

## **Identificação molecular e análise filogenética de linhagens de *Trichoderma* spp. isolados de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*)**

Fabyano Alvares Cardoso LOPES <sup>1</sup>, Andrei Stecca STEINDORFF <sup>1</sup>, Alexandre Siqueira Guedes COELHO <sup>2</sup>, Cirano José ULHOA <sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratório de Enzimologia, ICB, UFG, Goiânia-GO*

<sup>2</sup> *Setor de Melhoramento de Plantas, Escola de Agronomia, UFG, Goiânia-GO*

fabyano\_alvares@yahoo.com.br

Palavras-chave: *Trichoderma*; Identificação molecular; Análise filogenética.

### **INTRODUÇÃO**

Devido aos efeitos danosos causado ao meio ambiente e a procura por métodos mais eficientes que seja acessível, lucrativa e que aumente a produção de alimentos, o uso de agrotóxicos vem sendo mudado gradualmente pelo o uso de agentes de controle biológicos (ACB), principalmente quando se trata de doenças causadas por fungos fitopatógenos de solo (PARRA *et al.*, 2002).

Atualmente, o gênero *Trichoderma* é um dos principais ACBs para fungos fitopatogênicos, detendo quase 50% do mercado. Natural do solo, especialmente os orgânicos, o gênero *Trichoderma* pode viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos, havendo poucos relatos sobre ocorrência de doenças de plantas causadas por esse gênero (KUBICEK *et al.*, 2001).

Com o intuito de elucidar as relações filogenéticas do gênero *Trichoderma* e descobrir novas espécies, análises moleculares e metabólicas vêm sendo bastante utilizadas (SAMUELS *et al.*; 2006). Com a utilização de caracteres metabólicos é possível observar diferenças nos genótipos, através na variação significativa na expressão do fenótipo, a combinação desses dois tipos de análises podem ajudar o entendimento da diversidade das espécies de *Trichoderma* e de seus genes, além de identificar possíveis candidatos para uma utilização em campo, o que é relevante quando se trata de um organismo de grande importância econômica.

O objetivo geral desse trabalho é realizar a identificação molecular e a análise filogenética de linhagens de *Trichoderma* spp. isolados de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **COLEÇÕES UTILIZADAS**

Foram utilizados vinte e quatro isolados de *Trichoderma* spp. provenientes de diferentes cidades do Brasil (EMBRAPA-CNPAF).

### **EXTRAÇÃO DE DNA, PCR E SEQUENCIAMENTO**

O DNA fúngico foi extraído a partir de micélio congelado e liofilizado através da metodologia proposta por RAEDER & BRODA (1985) acrescida de tampão CTAB. A região do rDNA nuclear, contendo ITS1, 5.8S e ITS 2 , foi amplificado por PCR usando a combinação dos primers ITS1 e ITS4. A porção do fator de alongamento da transcrição 1 $\alpha$  (*tef1 $\alpha$* ) foi amplificado usando os primers *tef1fw* e *tef1rev*. Após amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2 % e purificados utilizando o protocolo baseado em precipitação por PEG (Polietileno glicol) - 20% PEG, 2,5 M NaCl, 80% etanol e etanol puro. Os produtos da purificação foram usados na reação de sequenciamento utilizando DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing kit (GE Healthcare) e sequenciado utilizando ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### **ANÁLISE DOS DADOS DO SEQUENCIAMENTO**

As sequências de DNA foram alinhadas utilizando o programa Clustal X v2.0.12. As regiões terminais com alinhamento duvidoso foram retirados manualmente usando BioEdit v7.0.5.3 e as porções foram alinhadas juntas. A análise das sequências amplificadas de ITS e *tef1 $\alpha$*  serão realizadas usando o TRICHOKEY 2.0 e TRICHOBLAST.

A relação filogenética foi realizada com a união da região do rDNA nuclear e do gene *tef1α* utilizando vários métodos e modelos no programa PAUP4b10. Para o método por Neighbour-Joining (NJ), foram utilizados os modelos de Kimura-2-parameter e o melhor modelo proposto pelo Modeltest v3.7, com os valores de bootstrap calculados com base em 10000 replicatas. Para o método por parcimônia, foram utilizados modelos que propõe a proporção transição/transversão de 1:2 e a proporção transição/transversão/gap de 1:2:5 através de uma busca heurística, com os valores de bootstrap calculados com base em 1000 replicatas. Para o método por máxima verossimilhança, foi utilizado o melhor modelo proposto pelo Modeltest v3.7, com os valores de bootstrap calculados com base em 1000 replicatas. Os valores de bootstrap menores que 60 foram desconsiderados. O melhor modelo proposto pelo Modeltest v3.7 baseado no Critério de informação de Akaike (AIC) foi o modelo unequal-frequency Kimura 3-parameter (K81uf) + Proporção Invariante (I) + Gamma (G).

A reconstrução filogenética utilizando a aproximação bayesiana foi realizada pelo Mr. Bayes v3.1.2. O melhor modelo selecionado pelo Mr.Modeltest v2.3 baseado em AIC foi o modelo Generalized Time Reversible (GTR) + I + G. A amostragem pela Markov chain Monte Carlo (mcmc) foi realizada com  $1 \times 10^6$  gerações. As probabilidades *a posteriori* Bayesianas foram obtidas a partir de 50% “majority rule consensus” das 21.752 árvores (uma árvore amostrada a cada 10 gerações) após a remoção das primeiras 2.000 árvores através do processo de “burnin”. As probabilidades *a posteriori* menores que 0.70 foram desconsideradas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Dentro dos vinte e quatro isolados, foram identificadas sete espécies de Trichoderma: um isolado de *T. ghanense* (Seção Longibrachiatum / Clado Longibrachiatum), nove isolados de *T. asperellum* (Seção Trichoderma / Clado Hamatum), sendo que foram encontrados seis clones para ambos os genes, um isolado de *T. koningiopsis* (Seção Trichoderma / Clado Viride), um isolado de *T. erinaceum* (Seção Trichoderma / Clado Viride), um isolado de *T. gamsii* (Seção

Trichoderma / Clado Viride), sete isolados de *T. harzianum* (Seção Pachybasium / Clado Harzianum), quatro isolados de *T. tomentosum* (Seção Pachybasium / Clado Harzianum). A identificação foi realizada através da comparação das sequências de ITS e *tef1* com o banco de dados.

Apesar de uma amostragem relativamente pequena de vinte e quatro isolados, foram obtidas sete espécies, em sua maioria *T. asperellum* (37.5%) e *T. harzianum* (29.17%). Hoyos-Carvajal *et.al.* (2009) relata a existência de uma grande variedade de espécies de *Trichoderma* na região neotropical, esse dado corrobora com o encontrado em raízes de pé de feijão cultivados no Cerrado.

## ANÁLISE FILOGENÉTICA

As análises filogenéticas baseadas na sequência gerada da união da região do rDNA nuclear e do gene *tef1 $\alpha$*  conseguiram definir as seções encontradas da família Hypocreales independente do método e modelo proposto, porém se diferiram na definição dos grupos para cada espécie. As árvores geradas pelo método de NJ e por parcimônia indicaram a existência dos cladogramas Longibrachiatum (*T. logibrachiatum*), Harzianum (*T. tomentosum* e *T. harzianum*), Viride (*T. koningiopsis*, *T. erinaceum* e *T. gamsii*), Hamatum (*T. asperellum*) suportados por valores de bootstrap acima de 84, separando cada espécie. As árvores geradas pelo método de máxima verossimilhança e por análise bayesiana possuem a mesma topologia, porém se diferem em relação à consistência dos cladogramas. Ambos os métodos probabilísticos sugerem a presença do isolado *T. asperellum*\_48302 no clado Hamatum, porém esse dado não foi corroborado pela análise de bootstrap e pela probabilidade *a posteriori*. O grupo formado por *T. harzianum* foi sugerido por ambos os métodos, porém esse grupo foi consistente somente na análise bayesiana sustentado por uma probabilidade *a posteriori* de 0.89.

A unidade das espécies de *T. harzianum* e *T. asperellum* ainda é um assunto bastante discutido, nenhum método probabilístico apresentou uma “monofilecidade” dessas espécies, diferente do que foi mostrado pelos métodos de NJ e parcimônia. Sabe-se que as espécies *T. harzianum* e *T. asperellum* apresentam um perfil enzimático bastante diversificado, além de apresentar perfis metabólicos distintos no

microarranjo de fenótipos, esses dados reforçam a idéia de que ambas as espécies merecem ser revistas como foi proposto por Chaverri et al. (2003) em relação ao *T. harzianum*.

## CONCLUSÕES

Por se tratar de um ACB amplamente utilizado em diversos tipos de lavouras, a identificação das espécies de *Trichoderma* em estudo foi de extrema importância, pois cada espécie possui características próprias que podem ou não ser eficientes em um controle com um determinado fitopatógeno. Portanto, o estabelecimento da relação filogenética entre as espécies de *Trichoderma* feito nesse trabalho propicia um melhor entendimento de cada perfil de espécie de *Trichoderma*, contribuindo em novas relações feitas entre espécies e abrindo novas aplicações no ramo agrícola e industrial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHAVERRI, P.; CASTLEBURY, L. A.; SAMUELS, G. J.; GEISER, D. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum* / *Hypocrea lixii* complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.27, p. 302–313. 2003.
- HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. **Fungal Genetics and Biology**. v.46, p. 615-631. 2009.
- KUBICEK, C.P.; MACH, R. L.; PETERBAUER, C. K.; LORITO M. *Trichoderma*: From genes to biocontrol. **Journal of Plant Pathology**. v. 83 (2). p. 11-23. 2001.
- PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. Controle Biológico: Terminologia. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. **Controle Biológico no Brasil – Parasitóides e Predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p.1-16.
- RAEDER, U., BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters Applied Microbiology**. v.1, p. 17-20. 1985.
- SAMUELS, G. J.; DODD, S. L.; LU, B.; PETRINI, O.; SCHROERS, H.; DRUZHININA, I. S. The *Trichoderma koningii* aggregate species. **Studies in Mycology**. v. 56. p. 67–133. 2006.