propôs uma classificação revisada, baseada em grande parte baseada nos agregados de espécies de Rifai, a qual dividiu o gênero em cinco seções, também definidas pelas características do sistema de ramificação dos conidióforos. Esta nova classificação foi proposta para relacionar formas morfológicamente similares, e também para acomodar a grande faixa de variação morfológica apresentadas pelos anamorfos de *Hypocrea*. Bissett expandiu o conceito de *Trichoderma* para incluir também algumas formas anteriormente aceitas em *Gliocladium*, embora reconhecendo que as seções foram quase seguramente não monofiléticas. Fora a necessidade de fundir a seção *Saturnisporum* Doi *et al.* (1987) com a seção *Longibrachiatum*, parece prematuro propor uma nova alteração na classificação de *Trichoderma*, sendo que o esquema de identificação descrito a seguir emprega a classificação em quatro seções similares aquelas propostas por Bissett (1991a).

Parte 2 – Chave para as seções de *Trichoderma*

- 1(a)** Conidiogênese espalhada, conídios não verde, conidióforos com pouco ou nenhum ramo lateral; fiálides nascidas em verticilos simples terminais, cilíndricas a lageniformes, do tipo “*Cephalosporium*”.....**seção *Hypocreanum***
- 1(b)** Conidiogênese efusa ou fasciculada até pustulada, conídios freqüentemente verdes; conidióforos com ramos laterais freqüentes; fiálides em sua maioria lageniformes até ampuliformes.....**2**
- 2(a)** Eixo principal do conidióforo longo com ramos secundários curtos, não intensamente re-ramificados; ramos e fiálides freqüentemente surgindo individualmente, particularmente aqueles terminais; conídios lisos mas algumas vezes com ornamentação conspícua, sinuada, em forma de asa ou bulada.....**seção *Longibrachiatum***
- 2(b)** Conidióforos com repetidas re-ramificações; ramos e fiálides pareados ou verticilados, também aqueles em posições terminais; conídios com parede lisa ou verrucosa**3**
- 3(a)** Conidióforos e ramos relativamente largos (eixo principal até 10µm de largura); fiálides em verticilos de 2-7, ampuliformes até lageniformes; conídios verdes, amarronzados ou hialinos.....**seção *Pachybasium***
- 3(b)** Conidióforos e ramos estreitos e flexuosos (eixo principal até 6 µm de largura); fiálides na maioria em verticilos de 2 ou 3 (-5), lageniformes até subuladas; conídios sempre de cor verde.....**seção *Trichoderma***

As espécies da seção *Trichoderma* apresentam conidióforos estreitos e flexuosos; com ramos e fiálides espalhados, freqüentemente pareados e raramente em verticilos com mais de três. Na seção *Pachybasium* (Sacc.) Bisset inclui espécies com intensa ramificação, conidióforos largos, geralmente dispostos em pústulas compactas ou fasciculadas, e com ramos e fiálides largas ou infladas, relativamente curtas e dispostas em verticilos aglomerados. Algumas espécies são, além disso, caracterizadas pela produção de conidióforos com extensões estéreis e muito isolados produzem pústulas conidiógenas compactas com conidióforos adjacentes freqüentemente apresentando

anastomose. Na seção *Longibrachiatum* Bisset (1984) os conidióforos são esparsa e irregularmente ramificados, com as fiálides também dispostas irregularmente e não habitualmente em espirais ou verticilos. Espécies da seção *Longibrachiatum* freqüentemente produzem pigmentos amarelo-esverdeados característicos no reverso das culturas. A seção *Saturnisporum* Dóí *et al.* (1987) foi caracterizada pelo sistema de ramificação similar à seção *Longibrachiatum*, com ramos e fiálides não aglomerados e freqüentemente pareados, mas com fiálides infladas e pústulas conidiógenas compactas como na seção *Pachybasium*. A seção foi posteriormente diferenciada pela ornamentação, bulada ou semelhante à asa, dos conídios. Dados moleculares (Kuhls *et al.*, 1997) têm mostrado que estas espécies estão intimamente relacionadas a outras da seção *Longibrachiatum* e os padrões de ramificação dos conidióforos também se encaixam nesta seção. A seção *Hypocreanum* Bisset (1991a) acomoda anamorfos de *Hypocrea*, a maioria da seção *Homalocrea* (Sacc.) Dóí, e isolados ocasionais de solo ou madeira que são caracterizados por uma conidiogênese efusa, geralmente esparsa, conidióforos fracamente ramificados, e fiálides cilíndricas a subuladas freqüentemente originadas em verticilos divergentes semelhantes a *Verticillium*. Culturas antigas ou esgotadas de espécies das outras seções podem desenvolver uma morfologia similar nas áreas de conidiogênese efusa.

As seguintes chaves servem para identificar a maioria das espécies conhecidas de *Trichoderma*, embora nem todos as espécies anamórficas de *Hypocrea* e gêneros próximos conhecidos tenham sido incluídos. Em particular, os anamorfos de *Hypocrea* referentes a *Trichoderma* seção *Hypocreanum*, os quais são raramente observados independentes do teleomorfo, não são tratados. Também não o são todas as conexões de teleomorfos conhecidas ou suspeitas aplicadas aos agregados de espécies citados aqui – suas distinções morfológicas *in vitro* requerem um estudo mais aprofundado.

Parte 3 – Chave para as espécies de *Trichoderma*

3.1. Chave para espécies de *Trichoderma* seção *Trichoderma*

- 1(a) Colônias de crescimento lento, atingindo menos que 6 cm de diâmetro em 7 dias a 20°C.....2
- 1(b) Colônias de crescimento rápido3
- 2(a) Colônias verde-amarelas, flocosas, fiálides delgadas, quase iguais a *Verticillium* mas curvas, conídios obovóides com base truncada, 3,0–5,0 x 2,0–3,2µm.....2. *Trichoderma aureoviride* anam. de *Hypocrea aureoviridis*
- 2(b) Colônias verdes, granulares, conidiogênese tardia; fiálides em forma garrafa; conídios elipsóides, 3,5-5,0 x 2,0-2,6µm.....
.....[*Trichoderma* anam. de *Podostroma alutaceum*]
- 3(a) Conídios cilíndricos, 3,0-4,8 x 1,9-2,8µm.....4. agregado *T. koningii*
- 3(b) Conídios subglobosos a elipsóides curtos ou ovóides.....4
- 4(a) Conídios ovóides com base truncada, 3,5-5,0 x 2,5-3,2µm.....5. *Hypocrea vinosa*
- 4(b) Conídios subglobosos a elipsóides curtos.....5
- 5(a) Conídios completamente maduros verde pálidos, 2,5-3,5 x 2,1-3,0µm.....3. agregado *T. harzianum*
- 5(b) Conídios completamente maduros tornando-se verde escuros.....6
- 6(a) Conídios completamente maduros mais ou menos rugosos, 3,6-4,5µm de diâmetro ou 4,0-4,8 x 3,5-4,0µm.....6. agregado *T. viride*
- 6(b) Conídios completamente maduros com parede lisa, usualmente 2,6-3,8 x 2,2-3,4µm.....1. *T. atroviride*

3.2. Chave para espécies de *Trichoderma* seção *Pachybasium*

(modificado de Bisset, 1991b)

- 1(a)** Conidiogênese inteiramente espalhada, ou conidióforos dispostos em pústulas chatas livremente dispostas ou em pequenos fascículos irregulares; conidióforos escassamente ramificados com os ramos principais mais freqüentemente surgindo individualmente ou pareados [se os conídios são hialinos, ver **9(b)**].....**2**
- 1(b)** Conidióforos dispostos em pústulas compactas, hemisféricas ao formato de almofada; conidióforos usualmente bastante ramificados com ramos de 2-4 verticilos.....**8**
- 2(a)** Conidióforos dispostos em fascículos até 2mm de diâmetro.....**3**
- 2(b)** Conidióforos espalhados, ou livremente organizados em pústulas chatas.....**4**
- 3(a)** Colônias menores que 4cm de diâmetro após 4 dias a 20°C; hifas aéreas maiores que 1,5µm de largura; fiálides convergentes; clamidósporos pouco freqüentes; conídios 2,5-4,5 x 2,0-3,1µm.....**12. *Trichoderma anam.* de *Hypocrea gelatinosa***
- 3(b)** Colônias maiores que 4cm de diâmetro após 4 dias; hifas aéreas em sua maioria menores que 1,5µm de largura; fiálides divergentes; clamidósporos abundantes em micélio velho; conídios 2,9-4,0 x 2,0-2,9µm.....**9. *T. fasciculatum***
- 4(a)** Conídios subglobosos a obovóides, menores que 3,5 x 2,5µm, predominantemente verde pálidos.....**5**
- 4(b)** Conídios bastante elipsóides, maiores que 3,5 x 2,5µm, de outra cor**6**
- 5(a)** Conidiogênese usualmente difusa; fiálides em forma de frasco; 5,5-7,5 (na posição terminal -10) x 2,5-3,2µm, em grupos divergentes de 3-5; conídios subglobosos a obovóides curtos, 2,5-3,5 x 2,1-3,0µm.....**ver 3. agregado *T. harzianum***
- 5(b)** Conidiogênese mais ou menos pustular mas desprovidos de apêndices estéreis; fiálides de maneira geral em formato de frasco, 4-5(-7) x 2,3-3,0µm; conídios subglobosos, 2,3-3,0 x 2,0-2,6µm.....**14. *T. inhamatum***
- 6(a)** Conídios marrom pálidos, 3,0-5,3 x 2,4-4,3µm.....**11. *T. flavofuscum***
- 6(b)** Conídios verde escuros.....**7**

- 7(a)** Conidióforos agregados em pústulas planas sobre MA (agar malte), usualmente com prolongamentos apicais estéreis; fiálides divergentes; conídios 3,7-5,3 x 2,6-3,7µm.....**7. *T. crassum***
- 7(b)** Conidiogênese inteiramente espalhada, ou conidióforos desprovidos de extensões apicais estéreis; fiálides convergentes peniciladas; conídios 3,5-6,0 x 2,8-4,1µm.....**26. *T. virens***
- 8(a)** (1) Conidiogênese branca a amarelo-amarronzado.....**9**
- 8(b)** Conidiogênese eventualmente verde para cinza.....**10**
- 9(a)** Conidióforos com prolongamentos apicais estéreis espiralados; fiálides divergentes; conídios elipsóides, 2,3-3,6 x 1,4-2,2µm.....**19. *T. polysporum***
- 9(b)** Conidióforos desprovidos de prolongamentos estéreis; fiálides mais ou menos convergentes; conídios subgloboso, 2,5-3,5µm de diâmetro.....**18. *T. piluliferum***
- 10(a)** Conidióforos com prolongamentos apicais estéreis conspicuamente verrucosos, conidiogênese reluzente amarelo-esverdeada ou pardo rosado; conídios 2,8-4,0 x 1,8-2,5µm.....**8. *T. croceum***
- 10(b)** Conidióforos desprovidos de prolongamentos estéreis ou prolongamentos não verrucosos; conidiogênese em matizes variadas de verde ou cinza.....**11**
- 11(a)** Conidióforos dispostos em pústulas ate 2mm diâmetro, verde claras azuladas a acinzentadas; e eixo principal do conidióforo de 4,5-7µm de largura sobre a parte fértil; conídios 3,0-4,6 x 1,8-2,7µm.....**21. *Trichoderma anam. de Hypocrea semiorbis***
- 11(b)** Conidióforos em pústulas maiores, usualmente em matizes verdes definidas; ou o eixo principal do conidióforo não excedendo 5,5µm de largura sobre a parte fértil.....**12**
- 12(a)** Conídios consistentemente menores que 3,5µm de comprimento e 2,5µm de largura.....**13**
- 12(b)** Conídios em sua maioria mais longos e/ou mais largos.....**15**
- 13(a)** Conídios subglobosos a largamente obovóide.....**ver 5**
- 13(b)** Conídios elipsóides, 2,5-3,4 x 1,8-2,3µm.....**14**
- 14(a)** Áreas conidiógenas verde brilhante para amarelo-verde, eixo principal do conidióforo ramificado e fértil até o ápice.....**16. *T. minutisporum***

- 14(b)** Áreas conidiógenas cinza-verde, eixo principal do conidióforo com prolongamentos apicais estéreis conspicuamente espiralados..**25. *T. minutisporum***
- 15(a)** Reverso da colônia conspicuamente pigmentado com matizes amarelo a marrom avermelhado; eixo principal do conidióforo muito robusto, 4-6,5µm de largura na base dos prolongamentos estéreis.....**15**
- 15(b)** Reverso da colônia não colorido a amarelado pálido opaco; eixo principal do conidióforo usualmente com 3,5-5µm de largura na base do prolongamento estéril.....**17**
- 16(a)** Eixo principal do conidióforo relativamente reto em sua extensão, parte superior não ramificada e estéril na região próxima do ápice, o qual é terminalizado por uma única fiálide ou mais freqüentemente por 2-3 ramos férteis curtos; conídios 3,0-4,5 x 1,9-2,5µm.....**10. *T. fertile***
- 16(b)** Eixo principal do conidióforo com um prolongamento apical estéril espiralado, nunca com ramos férteis perto do ápice;.conídios 3,0-4,4 x 1,8-2,7µm.....**22. *T. spirale***
- 17(a)** Conídios estritamente cilíndricos, freqüentemente mais longos que 4,5µm, nunca mais curtos que 3,5µm.....**18**
- 17(b)** Conídios cilíndricos a elipsóides, raramente mais longos que 4,5µm, nunca mais curtos que 3,5µm.....**19**
- 18(a)** Eixo principal do conidióforo com prolongamento estéril ondulado a espiralado, intensamente ramificado e apresentando anastomose dentro de 100µm do ápice agudo; conídios 3,9-5,7 x 2,0-3,0µm.....**15. *T. longipile***
- 18(b)** Eixo principal do conidióforo com prolongamento estéril reto a flexuoso levemente ramificado com um ápice arredondado abruptamente; conídios 3,5-5,0 x 1,7-2,8µm.....**17. *T. oblongisporum***
[se conídios elipsóides de maneira geral, 3,7-5,3 x 2,6-3,7µm, ver também 7(a)]
- 19(a)** Eixo principal do conidióforo com prolongamento estéril reto a flexuoso.....**20**
- 19(b)** Eixo principal do conidióforo com prolongamento estéril ondulado a espiralado ou circinado.....**21**

- 20(a)** Pústulas conidiógenas verde azuladas, parecendo epinescentes devido a presença de ápices de conidióforos estéreis rígidos em formato de ponteiros; conídios 3,0-4,8 x 1,8-2,5µm.....**25. *T. strigosum***
- 20(b)** Pústulas conidiógenas verde opacas, parecendo cobertas de pelos devido a presença de ápices de conidióforos estéreis muito longos, retos ou flexuosos; conídios 2,8-4,0 x 2,2-3,0µm.....**23. *T. strictipile***
- 21(a)** Pústulas conidiógenas verde-azuladas.....**22**
- 21(b)** Pústulas conidiógenas verde-brilhantes, superfície lanosa devido à presença conidióforos com ápices estéreis, finos, ondulados e ramificados, conídios 3,1-4,7 x 2,0-2,9µm.....**20. *T. pubescens***
- 22(a)** Pústulas conidiógenas parecendo aveludadas devido à presença de ápices de conidióforos estéreis fortemente ondulados ou hamatos, conídios 3,0-4,5 x 2,1-2,8µm.....**13 *T. hamatum***
- 22(b)** Pústulas conidiógenas parecendo lanosas devido à presença de conidióforos com ápices espiralados grossos; conídios 3,0-4,4 x 1,8-2,7µm.....**22. *T. spirale***

3.3. Chave para espécies de *Trichoderma* seção *Longibrachiatum*

- 1(a)** Conídios elipsóides, ornamentados conspicuamente com estruturas semelhantes a asa e verrucosas, 3,6-5,8 x 2,8-3,4µm, verde-escuros.....**33. *T. saturnisporum***
- 1(b)** Conídios geralmente de parede lisa ou alguns conídios com projeções pustuladas na camada externa da parede.....**2**
- 2(a)** Conidióforos originando ramos laterais que são comumente re-ramificados uma ou duas vezes; fiálides distintamente constrictas na base; conídios em sua maioria menores que 4,0-2,5µm.....**3**
- 2(b)** Conidióforos muito pouco ramificados; fiálides quase cilíndricas e, dificilmente ou não constrictos, todos ligados à base; conídios em sua maioria maiores que 4,0 x 2,5µm.....**4**
- 3(a)** Colônias com áreas conidiais tipicamente formando grandes pústulas compactas; conidiogênese em matizes amarelo-verde ou verde-oliva escura em culturas

- velhas; conídios elipsóides e em sua maioria menores que 3,5 x 2,0µm.....**27. *T. citrinoviride***
- 3(b)** Colônias com áreas conidiais largamente efusas e não formando pústulas; conidiogênese em sua maioria em matizes verde-azuladas e não escurecendo consideravelmente com o tempo; conídios elipsóides para quase cilíndricos e em sua maioria 4,0-5,0(-6,0) x 2,5-3,0µm.....**30. *T. pseudokoningii***
- 4(a)** Conídios na maioria maiores que 5,0µm, usualmente medindo 6,0-7,5 x 3,0-3,7µm, elipsóides, verde-escuros, freqüentemente misturados com conídios cilíndricos, pálidos e mais estreitos, 5,0-2,0 x 2,0-2,5µm.....**5**
- 4(b)** Conídios usualmente menores que 5,0µm.....**6**
- 5(a)** Conídios consistentemente com parede lisa.....**29. *T. parceranosum***
- 5(b)** Conídios ovais, estreitos a subcilíndricos, 5,6-8,2 x 2,9-3,8µm, em sua maioria com parede lisa, mas alguns apresentando projeções pustulares na camada externa do conídio.....**32. *T. ghanense***
- 6(a)** Conídios curtos e cilíndricos a obovóides, com a base terminalizada de forma cônica, 4,0-5,5 x 2,0-2,5µm; reverso não colorido.....**28. *T. longibrachiatum***
- 6(b)** Conídios obovóides a elipsóides, 3,5-4,5 x 2,3-3,0µm; colônias exsudando pigmento amarelo no ágar.....**31. *T. reesei***
-

Item 1. Espécies consideradas válidas segundo Gams & Bissett, (1998)

1. Trichoderma atroviride
2. Trichoderma aureoviride
3. Trichoderma citrinoviride
4. Trichoderma crassum
5. Trichoderma croceum
6. Trichoderma fasciculatum
7. Trichoderma fertile
8. Trichoderma flavofuscum
9. Trichoderma ghanense
10. Trichoderma hamatum
11. Trichoderma harzianum
12. Trichoderma inhamatum
13. Trichoderma koningii
14. Trichoderma longibrachiatum
15. Trichoderma longipile
16. Trichoderma minutisporum
17. Trichoderma oblongisporum
18. Trichoderma parceramosum
19. Trichoderma piluliferum
20. Trichoderma polysporum
21. Trichoderma pseudokoningii
22. Trichoderma pubescens
23. Trichoderma reesei
24. Trichoderma saturnisporum
25. Trichoderma spirale
26. Trichoderma strictipile
27. Trichoderma strigosum
28. Trichoderma virens
29. Trichoderma viride

Item 2. Espécies consideradas válidas segundo Samuels *et al.* (2003). Levantamento feito em 11/2003 incluindo espécies teleomórfas.

1. Trichoderma aggressivum
2. Trichoderma asperellum
3. Trichoderma atroviride
4. Trichoderma aureoviride
5. Trichoderma citrinoviride
6. Trichoderma crassum
7. Trichoderma fasciculatum
8. Trichoderma fertile
9. Trichoderma ghanense
10. Trichoderma hamatum
11. Trichoderma harzianum
12. Trichoderma koningii
13. Trichoderma longibrachiatum
14. Trichoderma minutisporum
15. Trichoderma oblongisporum
16. Trichoderma polysporum
17. Trichoderma pseudokoningii
18. Trichoderma pubescens
19. Trichoderma saturnisporum
20. Trichoderma spirale
21. Trichoderma strictipile
22. Trichoderma strigosum
23. Trichoderma stromaticum
24. Trichoderma tomentosum
25. Trichoderma virens
26. Trichoderma viride
27. Hypocrea andinensis
28. Hypocrea neorufa
29. Hypocrea nigrovirens
30. Hypocrea patella
31. Hypocrea semiorbis

Item 3. Espécies com seqüências gênicas depositadas no GenBank
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) determinadas conforme os autores dos depósitos.
(levantamento feito em 11/2003)

1. *Trichoderma aggressivum*
2. *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*
3. *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*
4. *Trichoderma album*
5. *Trichoderma asperellum*
6. *Trichoderma atroviride*
7. *Trichoderma aureoviride*
8. *Trichoderma* cf. *aureoviride*
9. *Trichoderma cerinum*
10. *Trichoderma citrinoviride*
11. *Trichoderma crassum*
12. *Trichoderma croceum*
13. *Trichoderma effusum*
14. *Trichoderma erinaceum*
15. *Trichoderma esasiaensis*
16. *Trichoderma fasciculatum*
17. *Trichoderma fertile*
18. *Trichoderma ghanense*
19. *Trichoderma* cf. *hamatum*
20. *Trichoderma* cf. *harzianum*
21. *Trichoderma hebeiensis*
22. *Trichoderma helicum*
23. *Trichoderma inhamatum*
24. *Trichoderma konilangbra*
25. *Trichoderma longibrachiatum*
26. *Trichoderma longipile*
27. *Trichoderma mimkoningii*
28. *Trichoderma oblongisporum*
29. *Trichoderma parceramosum*
30. *Trichoderma pseudokoningii*
31. *Trichoderma pubescens*
32. *Trichoderma* cf. *reesei*
33. *Trichoderma rossicum*
34. *Trichoderma saturnisporum*
35. *Trichoderma sinensis*
36. *Trichoderma spirale*
37. *Trichoderma strigosum*
38. *Trichoderma stromaticum*
39. *Trichoderma taiwanenese*
40. *Trichoderma todica*
41. *Trichoderma tomentosum*
42. *Trichoderma velutinum*
43. *Trichoderma virgatum*
44. *Trichoderma viride*

ANEXO 7

**Alinhamento das seqüências da região ITS1-5,8S-ITS2
das espécies de *Trichoderma* utilizadas no presente estudo**

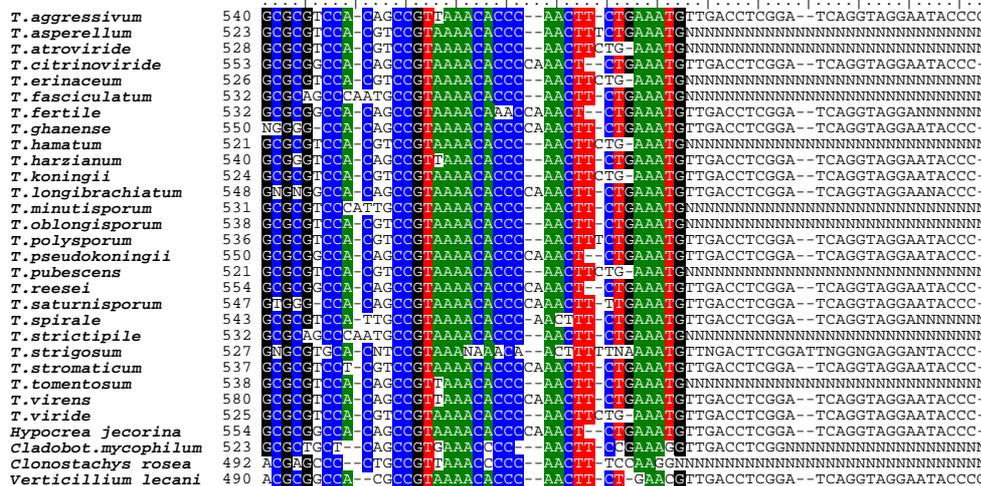
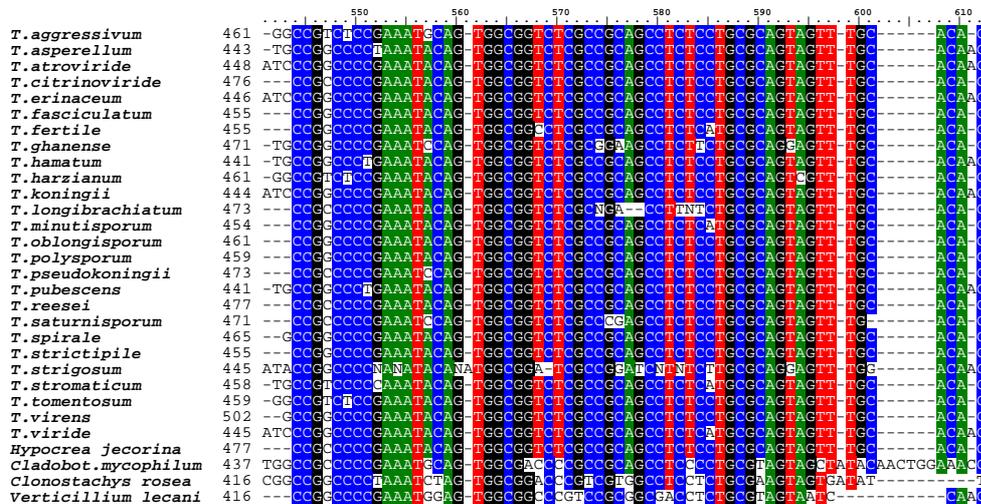
Anexo 7 – Sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do nrDNA alinhadas, utilizadas na análise filogenética

		10	20	30	40	50	60	70
<i>T. aggressivum</i>	1	AAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATT	CAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. asperillum</i>	1	NN	CCAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. atroviride</i>	1	NN	CCAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. citrinoviride</i>	1	AAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATT	CAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. erinaceum</i>	1	NN	CCAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. fasciculatum</i>	1	NN	CCAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. fertile</i>	1	NN	CCAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. ghanense</i>	1	NN	CCAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. hamatum</i>	1	NN	CCAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. harzianum</i>	1	GGGAGATTGGAGGGATCATT	CAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. koningii</i>	1	NN	CCAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. longibrachiatum</i>	1	NN	CCAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. minutisporum</i>	1	NN	CCAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. oblongisporum</i>	1	NN	CCAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. polysporum</i>	1	AAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATT	CAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. pseudokoningii</i>	1	AAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATT	CAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. pubescens</i>	1	NN	CCAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. reesei</i>	1	AAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATT	CAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. saturnisporum</i>	1	NN	CCAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. spirale</i>	1	NN	CCAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. strictipile</i>	1	NN	CCAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. strigosum</i>	1	NN	CCAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. stromaticum</i>	1	AAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATT	CAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. tomentosum</i>	1	NN	CCAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. vires</i>	1	AAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATT	CAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>T. viride</i>	1	AAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATT	CAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>Hypocrea jecorina</i>	1	AAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATT	CAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>Cladobot.mycophilum</i>	1	NN	CCAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>Clonostachys rosea</i>	1	NN	CCAG	CA	AA	AA	AA	AA
<i>Verticillium lecani</i>	1	NN	CCAG	CA	AA	AA	AA	AA

		100	110	120	130	140	150	160
<i>T. aggressivum</i>	89	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. asperillum</i>	89	GGGGGA	AC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. atroviride</i>	89	GGGGGA	AC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. citrinoviride</i>	89	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. erinaceum</i>	89	GGGGGA	AC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. fasciculatum</i>	89	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. fertile</i>	91	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. ghanense</i>	85	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. hamatum</i>	89	GGGGGA	AC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. harzianum</i>	89	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. koningii</i>	89	GGGGGA	AC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. longibrachiatum</i>	87	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. minutisporum</i>	90	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. oblongisporum</i>	90	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. polysporum</i>	90	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. pseudokoningii</i>	89	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. pubescens</i>	89	GGGGGA	AC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. reesei</i>	90	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. saturnisporum</i>	90	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. spirale</i>	90	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. strictipile</i>	89	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. strigosum</i>	87	GGGGGA	AC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. stromaticum</i>	89	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. tomentosum</i>	89	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. vires</i>	89	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>T. viride</i>	89	GGGGGA	AC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>Hypocrea jecorina</i>	90	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>Cladobot.mycophilum</i>	90	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>Clonostachys rosea</i>	86	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
<i>Verticillium lecani</i>	88	GGGGGA	TC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG

		190	200	210	220	230	240	250
<i>T. aggressivum</i>	171	ATT	TATAC	GGG	GGT	TAT	CTA	TCTGAG
<i>T. asperillum</i>	169	CT	TAGTCCC	GGG	AGC	TA	TACAGCT	TGAGCT
<i>T. atroviride</i>	169	CT	TAGTCCC	GGG	AGC	TA	TACAGCT	TGAGCT
<i>T. citrinoviride</i>	173	TTTCTCCCGT	CCGGCCTA	GGG	GGT	TCTGT	TATTTT	TGCTGAGCCT
<i>T. erinaceum</i>	169	CT	TAGTCCC	GGG	AGC	TA	TACAGCT	TGAGCT
<i>T. fasciculatum</i>	170	TT	TATGCC	GGG	GGT	TTTT	TAA	CTG
<i>T. fertile</i>	172	TT	G	TATAC	GGG	GGT	TATA	TCTGAGCCT
<i>T. ghanense</i>	166	TTTCTCCCGT	CCGGCTTC	GGG	GGT	TCTGT	TAACTTT	TGCTGAGCCT
<i>T. hamatum</i>	169	CT	TAGTCCC	GGG	AGC	TA	TACAGCT	TGAGCT
<i>T. harzianum</i>	170	ATT	TATAC	GGG	GGT	TT	T	TAA
<i>T. koningii</i>	168	CT	TAGTCCC	GGG	AGC	TA	TACAGCT	TGAGCT
<i>T. longibrachiatum</i>	171	TTTCTCCCG	CCGGCTTC	GGG	GGT	TCTGT	TATTTT	TGCTGAGCCT
<i>T. minutisporum</i>	170	TT	TATAC	GGG	GGT	TT	ATA	TCTGAG
<i>T. oblongisporum</i>	176	TT	TATG	GGG	GGT	TT	ATA	TCTGAG
<i>T. polysporum</i>	174	TT	CTATGT	GGG	GGT	TT	ATA	TCTGAG
<i>T. pseudokoningii</i>	171	TTTCTCCCGT	CCGGCCTA	GGG	GGT	TCTGT	TATTTT	TGCTGAGCCT
<i>T. pubescens</i>	169	CT	TAGTCCC	GGG	AGC	TA	TACAGCT	TGAGCT
<i>T. reesei</i>	174	TTTCTCCCGT	CCGGCTTC	GGG	GGT	TCTGT	TAACTTT	TGCTGAGCCT
<i>T. saturnisporum</i>	172	TTTCTCCCGT	CCGGCTTC	GGG	GGT	TCTGT	TATTTT	TGCTGAGCCT
<i>T. spirale</i>	170	TT	TATAC	GGG	GGT	TT	ATA	TCTGAG
<i>T. strictipile</i>	170	TT	TATGCC	GGG	GGT	TTTT	TTA	CTG
<i>T. strigosum</i>	167	TA	CT	TAGTCCC	GGG	AGC	TA	TACAGCT
<i>T. stromaticum</i>	171	TAT	TATAC	GGG	GGT	TT	ATA	TCTGAG
<i>T. tomentosum</i>	171	TTT	TATAC	GGG	GGT	TT	ATA	TCTGAG
<i>T. vires</i>	170	ATT	TATAC	GGG	GGT	TT	ATA	TCTGAG
<i>T. viride</i>	169	CT	TAGTCCC	GGG	AGC	TA	TACAGCT	TGAGCT
<i>Hypocrea jecorina</i>	174	TTTCTCCCGT	CCGGCTTC	GGG	GGT	TCTGT	TACCTTT	TGCTGAGCCT
<i>Cladobot.mycophilum</i>	163	CT	GT	GGG	GGT	TT	ATA	TCTGAG
<i>Clonostachys rosea</i>	155	TT	CTTGT	GGG	GGT	TT	ATA	TCTGAG
<i>Verticillium lecani</i>	158	TT	ATTAT	GGG	GGT	TT	ATA	TCTGAG

(continua)



<i>T. aggressivum</i>	624	AATAA
<i>T. asperellum</i>	610	NNNNN
<i>T. atroviride</i>	614	NNNNN
<i>T. citrinoviride</i>	637	AATAA
<i>T. erinaceum</i>	612	NNNNN
<i>T. fasciculatum</i>	619	NNNNN
<i>T. fertile</i>	617	NNNNN
<i>T. ghanense</i>	634	AATAN
<i>T. hamatum</i>	607	NNNNN
<i>T. harzianum</i>	623	AATTN
<i>T. koningii</i>	607	AATAA
<i>T. longibrachiatum</i>	633	AATAA
<i>T. minutisporum</i>	618	NNNNN
<i>T. oblongisporum</i>	624	NNNNN
<i>T. polysporum</i>	620	AATAA
<i>T. pseudokoningii</i>	634	AATAA
<i>T. pubescens</i>	607	NNNNN
<i>T. reesei</i>	638	AATAA
<i>T. saturnisporum</i>	631	AATAA
<i>T. spirale</i>	628	NNNNN
<i>T. strictipile</i>	619	NNNNN
<i>T. strigosum</i>	613	AGNTT
<i>T. stromaticum</i>	622	NNNNN
<i>T. tomentosum</i>	624	NNNNN
<i>T. vires</i>	665	AATAA
<i>T. viride</i>	608	NNNNN
<i>Hypocrea jecorina</i>	638	AATAA
<i>Cladobot. mycophilum</i>	607	NNNNN
<i>Clonostachys rosea</i>	577	NNNNN
<i>Verticillium lecani</i>	572	NNNNN