

Trichoderma asperellum associada
à rizosfera de laranjeiras 'Pera'
(*Citrus sinensis* L. Osbeck) no estado da Bahia



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
122**

Trichoderma asperellum associada
à rizosfera de laranjeiras 'Pera'
(*Citrus sinensis* L. Osbeck) no estado da Bahia

*Henrique Castro Gama
Lorenço Stier
Maria Zélia Alencar de Oliveira
Alessandra Selbach Schnadelbach
Cristiane de Jesus Barbosa*

**Embrapa Mandioca e Fruticultura
Cruz das Almas, BA
2021**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Mandioca e Fruticultura
Rua Embrapa, s/nº, Caixa Postal 07
44380-000, Cruz das Almas, Bahia
Fone: 75 3312-8048
Fax: 75 3312-8097
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Mandioca e Fruticultura

Presidente
Francisco Ferraz Laranjeira

Secretário-Executivo
Maria da Conceição Pereira da Silva

Membros
Aldo Vilar Trindade, Ana Lúcia Borges, Eliseth de Souza Viana, Fabiana Fumi Cerqueira Sasaki, Harllen Sandro Alves Silva, Leandro de Souza Rocha, Marcela Silva Nascimento

Supervisão editorial
Francisco Ferraz Laranjeira

Revisão de texto
Alessandra Angelo

Normalização bibliográfica
Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Anapaula Rosário Lopes

Fotos da capa
Cristiane de Jesus Barbosa

1ª edição
Publicação digital: PDF (2021)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Mandioca e Fruticultura

Trichoderma asperellum associada à rizosfera de laranjeiras 'Pera' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) no estado da Bahia./ Henrique Castro Gama... [et. al.]. Cruz das Almas, BA : Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2021.

23 p.: il. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Mandioca e Fruticultura, ISSN 1809-5003, 122)

1. Fruta cítrica 2. Praga de Planta 3. Citros 4. Controle biológico I. Gama, Henrique Castro II. Stier, Lorenço III. Oliveira, Maria Zélia Alencar de IV. Schnadelbach; Alessandra Selbach V. Barbosa, Cristiane de Jesus VI. Título. VII. Série.

CDD 634.304

Ficha catalográfica elaborada por Lucidalva R. G. Pinheiro- Bibliotecária © Embrapa, 2021
CRB51161 – Embrapa Mandioca e Fruticultura

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução.....	9
Coleta de amostras de solo.....	10
Isolamento dos fungos	10
Identificação morfológica dos fungos isolados.....	11
Extração do DNA total, amplificação e sequenciamento da região ITS rDNA.....	11
Identificação molecular.....	12
Análises filogenéticas.....	12
Resultados.....	13
Discussão	16
Conclusões.....	18
Agradecimentos.....	18
Referências	19

Trichoderma asperellum associada à rizosfera de laranjeiras ‘Pera’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) no estado da Bahia

Henrique Castro Gama¹

Lorenço Stier¹

Maria Zélia Alencar de Oliveira²

Alessandra Selbach Schnadelbach³

Cristiane de Jesus Barbosa⁴

Resumo – O estado da Bahia é o quarto maior produtor nacional de citros, cuja cultura é essencialmente familiar. Nos últimos anos, pragas importantes têm afetado a citricultura baiana, a exemplo da mancha preta e da clorose variegada dos citros (CVC), sendo o manejo realizado com o uso de agrotóxicos. Entretanto, o controle biológico configura-se como uma alternativa sustentável para o sistema citrícola da região. Nesse contexto, espécies do gênero *Trichoderma* têm sido amplamente empregadas tendo em vista o controle de fitopatógenos em culturas de interesse econômico. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi realizar o levantamento da comunidade de fungos e a prospecção de espécies de *Trichoderma* associadas à rizosfera de laranjeiras cv. ‘Pera’ cultivadas no estado da Bahia. Para tanto, foram realizadas coletas de amostras da rizosfera em quatro regiões de produção do Estado, quais sejam: Chapada Diamantina, Litoral Norte, Recôncavo Sul e Semiárido baiano. O método de isolamento envolveu a homogeneização das amostras de solo, diluição 1:10, centrifugação e distribuição do sobrenadante em placas de Petri contendo os meios Dodine e Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Após cinco a sete dias, as placas foram avaliadas quanto à presença e aos aspectos das colônias. A identificação em nível de gênero dos fungos recuperados foi realizada a partir de abordagens morfológicas. Ao todo, 415 isolados fúngicos, distribuídos em sete gêneros, foram recuperados, destacando-se os

¹ Biólogo, Laboratório de Biologia Molecular, Centro Tecnológico Agropecuário da Bahia.

² Mestre em Fitopatologia, Laboratório de Sanidade Vegetal, Centro Tecnológico Agropecuário da Bahia.

³ Professora Doutora do Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Laboratório de Genética e Evolução de Plantas.

⁴ Engenheira-agrônoma, doutora em Fitopatologia, pesquisadora A da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia.

gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, mais abundantes nos pomares avaliados. A identificação molecular dos isolados de *Trichoderma* recuperados deu-se pela extração do DNA total da massa micelial advinda de culturas monospóricas, amplificação e sequenciamento da região do espaçador interno transcrito do DNA ribossomal (ITS rDNA). As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas na plataforma *Genbank*, por meio da ferramenta BLASTn, e empregadas em análises filogenéticas sob o critério de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. *T. asperellum* foi a espécie recuperada da rizosfera de laranjeiras cv. 'Pera' cultivadas nas quatro regiões baianas avaliadas no presente estudo.

Palavras-chave: Controle biológico, Citros, ITS rDNA.

Trichoderma asperellum associated with rhizosphere of sweet orange 'Pera' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) cultivated on state of Bahia

Abstract – The state of Bahia is the fourth largest national citrus producer, whose culture is based on family farming. In recent years, important pests have affected the citrus industry in Bahia, such as black spot, and citrus variegated chlorosis, which are controlled with agrochemicals. However, biological control may be a more sustainable alternative. In this context, *Trichoderma* species stand out among the fungi associated with biocontrol, acting against diseases and pests. Hence, this study aimed to survey the fungal community and prospect isolates of *Trichoderma* associated with the rhizosphere of sweet oranges cv. 'Pera' cultivated in Bahia. For that, samples of the rhizosphere were collected in commercial orchards of the Chapada Diamantina, North Coast Region, the south of Recôncavo Baiano, and Semi-Arid Region. Aims to recovery fungal isolates, the soil samples were homogenized, subsequently diluted (1:10), and centrifuged. The supernatant was distributed in Petri dishes containing the Dodine and potato-dextrose-agar (PDA) medium. After 5 to 7 days, the plates were evaluated for the presence and growth of colonies. The genus identification of the isolates was carried out by morphological methods. In total, 415 isolates were recovery, distributed in seven genera, stand out *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Penicillium*, the most genera represented in the orchards examined. For molecular identification of *Trichoderma* isolates, the mycelia from monosporic cultures were submitted to total DNA extraction, followed by amplification and sequencing of the internal transcriptional spacers of the ribosomal region (rDNA ITS). The sequences obtained in this study were compared to sequences deposited at the Genbank platform via BLASTn and used in phylogenetic analyses based on the Maximum Likelihood and Bayesian Inference criteria. *T. asperellum* was the species recovered from the rhizosphere of sweet oranges cv. 'Pera' cultivated in Bahia.

Keywords: Biological control, Citrus, ITS rDNA.

Introdução

A citricultura é uma das atividades mais importantes da agricultura brasileira, que lidera o mercado de exportação mundial de citros. No *ranking* nacional, o estado de São Paulo possui o maior polo de produção citrícola, seguido pelos estados de Minas Gerais, Paraná e Bahia (IBGE, 2017). Entretanto, a cultura dos citros, em especial a citricultura baiana, enfrenta sérios problemas fitossanitários em decorrência da disseminação de pragas que afetam os pomares comerciais. Nos últimos anos, doenças como a clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria sistêmica *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* (Wells et al.), e mancha preta dos citros, causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely, têm limitado a produção e a comercialização de frutos na Bahia (Barbosa et al., 2014).

O manejo das principais pragas que afetam frutíferas cítricas envolve, mormente, a adoção do controle químico (Fundecitrus, 2018; Santos-Filho et al., 2010; Yamamoto et al., 2002). Como consequência, a indústria tem intensificado o uso de agrotóxicos, culminando no aumento do custo de produção (Neves et al., 2010). Aliado aos grandes recursos despendidos durante a cadeia produtiva, o emprego indiscriminado dos agrotóxicos levanta a discussão quanto ao seu impacto negativo à saúde humana e ambiental (Nicolopoulou-Stamati et al., 2016). Nesse sentido, o uso de organismos cuja ação permita o controle de pragas configura-se como uma estratégia importante, favorecendo o manejo sustentável dos sistemas agrícolas e, por conseguinte, a redução da degradação ambiental e a preservação dos recursos naturais (Morandi; Bettiol, 2009).

Fungos dos gêneros *Metarhizium* Sorokin, *Beauveria* Vuill., *Trichoderma* Pers., *Verticillium* Nees, *Hansfordia* S. Hughes e *Acremonium* Link são descritos como potenciais agentes de controle de fitopatógenos, tais quais *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) Höhn, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Pythium myriotylum* Drechsler, *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Verticillium dahliae* Kleb. e *Bemisia tuberculata* (Bondar, 1923) (Isaias et al., 2014; Machado et al., 2012; Ownley et al., 2008; Rheinheimer et al., 2009; Santos et al., 2012). Dentre esses, destaca-se o gênero *Trichoderma*, cujas espécies podem atuar no biocontrole por diferentes mecanismos de ação, quais sejam, competição, antibiose e parasitismo, além de promoverem o crescimento e induzirem resistência em plantas (Bettiol; Morandi, 2009; fortes et al., 2007; Mohamed; Haggag, 2006).

Todavia, poucos estudos foram realizados quanto à identificação de organismos pertencentes à biota do solo das regiões produtoras baianas

com potencial para utilização no manejo fitossanitário da cultura dos citros. Portanto, o objetivo desse trabalho foi levantar a comunidade de fungos e prospectar espécies de *Trichoderma* associadas à rizosfera de laranjeiras cv. 'Pera' cultivadas no estado da Bahia.

Material e Métodos

Coleta de amostras de solo

As amostras da rizosfera de laranjeiras cv. 'Pera' foram coletadas em pomares de citros das regiões da Chapada Diamantina, Litoral Norte, Recôncavo Sul e Semiárido do estado da Bahia. Em cada região foram selecionados dois pomares e, de cada pomar, foram coletadas 10 amostras da rizosfera com o auxílio de uma pá e sacos plásticos esterelizados, sendo a amostragem realizada por caminhada em W. A amostra foi constituída de solo (10 cm a 15 cm de profundidade) coletado na projeção da copa de cada uma das plantas de laranjeira cv. 'Pera' selecionadas.

Isolamento dos fungos

O método utilizado para o isolamento dos fungos das amostras de solo foi adaptado de Azevedo (2013). As 10 amostras coletadas em cada pomar foram homogeneizadas por agitação manual a fim de formar uma única amostra composta. A partir desta, 10 g de solo foram dissolvidos em 90 mL de água destilada estéril contendo 0,01% de Tween 80®. A suspensão obtida foi homogeneizada em agitador do tipo Vortex por um período de 30 segundos. Em seguida, foi retirado 1 mL da suspensão para ser diluída em 9 mL da solução de Tween 80® a 0,001% em tubos de ensaio.

Da diluição de cada amostra composta, foram inoculadas 50 placas de Petri com alíquotas de 0,1 mL cada, contendo meio Dodine adaptado de Alves e Faria (2010) (40 g de aveia, 40 g de ágar, 1 g de Dodine (Venturol), 400 mg de clorafenicol e 2 L de água). Do mesmo modo, foram também inoculadas 50 placas com meio batata-dextrose-ágar (BDA). As placas foram armazenadas em temperatura ambiente (26 ± 2 °C) e umidade relativa do ar de 70%, sob luz fluorescente contínua. Após um período de 5 a 7 dias, as placas foram avaliadas quanto à presença e ao crescimento das colônias,

sendo os propágulos de cada um dos diferentes fungos repicados individualmente e inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, para a obtenção de colônias puras.

Identificação morfológica dos fungos isolados

A identificação em nível de gênero dos fungos obtidos foi realizada por meio de observações das características macro e micromorfológicas, sob microscópio estereoscópio e óptico, com o auxílio de chaves de identificação para fungos formuladas por (Barnett; Hunter, 1998; Booth, 1971; 1977; Ellis, 1971; 1976; Luz, 2012a; 2012b; Luz; Inácio, 2009; Toussoun; Nelson, 1976).

Extração do DNA total, amplificação e sequenciamento da região ITS rDNA

Foram realizadas culturas monospóricas em meio BDA dos isolados de *Trichoderma* spp. coletados de pomares das quatro regiões avaliadas. O micélio desenvolvido sobre o meio de cultura de cada isolado foi coletado e submetido à extração do DNA total com base no método CTAB (Zolan; Pukkila, 1986). A concentração e a integridade das amostras extraídas foram verificadas a partir do espectrofotômetro L-Quant® (Loccus Biotecnologia), examinando a razão entre ácidos nucleicos ($\lambda = 260$ nm) e proteínas ($\lambda = 280$ nm), e por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.

A região do Espaçador Interno Transcrito do DNA ribossomal (ITS rDNA) foi amplificada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), usando os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). A reação foi realizada em volume final de 60 μ L, contendo tampão de amplificação Tris/KCl-1X, dNTP a 1,5mM, MgCl₂ a 1,5mM, 1U da enzima *Taq* DNA polimerase, *primers* 0,2 μ M, e 30 ng de DNA total. Os ciclos de reação envolveram uma desnaturação inicial de 94 °C por três minutos, seguida por 35 ciclos compostos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 56 °C por 45 segundos, e extensão a 72 °C por 60 segundos, finalizando com uma extensão a 72 °C por cinco minutos. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3) durante duas horas a 110V, corados com brometo de etídio.

Os fragmentos ITS rDNA obtidos foram sequenciados pelo método de Sanger na plataforma de sequenciamento do Instituto Gonçalo Muniz – Fundação Osvaldo Cruz, BA. Os eletroferogramas gerados foram visualizados e editados utilizando o programa Chromas v.2.6.4.

Identificação molecular

A região ITS se figura por possuir rápida taxa evolutiva, apresentando, por conseguinte, alta variação intra e interespecífica (Hershkovitz; Lewis, 1996). Nesse contexto, o seu emprego em abordagens moleculares visando à identificação e à reconstrução de árvores filogenéticas para o gênero *Trichoderma* tem se mostrado relevante sendo, inclusive, a principal região adotada para a identificação molecular de fungos via DNA barcode (Samuels, 2006; Feitosa et al., 2019; Nilsson et al., 2019).

Dessa forma, as sequências consenso da região ITS rDNA foram obtidas a partir das sequências ITS1 e ITS4, usando o programa SeqAssem 07/2008 (https://www.sequentix.de/software_seqassem.php). As sequências dos isolados foram comparadas quanto à sua similaridade com sequências depositadas no banco de dados *nucleotide collection*, vinculado à plataforma *GenBank*, por meio da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn), considerando como nível de significância o *e-value* < 1×10^{-5} . As sequências geradas no presente estudo foram depositadas na referida plataforma.

Análises filogenéticas

Para as análises filogenéticas, foram consideradas as sequências ITS rDNA dos isolados coletados nas regiões produtoras, bem como outras 15 sequências correspondentes a espécies do gênero *Trichoderma*, obtidas a partir da plataforma GenBank. A espécie *Nectria cinnabarina* (Tode) Fr. foi utilizada como grupo externo. As sequências foram alinhadas com base no alinhamento múltiplo ClustalW, implementado no programa BioEdit 7.2., e a matriz resultante foi submetida a um processo de curadoria manual (Thompson et al., 1994; Hall, 1999).

A análise filogenética baseada no critério de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood* – ML) foi realizada usando o programa RAxML (Stamatakis, 2014). O modelo de substituição GTR+GAMMA foi adotado, empregando mil replicações da análise de Suporte *Bootstrap* (BS). Para a

Inferência Bayesiana (IB), o modelo de substituição GTR+I+G foi usado, sendo definido com base no Critério de Informação de Akaike (AIC) a partir do programa jModelTest2 (Darriba et al., 2012). A IB foi realizada com a utilização do programa MrBayes 3.2.2 (Ronquist; Huelsenbeck, 2003). A análise foi conduzida em duas corridas com quatro Cadeias de Markov – Monte Carlo cada, com 5 milhões de gerações, amostrando uma árvore a cada mil gerações e descartando 25% das árvores iniciais como *burn-in*. A probabilidade Posterior (PP) para cada clado foi estimada, sendo obtida a árvore de consenso de maioria. As análises empregadas nesse estudo foram executadas na plataforma CIPRES (Miller et al., 2010) e as árvores filogenéticas geradas foram visualizadas a partir do programa FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Resultados

Ao todo, 415 isolados fúngicos, distribuídos em sete gêneros, foram prospectados de amostras de rizosfera de laranjeiras cv. 'Pera' cultivadas em quatro regiões produtoras do estado da Bahia (Figura 1).

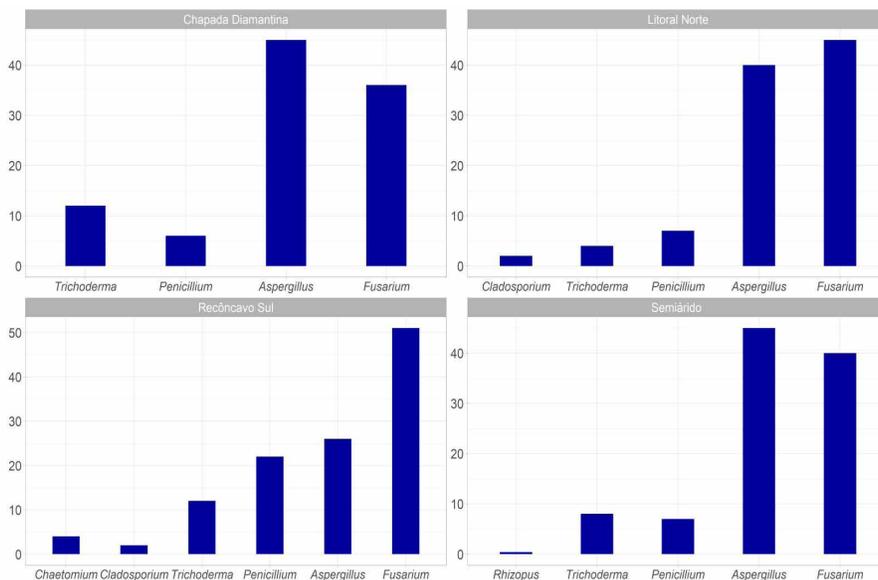


Figura 1. Frequência dos fungos recuperados da rizosfera de laranjeiras cv. 'Pera' das quatro regiões produtoras de citros do estado da Bahia.

Os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* foram os mais frequentes nos pomares amostrados. A região do Recôncavo Sul foi a mais diversa (seis gêneros identificados), com destaque em número de isolados prospectados para os gêneros *Aspergillus* (26), *Fusarium* (51) e *Penicillium* (22) e *Trichoderma* (12). 36 isolados, recuperados nas quatro regiões avaliadas, foram caracterizados como pertencentes ao gênero *Trichoderma*.

Tomando por base tal identificação a partir das amostras de solo obtidas, foram confeccionadas culturas monospóricas a partir de nove isolados coletados nas regiões: Recôncavo Sul (3), Litoral Norte (3), Chapada Diamantina (1) e Semiárido (2) (Figura 2).

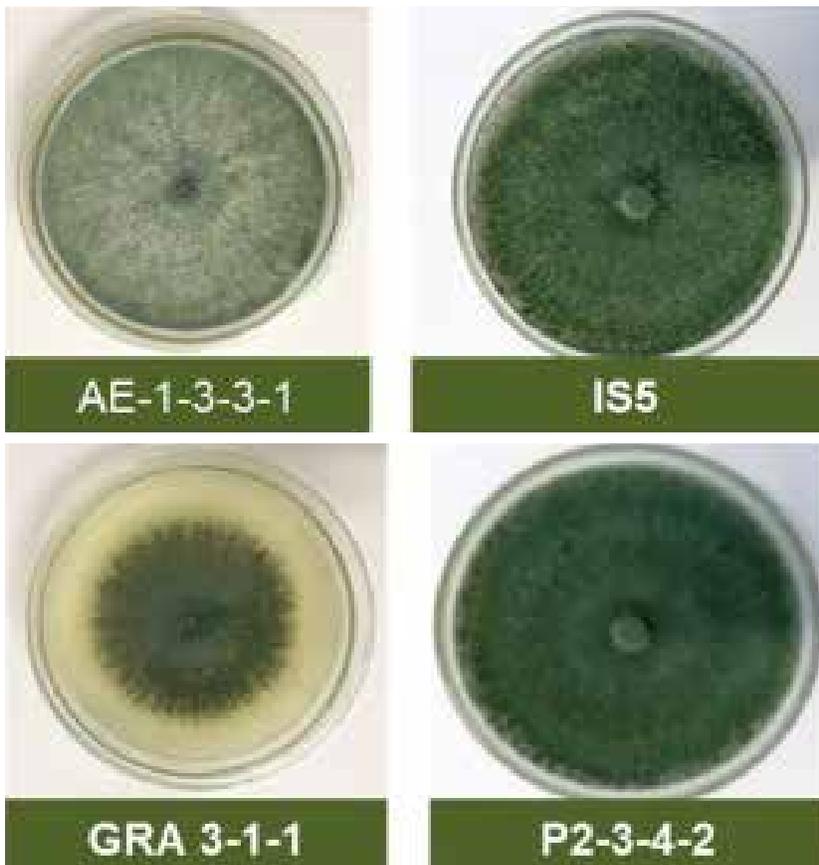


Figura 2. Culturas monospóricas obtidas a partir dos isolados de *Trichoderma* spp. pertencentes à rizosfera de laranjeiras cv. 'Pera', cultivadas nas regiões do Recôncavo Sul (Isolado AE-1-3-3-1); Litoral Norte (Isolado IS5); Chapada Diamantina (isolado GRA 3-1-1) e Semiárido (Isolado P2- 3-4-2) do estado da Bahia.

Os nove isolados prospectados foram submetidos à extração do DNA total, amplificação e sequenciamento da região ITS. As sequências ITS obtidas no presente estudo apresentaram $\geq 98\%$ de identidade com sequências da espécie *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. e Nirenberg, depositadas na plataforma *GenBank* (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação molecular via análise de similaridade (BLASTn) dos isolados de *Trichoderma* presentes na rizosfera de laranjeiras em pomares do estado da Bahia.

Espécie	Identidade	Código do Isolado	Região de coleta	Acessos
	(%)			ITS
<i>Trichoderma asperellum</i>	100	CNPMF-T21	Litoral Norte	MN493630
<i>Trichoderma asperellum</i>	100	CNPMF-T22	Litoral Norte	MN493631
<i>Trichoderma asperellum</i>	100	CNPMF-T24	Litoral Norte	MN493632
<i>Trichoderma asperellum</i>	100	CNPMF-T25	Recôncavo Sul	MN493633
<i>Trichoderma asperellum</i>	100	CNPMF-T26	Recôncavo Sul	MN493634
<i>Trichoderma asperellum</i>	100	CNPMF-T27	Recôncavo Sul	MN493635
<i>Trichoderma asperellum</i>	100	CNPMF-T28	Chapada Diamantina	MN493636
<i>Trichoderma asperellum</i>	100	CNPMF-T29	Semiárido	MN493637
<i>Trichoderma asperellum</i>	98	CNPMF-T30	Semiárido	MN493638

Visando consolidar a associação da espécie *T. asperellum* à biota do solo dos pomares aqui investigados, foram empregadas análises filogenéticas com base na região ITS. Ambos os métodos, quais sejam, ML e IB, geraram árvores com topologias similares. Dessa forma, a árvore filogenética inferida a partir do método de ML foi sublinhada. Os isolados prospectados foram agrupados em um único clado com sequências da espécie *T. asperellum* (acessos MN069467 e MT007530) apresentando BS de 95% e 0.99 de PP.

afetam frutos cítricos, sendo uma das principais causas das perdas do seu potencial comercial (Fischer et al., 2007). Além disso, as espécies pertencentes ao gênero *Fusarium*, amplamente disseminadas na biota de solo de pomares e lavouras comerciais, estão envolvidas em doenças radiculares, inclusive em citros (Adesemoye et al., 2013).

Os fungos do gênero *Trichoderma* foram isolados em solos de todos os pomares estudados, mostrando o quão estão disseminados nos pomares de citros do estado da Bahia. Espécies desse gênero apresentam significativos índices de supressão do crescimento de pragas, além de contribuir para o aumento na taxa de crescimento de plantas, assim como para indução de resistência (Machado et al., 2012).

Tomando por base as estratégias morfológicas e moleculares aqui adotadas, *T. asperellum* foi a espécie prospectada das quatro regiões baianas avaliadas nesse estudo. Pertencente à família Hypocreaceae, *T. asperellum* possui mecanismos que favorecem seu papel relacionado ao biocontrole, como micoparasitismo, competição por nutrientes e fatores de crescimento, além da produção de metabólitos que atuam no antagonismo característico da espécie (Benítez et al., 2004; Harman et al., 2004). *T. asperellum* tem sido descrita na literatura como um eficiente agente de controle biológico (efeito antagonista) para a fusariose do tomateiro, grão-de-bico, pepino e da batata (Cotxarrera et al., 2002; Komy et al., 2015; Akrami et al., 2013; Ethur et al., 2012; Ommati; Zaker, 2012). Além disso, atua na supressão dos agentes etiológicos da morte descendente e podridão-parda do cacauero (Rosmana et al., 2015; Tchameni et al., 2017).

No que tange sua ação antagonista contra pragas que afetam frutíferas, *T. asperellum* foi reportado como agente de controle da antracnose em mangueiras, bem como em doenças fúngicas pós-colheita em bananeiras, abacaxizeiros e mamoeiros (Santos-Villalobos et al., 2013; Adebessin et al., 2009; Valenzuela et al., 2015; Wijesinghe et al., 2011). Em gramíneas de interesse econômico, tais como milho e arroz, a referida espécie também foi um bom agente de controle biológico contra a fusariose e patógenos transmitidos por sementes (LI et al., 2016; Watanabe et al., 2005).

Por outro lado, a utilização de *T. asperellum* tem sido avaliada para indução de crescimento de plantas cultivadas, como tomateiro, cacauero e milho, assim como para culturas de menor importância econômica, a exemplo

da ervilha, e medicinais, como a erva-cidreira (Herrera-Téllez et al., 2019; Tchameni et al., 2017; López-Coria et al., 2016; Vivek et al., 2016; Kowalska et al., 2014). Além disso, a espécie contribui para a indução de resistência ao *Cucumber mosaic virus* em *Arabidopsis thaliana*, à fusariose no tomateiro, bem como à podridão-parda do cacauero (Elsharkawy et al., 2013; Herrera-Téllez et al., 2019; Tchameni et al., 2017).

Ademais, espécies de *Trichoderma* foram reportadas contribuindo para o controle de *Phytophthora citrophthora* e *Phytophthora nicotianae*, agentes causais da gomose dos citros (Bicici et al., 1992; Melo et al., 2015). Desde então, representantes do gênero têm sido utilizados para o controle de doenças fúngicas, como mancha preta dos citros, causada por *Guignardia citricarpa* (Mathelemuse; Kena, 2017).

No presente estudo, valendo-se de abordagens morfológicas e moleculares, é apresentado o primeiro levantamento de fungos associados à rizosfera de laranjeiras 'Pera' cultivadas no estado da Bahia, evidenciando a presença de fungos fitopatogênicos, assim como a presença da espécie *T. asperellum*, fungo com promissor potencial para o controle de pragas que afetam a citricultura. A partir deste trabalho seminal, será possível avaliar os efeitos dos isolados de *T. asperellum* prospectados tendo em vista o seu uso no combate a pragas que afetam frutíferas cítricas cultivadas na Bahia.

Conclusões

- Os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* foram os fungos mais frequentes na rizosfera dos pomares de citros amostrados;
- *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. e Nirenberg foi a espécie isolada da rizosfera de laranjeiras cv. 'Pera' cultivadas no estado da Bahia.

Agradecimentos

Ao Técnico Químico da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Epaminondas do Patrocínio, pelo apoio nas análises moleculares. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e à Embrapa Mandioca e Fruticultura, pelo auxílio financeiro fornecido para o desenvolvimento do projeto.

Referências

- ADEBESIN, A. A.; ODEBODE, C. A.; AYODELE, A. M. Control of Postharvest rots of Banana Fruits by conidia and culture filtrates of *Trichoderma asperellum*. **Journal of Plant Protection Research**, v. 49, n. 3, p. 302-308, 2009.
- ADESEMOYE, A. O., ESKALEN, A., FABER, B., BENDER, G., O'CONNELL, N., KALLSEN, C., SHEA, T. Current Knowledge on Fusarium dry rot of citrus. *Citrograph*, v.2, n.7, p. 29-33, 2013.
- AKRAMI, M.; KHLAVI, H. K.; SHIKHLINSKI, H.; KHOSHVAGHTEI, H. Bio controlling two pathogens of chickpea *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* by different combinations of *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma virens* under field condition. **International Journal of Microbiology Research**, v. 1, n. 2, p. 51-55, 2013.
- ALVES, R. T.; FARIA, M. R. de. **Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010. 50 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 286).
- AZEVEDO, A. G. C. de. **Ocorrência, distribuição e caracterização de fungos entomopatogênicos em solos natural e cultivado**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2013.
- BARBOSA, C. de J.; RORIZ, A. K. P.; SILVA, S. X. de B.; BARBOSA, L. V. **Pragas quarentenárias A1 e A2 da citricultura baiana**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2014. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Comunicado Técnico, 156).
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. I. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4. ed. Minnesota: American Phytopathological Society (APS PRESS), 1998. 218 p.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, p. 249-260, 2004.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341 p.
- BICICI, M., DEDE, Y., ÇINAR, A. *Trichoderma* species against gummosis disease in Lemon Trees. **Biological Control of Plant Diseases**, p. 193-196, 1992.
- BOOTH, C. **The Genus *Fusarium***. Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 237 p.
- BOOTH, C. ***Fusarium*: laboratory guide to identification of the major species**. Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, 1977. 58 p.
- COTXARRERA, L.; TRILLAS-GAY, M. I.; STEINBERG, C.; ALABOUVETTE, C. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 34, p. 467-476, 2002.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.
- ELLIS, M. B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 608 p.
- ELLIS, M. B. **More dematiaceous hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1976. 505 p.

- ELSHARKAWY, M. M.; SHIMIZU, M.; TAKAHASHI, H.; OZAKI, K.; HYAKUMACHI, M. Induction of Systemic resistance against *Cucumber mosaic virus* in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT-1. **The Plant Pathology Journal**, v. 29, n. 2, p. 193-200, 2013.
- ETHUR, L. Z.; LUPATINI, M.; BLUME, E.; MUNIZ, M. F. B.; ANTONIOLLI, Z. I.; LORENTZ, L. H. *Trichoderma asperellum* na produção de mudas contra a fusariose do pepineiro. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 11, n. 4, p. 73-84, 2012.
- FEITOSA, Y. B.; CRUZ-MAGALHÃES, V.; ARGOLO-FILHO, R. C.; SOUZA, J. T.; LOGUERCIO, L. L. Characterization of genetic diversity on tropical *Trichoderma* germplasm by sequencing of rRNA internal transcribed spacers. **BMC research notes**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2019.
- FISCHER, I. H.; TOFFANO, L.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Caracterização dos danos pós-colheita em citros procedentes de "packinghouse". **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 304-310, 2007.
- FORTES, F. O.; SILVA, A. C. F.; ALMANÇA, M. A. K.; TEDESCO, S. B. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. **Revista Árvore**, v. 31, n. 2, p. 221-228, 2007.
- FUNDECITRUS. **Pinta Preta**, 2018. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/doencas/pintapreta/12>. Acesso em: 10 set. 2018.
- HALL, T. A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor Program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews MicroBiology**, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.
- HERRERA-TÉLLEZ, V. I.; CRUZ-OLMEDO, A. K.; PLASENCIA, J.; GAVILANES-RUIZ, M.; ARCE-CERVANTES, O.; HERNÁNDEZ-LEÓN, S.; SAUCEDO-GARCÍA, M. The protective effect of *Trichoderma asperellum* on Tomato Plants against *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea* Diseases involves inhibition of Reactive Oxygen Species Production. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, p. 1-13, 2019.
- HERSHKOVITZ, M. A.; LEWIS, L. A. Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. **Molecular biology and evolution**, v. 13, n. 9, p. 1276-1295, 1996.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE. 2017. Disponível em: <https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/resultados-censo-agro-2017.html>. Acesso em: 5 ago. 2018.
- ISAIAS, C. O.; MARTINS, I.; SILVA, J. B. T. da; SILVA, J. P. da; MELLO, S. C. M. de. Ação antagonista e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 40, n. 1, p. 34- 41, 2014.
- KOMY, M. H. E.; SALEH, A. A.; ERANTHODI, A.; MOLAN, Y. Y. Characterization of Novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective Biocontrol Agents against Tomato Fusarium Wilt. **Plant Pathology Journal**, v. 31, n. 1, p. 50-60, 2015.
- KOWALSKA, J.; REMLEIN-STAROSTA, D.; SEIDLER-LOZYKOWSKA, K.; BOCIANOWSKI, J. Can *Trichoderma asperellum* (T1) stimulate growth of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) in different systems of cultivation? **Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus**, v. 13, n. 1, p. 91-102, 2014.
- LI, Y.; SUN, R.; YU, J.; SARAVANAKUMAR, K.; CHEN, J. Antagonistic and Biocontrol Potential of *Trichoderma asperellum* ZJSX5003 against the Maize Stalk Rot Pathogen *Fusarium graminearum*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 318-327, 2016.

- LÓPEZ-CORIA, M.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, J. L.; SÁNCHEZ-NIETO, S. *Trichoderma asperellum* induces Maize Seedling growth by activating the plasma membrane H⁺ - ATPase. **Molecular Plant-Microbe interactions**, v. 29, n. 10, p. 797-806, 2016.
- LUZ, W. V. (Ed.). Micologia avançada: taxonomia de fungos anamórficos - I. Hifomicetos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. IIB, 2012a. 400 p.
- LUZ, W. V. (Ed.). Micologia avançada: taxonomia de fungos anamórficos - II. Coelomicetos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. IIB, 2012b. 400 p.
- LUZ, W. C.; INÁCIO, C. A. Micologia avançada: taxonomia de fungos ascomicetos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. IIA, 2009. 400 p.
- MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, R. F.; SILVA, A. C. F.; ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.
- MATHELEMUSE, S. A.; KENA, M. A. The efficacy of selected biological control agents against citrus black spot (CBS) pathogen *Phyllosticta citricarpa*. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 24, p. 2101-2104, 2017.
- MELO, J. F.; MARTINS, E. S.; KUPPER, K. C. Production of antifungal compounds by *Trichoderma* spp. To control *Phytophthora nicotianae*, causal agent of gummosis on citrus. **Citrus Research & Technology**, v. 36, n. 2, p. 37-48, 2015.
- MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, New Orleans, p. 1-8, 2010.
- MOHAMED, H. A. L. A.; HAGGAG, W. M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 181-191, 2006.
- MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: **BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341 p. p. 7-14.
- NEVES, M. F.; KALAKI, R. B.; TROMBIN, V. G. (Org.). **O Retrato da citricultura Brasileira**. Ribeirão Preto: CitrusBR, 2010. 137 p.
- NICOLOPOULOU-STAMATI, P.; MAIPAS, S.; KOTAMPASI, C.; STAMATIS, P.; HENS, L. Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. **Frontiers in Public health**, v. 4, n. 148, p. 1-8, 2016.
- NILSSON, R. H.; LARSSON, K.-H.; TAYLOR, A. F. S.; BENGTSOON-PALME, J.; JEPPESEN, T. S.; SCHIGEL, D.; KENNEDY, P.; PICARD, K.; GLÖCKNER, F. O.; TEDERSOO, L.; SAAR, I.; KÖLJALG, U.; ABARENKOV, K. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p. 259-264, 2019.
- OMMATI, F.; ZAKER, M. In vitro and greenhouse evaluations of *Trichoderma* isolates for biological control of potato wilt disease (*Fusarium solani*). **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 45, n. 14, p. 1715-1723, 2012.
- OWNLEY, B. H.; GRIFFIN, M. R.; KLINGEMAN, W. E.; GWINN, K. D.; MOULTON, J. K.; PEREIRA, R. M. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 3, p. 267-270. 2008.
- RHEINHEIMER, A. R.; BELLON, P. P.; MIRANDA, A. M.; PIETROWSKI, V.; ALVES, L. F. A.; PINTO JUNIOR, A. S.; SCHERER, W. A. Isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium*

anisopliae contra a Mosca-branca *Bemisia tuberculata* (Bondar) (Hemiptera: Aleyrodidae).

Cadernos de Agroecologia, v. 4, n. 2, p. 89-92, 2009.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian Phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

ROSMANA, A.; SAMUELS, G. K.; ISMAIEL, A.; IBRAHIM, E. S.; CHAVERRI, P.; HERAWATI, Y.; ASMAN, A. *Trichoderma asperellum*: A Dominant Endophyte species in Cacao Grown in Salawesi with Potential for Controlling Vascular Streak Dieback Disease. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, n. 1, p. 19-25, 2015.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 195-206, 2006.

SANTOS, C. C.; OLIVEIRA, F. A. de; SANTOS, M. S. dos; TALAMINI, V.; FERREIRA, J. M. S.; SANTOS, F. J. dos. Influência de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa*. **Scientia plena**, v. 8, n. 4, 2012.

SANTOS FILHO, H. P.; BARBOSA, C. de J.; LARANJEIRA, F. F.; SILVA, S. X. de B. **Clorose variegada dos citros ameaça a citricultura do Recôncavo Sul**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2010. 2 P. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Citros em foco, 34).

SANTOS-VILLALOBOS, S. de los; GUZMÁN-ORTIZ, D. A.; GÓMEZ-LIM, M. A.; DÉLANO-FRIER, J. P.; de-FOLTER, S.; SÁNCHEZ-GARCÍA, P.; PEÑA-CABRIALES, J. J. Potencial use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agente against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). **Biological Control**, v. 64, p. 37-44, 2013.

STAMATAKIS, A. RaxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014.

TCHAMENI, S. N.; SAMEZA, M. L.; O'DONOVAN, A.; FOKOM, R.; NGONKEU, E. L. M.; NANA, L. W.; ETOA, F. X.; NWAGA, D. Antagonismo of *Trichoderma asperellum* against *Phytophthora megakarya* and its potential to promote cacao growth and induce biochemical defence. **Micology**, v. 8, n. 2, p. 84-92, 2017.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOUSSOUN, T. A.; NELSON, P. E. **A pictorial guide to the identification of *Fusarium* species according to the taxonomic system of Snyder and Hansen**. 2nd ed. Pennsylvania: The Pennsylvania State University Press, 1976. 43 p.

VALENZUELA, N. L.; ANGEL, D. N.; ORTIZ, D. T.; ROSAS, R. A.; GARCÍA, C. F. O.; SANTOS, M. O. Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit. **Biological Control**, v. 91, p. 88-93, 2015.

VIVEK, S.; UPADHYAY, R. S.; SARMA, B. K.; SINGH, H. B. Seed bio-priming with *Trichoderma asperellum* effectively modulate plant growth promotion in pea. **International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 361-365, 2016.

WATANABE, S.; KUMAKURA, K.; KATO, H.; IYOZUMI, H.; TOGAWA, M.; NAGAYAMA, K. Identification of *Trichoderma* SKT-1, a biological control agent against seedborne pathogens of rice. **Journal of General Plant Pathology**, v. 71, n. 5, p. 351-356, 2005.

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, D. H.; SNINSKY, J. J.;

WHITE, T. J. (ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. Massachusetts: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WIJESINGHE, C. J.; WIJERATNAM, R. S. W.; SAMARASEKARA, J. K. R. R.; WIJESUNDERA, R. L. C. Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple caused by (*Thielaviopsis paradoxa*). **Crop Protection**, v. 30, n. 3, p. 300-306, 2011.

YAMAMOTO, P. T.; ROBERTO, S. R.; PRIA JÚNIOR, W. D.; FELIPPE, M. R.; FREITAS, E. P. Espécies e flutuação populacional de cigarrinhas em viveiro de citros, no município de Mogi-Guaçu-SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 389-394, 2002.

ZOLAN, M. E.; PUKKILA, P. J. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 6, p. 195-200, 1986.



Mandioca e Fruticultura

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

CGPE 016996