

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA DE SOUZA TEIXEIRA

**PROPOSTA PARA CONTROLE DE QUALIDADE MOLECULAR DE
BIOINSUMOS Á PARTIR DE *Trichoderma* spp.**

DOIS VIZINHOS

2022

FERNANDA DE SOUZA TEIXEIRA

**PROPOSTA PARA CONTROLE DE QUALIDADE MOLECULAR DE
BIOINSUMOS Á PARTIR DE *Trichoderma* spp.**

Proposal for molecular quality control of bioinputs from *Trichoderma* spp.

Trabalho de conclusão de curso de Pós-graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Especialista em Biologia Molecular – Habilitação em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): PhD Eng. Juliana Vitória Messias Bittencourt.

DOIS VIZINHOS

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

FERNANDA DE SOUZA TEIXEIRA

**PROPOSTA PARA CONTROLE DE QUALIDADE MOLECULAR DE
BIOINSUMOS Á PARTIR DE *Trichoderma* spp.**

Trabalho de conclusão de Curso de Especialização
apresentado como requisito para obtenção do título de
Especialista em Biologia Molecular – Habilitação em
Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do
Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 28 de fevereiro de 2023

Luciano Medina Macedo

Doutorado em Processos Biotecnológicos
UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Mariana Fidelis do Nascimento

Doutorado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia
UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Renata Micketen

Especialização em Processamento e Controle de Qualidade
UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

DOIS VIZINHOS

2022

Dedico este trabalho aos meus pais, em especial à minha mãe que está comigo a cada pensamento, pelos momentos de apoio, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me mostrar o caminho certo e por me dar forças quando tudo parecia perdido.

Imensamente grata pela disposição, paciência e dedicação para comigo e o meu trabalho à minha orientadora Profa. Dra. Juliana Vitória Messias Bittencourt, somente com a sua ajuda e sabedoria esse trabalho foi possível.

Sou imensamente grata aos meus pais, que sempre me apoiaram e incentivaram, e pelo amor expressados a cada momento de minha vida.

Agradeço também todo o apoio recebido pela minha filha e meu esposo, eles me ajudaram e me incentivaram durante toda a trajetória dessa pós-graduação.

Agradeço também a todo o corpo docente da Pós-Graduação da Universidade Tecnológica Federal do Paraná que me apresentaram a todo um mundo novo a explorar.

Enfim, agradeço a todos os que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa.

Quanto mais aumenta nosso
conhecimento, mais evidente fica nossa
ignorância.

(JOHN F. KENNEDY)

RESUMO

O uso excessivo de agrotóxicos na agricultura vem se tornando ao longo dos anos uma constante fonte de contaminação de solos, água, animais e humanos, e uma das alternativas ao seu uso está na adoção do uso de bioinsumos. Os bioinsumos são produtos produzidos à partir de extratos, metabólitos, hormônios e até mesmo por partes de outros organismos como plantas, fungos, bactérias ou vírus, e entre esses um dos mais adotados na produção de bioinsumos estão os fungos do gênero *Trichoderma*, pois possuem inúmeros mecanismos de inibição de crescimento de fitopatógenos, além de outros inúmeros mecanismos de indução de proteção e fortalecimento de plantas e sistema radicular, mas o gênero *Trichoderma* possui inúmeras espécies que são morfológicamente similares, mas com fisiologia e estrutura molecular distintos e por isso agem de formas diferentes frente a uma mesma ameaça. Em vista disso a produção e a comercialização de bioinsumos com formulação MIX está se tornando uma tendência. O controle de qualidade desses bioinsumos é uma etapa muito importante do processo produtivo, e é conduzido sem grandes dificuldades nos bioinsumos com a presença de apenas um microrganismo, o que já não ocorre nos bioinsumos MIX, que podem ter a presença de 2 ou mais microrganismos do mesmo gênero, mas de espécies diferentes, ou a presença de microrganismos de gêneros e espécies diferentes. Para que ocorra um controle de qualidade eficiente há a necessidade da adoção de metodologias que fazem uso de técnicas moleculares na determinação quantitativa, qualitativa e identificação dos microrganismos que compõem a formulação do bioinsumo MIX. Com essa problemática surge a necessidade de se propor uma metodologia de controle de qualidade que faça o uso de primers e PCR multiplex de forma rápida e econômica que possa ser adotada para uso constante para o controle de qualidade de bioinsumos MIX, para isso através de uma revisão bibliográfica de trabalhos que fizessem uso de primers e tivessem as condições de PCR descritas para cada uma dessas espécies de *Trichoderma*, *T. harzianum*, *T. asperellum* e *T. viride* foram separados. Após comparação entre os trabalhos, observou-se que os autores que fizeram uso de maiores quantidades de sequências genéticas na produção de seus primers foram os que obtiveram maior diferenciação e identificação dos *Trichodermas*. Uma das metodologias mais promissoras foi o uso de sequências de primers SCARs e PCR multiplex do autor Oskiera et al. (2017), que se mostrou eficiente na identificação das espécies e por adotar o uso de programas e softwares na produção dos primers gerou também economia de recursos financeiros.

Palavras-chave: *Trichoderma*; bioinsumo; primer; molecular.

ABSTRACT

Over the years, the excessive use of pesticides in agriculture has become a constant source of contamination of soil, water, animals and humans, and one of the alternatives to their use is the adoption of the use of bioinputs. Bioinputs are products produced from extracts, metabolites, hormones and even parts of other organisms such as plants, fungi, bacteria or viruses, and among these one of the most adopted in the production of bioinputs are the fungi of the genus *Trichoderma*, as they have numerous mechanisms for inhibiting the growth of phytopathogens, in addition to numerous other mechanisms for inducing protection and strengthening of plants and the root system, but the genus *Trichoderma* has numerous species that are morphologically similar, but with different physiology and molecular structure and therefore act differently, different ways against the same threat. In view of this, the production and commercialization of bioinputs with MIX formulation is becoming a trend. The quality control of these bioinputs is a very important step in the production process, and is carried out without major difficulties in bioinputs with the presence of only one microorganism, which no longer occurs in MIX bioinputs, which may have the presence of 2 or more microorganisms of the same genus but of different species, or the presence of microorganisms of different genera and species. For an efficient quality control to occur, there is a need to adopt methodologies that make use of molecular techniques in the quantitative and qualitative determination and identification of the microorganisms that make up the formulation of the MIX bioinput. With this problem arises the need to propose a quality control methodology that makes use of primers and multiplex PCR in a fast and economical way that can be adopted for constant use for the quality control of MIX bioinputs, for this through a bibliographical review of works that made use of primers and had the PCR conditions described for each of these *Trichoderma* species, *T. harzianum*, *T. asperellum* and *T. viride* were separated. After comparing the works, it was observed that the authors who use greater amounts of genetic sequences in the production of their primers were those who obtained greater differentiation and identification of *Trichoderms*. One of the most promising methodologies was the use of SCARs primers and multiplex PCR sequences by the author Oskiera et al. (2017), which proved to be efficient in identifying species and by adopting the use of programs and software in the production of primers, also generated savings in financial resources.

Keywords: *Trichoderma*; bioinput; primer; molecular.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo de vida assexual de <i>Trichoderma</i> adaptado de Kruger e Bacchi (1995)	18
Foto 1 – Placas de Petri com crescimento de diferentes espécies de <i>Trichoderma</i> spp., (à direita - <i>T. asperellum</i> , centro - <i>T. harzianum</i> , e à esquerda - <i>T. viride</i>).....	19
Figura 2 - Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança com sequências parciais de rpb2 de isolados representativos de <i>Trichoderma</i> spp.	21
Quadro 1 - Substâncias produzidas por <i>Trichoderma</i> spp., e suas atividades.	22
Figura 3 - Etapas exigidas pelo MAPA para a obtenção do registro de produto bioformulado com finalidade de controle biológico de doenças fitopatogênicas.	26
Figura 4 - Controle de Qualidade nos Sistemas de Produção	28
Foto 2 - Conídios germinados observados ao microscópio óptico no aumento de 200x.....	31
Foto 3 - Conídios germinados observados ao microscópio óptico no aumento de 400x.....	31
Foto 4 - Placas de Petri com meio de cultura BDA e colônias de fungo (UFC) de <i>Trichoderma</i> spp.....	32
Gráfico 1 - Porcentagem de bioinsumos à base de cada espécie de <i>Trichoderma</i> comercializada.	47
Quadro 2 - Marcadores microssatélites para <i>Trichoderma asperellum</i> a partir do trabalho de Rai et al., (2016).	48
Quadro 3 - Autor, Ano de publicação, Primers, Número de bases e Condições da PCR, para <i>Trichoderma viride</i>	50
Quadro 4 - autor, ano de publicação, primers, número de bases e condições da PCR, <i>Trichoderma harzianum</i>	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Seleção dos artigos usados na pesquisa mediante a apresentação de primers específicos para a identificação de cada espécie.....	39
Tabela 2 - Autor, ano, tipo e quantidade de primers descritos para <i>Trichoderma harzianum</i>	46
Tabela 3 - Autor, ano e quantidade de primers descritos para <i>Trichoderma asperellum</i>	48
Tabela 4 - Autor, ano e quantidade de primers descritos para <i>Trichoderma viride</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	Amplified fragment length polymorphism – polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde
ASA	Amplified specific amplicon
ATP	Adenosina trifosfato
BDA	Meio de cultura contendo batata, dextrose e ágar
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAPS	Cleaved amplified polymorphic sequences
CEFET	Centro Federal de Educação Tecnológica
CEPLAC	Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira
DarT	Diversity arrays technology
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA-barcoding	Código de barras de DNA
ESTs	Expressed Sequence Tags – etiquetas de sequências expressas
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ISSR	Inter-simple sequence repeats – repetição de sequência interna simples
IT	Instrução de Trabalho
ITS	Espaçadores internos transcritos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MI	Mililitro
MP-PCR	Classe de microssatélite
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next Generation sequencing – sequenciamento de nova geração
PCR-RFLP	Idem a CAPS
POP	Procedimento Operacional Padrão
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
rDNA	DNA ribossomal
Rep-PCR	PCR em sequências palindrômicas extragênicas repetidas
RET	Registro Especial Temporário
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism – Polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SCAR	Sequence characterized amplified regions
SNP	Single nucleotide polymorphism – polimorfismo de base única
SRAP	Sequence related amplified polymorphism – polimorfismo amplificado relacionado à sequência
SSR	Simple sequence repeats – repetição de sequência simples
UFC	Unidade formadora de colônia

UP-PCR
VTNR

Reação em cadeia de polimerase universalmente iniciada
Variable number of tandem repeats – repetições em tandem de regiões
variáveis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Sistemática do gênero <i>Trichoderma</i>	17
3.2 Filogenia molecular em <i>Trichoderma</i>	20
3.3 Mecanismos de ação de <i>Trichoderma</i>	22
3.4 Bioinsumos à base de <i>Trichoderma spp</i>	23
3.5 Bioinsumos no Brasil e a Legislação	24
3.6 Controle de qualidade	27
3.6.1 Controle de qualidade de bioinsumos	29
3.6.2 Determinação do número total de conídios da amostra	29
3.6.3 Determinação do número de conídios viáveis.....	29
3.6.4 Determinação do número de unidades formadoras de colônias	32
3.7 Técnicas moleculares	32
3.7.1 Marcadores moleculares baseados por hibridização	34
3.7.2 Marcadores moleculares baseados por amplificação.....	35
3.7.3 Marcadores moleculares baseados por sequenciamento	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Processo produtivo amostrado.....	38
4.2 Análise bibliográfica para a identificação molecular de diferentes espécies do gênero <i>Trichoderma spp</i> a partir de marcadores de DNA	39
4.3 Seleção de trabalhos para diferenciação entre espécies de <i>Trichoderma</i> ..	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Metodologias empregadas por autor.....	41
5.2 Primers <i>Trichoderma harzianum</i>	46
5.3 Primers <i>Trichoderma asperellum</i>	47
5.4 Primers <i>Trichoderma viride</i>	49
5.5 Seleção de primers para diferenciação entre espécies de <i>Trichoderma</i>	54
5.6 Organização de procedimento padrão para implantar processo de controle de qualidade de bioinsumos com dois ou mais espécies.....	54
6 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXO - AUTOR, ANO DE PUBLICAÇÃO, PRIMERS, NÚMERO DE BASES E CONDIÇÕES DA PCR, <i>Trichoderma harzianum</i>	62

1 INTRODUÇÃO

O uso excessivo de agrotóxicos nas lavouras pode trazer inúmeros prejuízos ao meio ambiente, como contaminação de solo, de água, de toda a fauna e flora, além de ser prejudicial à saúde humana. Em vista disso, o uso de bioinsumos está crescendo, uma vez que ele se torna uma alternativa para um controle de fitopatógenos sem ser agressivo para a saúde humana ou ao meio ambiente.

Bioinsumos são produtos produzidos a partir de extratos de plantas, ou microrganismos, com ou sem seus metabólitos, que podem ter diferentes funções como nutrição, fortalecimento, proteção ou combate a diversos fitopatógenos, podendo ser aplicados no solo, nas plantas, ou ainda para o tratamento de sementes.

Os fungos do gênero *Trichoderma*, constituem um dos agentes de biocontrole mais usados na fabricação de bioinsumos para a agricultura por causa de seus inúmeros mecanismos de ações benéficos para as plantas. Sua comercialização se faz por diferentes formulações conforme o tipo de praga de uma determinada cultura, e por isso a concentração informada se encontra em diferentes unidades de medida. Além disso, recentemente temos as formulações mix, na qual há presença de mais de uma espécie de microrganismo, e todas essas questões dificultam ainda mais as metodologias para o controle de qualidade desses produtos.

O controle de qualidade é extremamente importante, pois ele garante que esses bioinsumos possuem qualidade e que sejam eficazes, o que contribui para conquistar e manter a confiança dos agricultores, além de ampliar o comércio e os investimentos no mercado de agentes de biocontrole.

Em meio a esse cenário surge a necessidade de metodologias mais precisas para a identificação e quantificação desses bioinsumos, tais como as que utilizam técnicas de biologia molecular aplicada.

Atualmente as metodologias mais adotadas de controle de qualidade dos bioinsumos à partir de fungos são as que determinam o número total de conídios, as que informam a porcentagem de conídios viáveis, bem como o seu vigor baseado no tempo de germinação, e a que determina a quantidade de unidades formadoras de colônias, sendo esta última a mais relevante. Essas metodologias quando aplicadas aos bioinsumos que contêm apenas um microrganismo, apresentam resultados que são considerados realistas e de relevância, mas apresentam dificuldade de aplicação em bioinsumos com formulação mix, uma vez que diferentes microrganismos

possuem diferentes tempos de germinação, diferentes necessidades nutricionais que ocasionam a necessidade de meios de cultura diferentes, e também um microrganismo pode dificultar a germinação do outro por diferentes modos de ação, como competição, além de não ser possível a diferenciação de microrganismos de bioinsumos mix que apresentam mais de uma espécie do mesmo gênero na fórmula.

Por causa dessa problemática se faz necessário o uso de técnicas moleculares para determinação da quantidade de esporos viáveis, e para a contagem de esporos de bioinsumos contendo microrganismos de mesma espécie, mas de cepas diferentes, e de bioinsumos contendo microrganismos de espécies diferentes. No mercado já é possível adquirir kits prontos para uso em equipamento de RT-PCR, para determinação de esporos viáveis e para contagem de esporos, mas o alto custo dos mesmos dificulta o controle de qualidade dos bioinsumos mix, em média o teste de uma amostra custa em torno de R\$115,00 à R\$160,00 para um bioinsumo contendo duas espécies de microrganismos, podendo ficar mais oneroso dependendo da quantidade dos microrganismos existentes dentro do bioinsumo mix.

Em vista disso, a partir de uma revisão de literatura neste tema, este trabalho intensiona propor uma metodologia adequada de identificação e quantificação de esporos viáveis e não viáveis de fungos *Trichoderma* spp, em produtos mix, fazendo uso de técnicas de biologia molecular. Proporcionando otimização de tempo, recursos financeiros, e mobilização de espaço e pessoal especializado para o controle de qualidade do produto nas diferentes etapas da cadeia de produção destes bioinsumos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Propor uma metodologia de controle de qualidade de bioinsumos a partir de *Trichoderma* spp., fazendo uso de técnicas de biologia molecular com PCR específico.

2.2 Objetivos Específicos

Realizar levantamento na bibliografia de trabalhos que realizem identificação molecular de diferentes espécies do gênero *Trichoderma* spp;

Selecionar primers que permitam uma ampliação em reação multiplex;

Organizar um procedimento padrão para implementar este processo de controle de qualidade.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Sistemática do gênero *Trichoderma*

As espécies do gênero *Trichoderma*, são onipresentes no solo, onde podem representar a maioria da biomassa fúngica, desempenhando papéis ambientais importantes, como a degradação de compostos orgânicos complexos, estabelecimento de interações mutualísticas com plantas, (PEREZ *et al.*, 2014), além de efeitos benéficos no crescimento da planta e no desenvolvimento da raiz (ABD-ELSALAM, *et al.*, 2010).

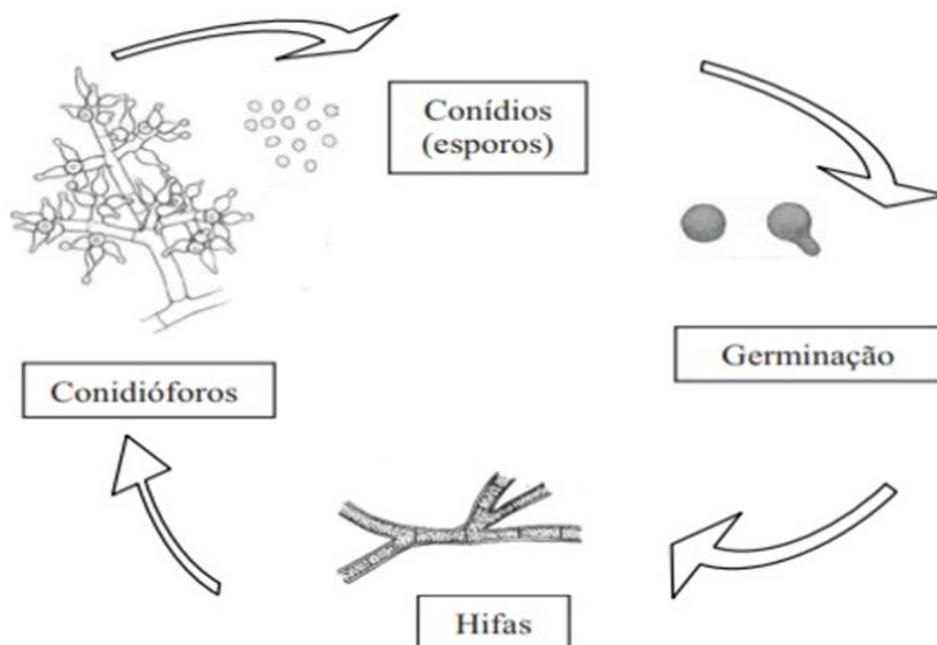
Devido aos efeitos nocivos dos pesticidas químicos na saúde humana e no meio ambiente, recentemente os agentes de controle biológico têm sido usados com mais frequência como uma alternativa no controle de fitopatógenos (MAZROU *et al.*, 2021).

De acordo com Steindorff (2016), Reis (2014) e Meyer (2019), o fungo *Trichoderma* pode ser classificado como pertencente ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Subclasse Hypocreomycetidae, Ordem Hypocreales, Família Hypocreaceae, e Gênero *Trichoderma*.

O nome *Trichoderma* é aplicado em relação a fase assexuada (Figura 1), comumente encontrada em colônias em placas de Petri, e o nome *Hypocrea* é usado na fase sexuada, encontrada na natureza sobre fungos macroscópicos e em madeira em decomposição, hoje em dia o nome da fase sexuada tornou-se obsoleto (MEYER, *et al.*, 2019).

Atualmente mais de 250 espécies de *Trichoderma* são aceitas e atualmente essas espécies estão classificadas em grupos monofiléticos ou clados dentro da filogenia do gênero e nomeados de acordo com a espécie mais conhecida de cada clado. Há 5 clados: *Harzianum*, *Virens*, *Stromaticum*, *Viride* e *Longibractum* (MEYER, *et al.*, 2019).

Figura 1 - Ciclo de vida assexual de *Trichoderma* adaptado de Kruger e Bacchi (1995)



Fonte: Machado *et al.*, (2012)

Clado Harzianum, é onde se encontra a morfo-espécie mais comumente empregada no controle biológico de doença em plantas no mundo, está presente em solos e restos vegetais de várias regiões geográficas, algumas espécies são consideradas cosmopolitas e outras possuem distribuição mais restrita, algumas são consideradas endófitas enquanto outras são micoparasitas, muitos biofungicidas são formulados e comercializados no Brasil com essas espécies. Fazem parte deste clado as espécies *T. harzianum* (foto 1), *T. afroharzianum*, *T. guizhouense*, *T. afarasin*, *T. lentiforme*, *T. pleurotum*, *T. aggressivum* e *T. simonsii*. (MEYER, *et al.*, 2019).

Clado Virens: em sua maioria são cosmopolitas, são comuns nos solos e em ninhos de formigas cortadeiras, atuam por diferentes modos de ação, com destaque para a antibiose exercida por enzimas líticas e metabólitos secundários como gliotoxina e glioviridina. Faz parte desse clado o *T. virens* (MEYER, *et al.*, 2019).

Clado Stromaticum: de ocorrência restrita à América Tropical, está associada ao cacaueteiro e ao parasita *Moniliophthora perniciosa*, que é o patógeno da vassoura-de-bruxa do cacaueteiro, o representante desse clado é o *T. stromaticum* (MEYER, *et al.*, 2019).

Clado Viride: é um clado composto por dezenas de espécies com diferentes padrões de morfologia, devido ao grande número de espécies filogenéticas presentes neste clado, este costuma ser dividido em subclados como Viride, Viridescens, Koningii e Hamatum, e cada um deles possuem diversas espécies presentes em seu subclados. A espécie *T. atroviride* é a única que está situada entre os subclados Viride e Koningii. A maior parte das espécies descritas nos subclados Viride, Viridescens e Koningii estão presentes na Europa e EUA, e são consideradas comuns no hemisfério Norte. No subclado Hamatum estão presentes as espécies de *T. asperellum* (Foto 1) e *T. asperelloides*, habitantes comuns de solo neotrópico, são considerados micoparasitas agressivos e podem induzir resistência sistêmica em plantas, algumas espécies incluídas neste clado são *T. viride* (Foto 1), *T. atroviride*, *T. koningiopsis*, *T. ovalisporum*, *T. asperellum* e *T. asperelloides* (MEYER, et al., 2019).

Foto 1 - Placas de Petri com crescimento de diferentes espécies de *Trichoderma* spp., (à direita - *T. asperellum*, centro - *T. harzianum*, e à esquerda - *T. viride*).



Fonte: Autoria própria (2022)

Clado Longibrachiatum, possuem espécies mesofílicas, ou seja, que são capazes de crescer rapidamente e de esporular mesmo à 40°C, podendo causar infecções oportunistas em indivíduos com imunossupressão. Entre as espécies presentes neste clado temos *T. reesei* que é uma espécie saprofítica com grande

capacidade de degradação de substratos celulósicos, são espécies desse clado *T. reesei*, *T. bissetii*, *T. citrinoviride* e *T. longibrachiatum* (MEYER, *et al.*, 2019).

3.2 Filogenia molecular em *Trichoderma*

Segundo Meyer *et al.*, (2019) a definição de espécies filogenéticas em fungos se dá através da construção de árvores filogenéticas, (Figura 2), e através de análises feitas com sequências parciais de genes compartilhados e comparados com outros organismos, podendo se definir como espécie filogenética o menor grupo monofilético caracterizado por um conjunto fixo de polimorfismos de DNA dentro dessa região sequenciada, mas na prática essa identificação não é clara, e a solução seria a utilização de várias sequências de genes independentes no genoma e analisados em combinação para se definir as espécies, um procedimento de análise de multi-loci. Conforme vários autores (MEYER *et al.*, 2019; MELO, 2009; LOPES, 2012; FRANCISCO, 2016; e STEINDORFF, 2016), o uso de sequência de vários genes independentes do genoma, e analisados em combinação são as análises mais recomendadas para se identificar as espécies de *Trichoderma*. Dentre essas análises as mais utilizadas são as que sequenciam os espaçadores internos transcritos 1 e 2, e a região 5.8S ou sequência ITS, que estão entre as regiões codificadoras das subunidades 18S e 28S do RNA ribossômico, região considerada de fácil amplificação, e embora seja considerada a região código de barras universal para a identificação de fungos, esta região também é considerada muito conservada e de pouca resolução para especificar as espécies muito próximas. Com isso outros genes, como alguns genes codificadores de proteínas e enzimas podem oferecer melhor resolução para a delimitação das espécies, no caso do *Trichoderma* são usadas as sequências parciais dos genes de alfa-actina (*act*), calmodulina (*cal*), endoquitinase CHI18-5 (*chi18-5*), fator de alongação 1-alfa (*tef1*) e a segunda maior subunidade de RNA polimerase II (*rpb2*). Ressaltando que ferramentas computacionais, equipamentos e programas tecnológicos estão em constante atualização na busca de melhores resultados da sistemática filogenética (ADELL, 2004).

Figura 2 - Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança com sequências parciais de rpb2 de isolados representativos de *Trichoderma* spp.



Fonte: Meyer et al., (2019)

3.3 Mecanismos de ação de *Trichoderma*

As espécies do gênero *Trichoderma* estão entre as mais estudadas e utilizadas como antagonistas e por serem facilmente encontradas nos solos, são de grande importância agrônômica, pois atuam como decompositores primários e destacam-se pela produção de metabólitos e de enzimas com propriedades antifúngicas (Quadro 1), possuindo assim grande potencial para a indústria farmacêutica e para bioensaios agrícolas. Esse gênero possui vários mecanismos de ação no controle de fitopatógenos, entre eles estão o micoparasitismo, a antibiose, a competição e a indução de mecanismos de defesa nas plantas (REIS, 2014; FRANCISCO, 2016; LOPES, 2012; HADDAD, 2014).

Quadro 1 - Substâncias produzidas por *Trichoderma* spp., e suas atividades

SUBSTÂNCIA	ATIVIDADE
Gliotoxina, viridina, trichodermina, suzucacilina, alameticina e dermadina	Antibiótica
Enzimas hidrolíticas extracelulares	Antagonista
Proteases	Degrada enzimas sintetizadas pelo patógeno
Quitinases, glucanazes e peroxidases	Indução de resistência
Ácido indolacético (auxina)	Promoção de crescimento
Sideróforos	Solubilização

Fonte: Machado et al., (2012)

Conforme Steindorff (2016), análises comparativas entre *T. atroviride*, *T. virens* e *T. reesei* mostraram que os três apresentaram a mesma capacidade micoparasitária, mas que as estratégias utilizadas durante a interação com o fitopatógeno foram diferentes, e que o estudo desses mecanismos de biocontrole são complexos e podem ocorrer por diferentes formas, podendo ser por mecanismos diretos ou indiretos, ou uma combinação destes.

Micoparasitismo, é uma relação nutricional entre dois seres vivos na qual um deles obtêm toda ou parte de seu alimento às custas do outro, para isso o gênero

Trichoderma secreta quitinases, beta glucanases e proteases, que são enzimas degradadoras que alteram a permeabilidade da parede celular, facilitando assim a entrada de suas hifas no fungo parasitado (REIS, 2014; FRANCISCO, 2016, LOPES, 2012; HADDAD, 2014).

Antibiose, é a interação entre organismos onde um deles secretam metabólitos capazes de inibir ou impedir o desenvolvimento de outro. O gênero *Trichoderma* pode secretar mais de 100 diferentes tipos de antibióticos, esses podem ser do tipo volátil ou não-volátil, os volatéis são substâncias que penetram facilmente na fase gasosa como lipídeos solúveis. Dentre esses metabólitos estão presentes o ácido harziânico, as alamethicinas, as tricolinas, os antibióticos, as glisopreninas, os ácidos heptelídico, as gliovirina, as viridina e as massoilactonas. Entre os metabólitos secundários são conhecidos as pironas, os terpenóides, os esteroides, as gliotoxinas, e peptídeos também conhecidos como peptaibols (REIS, 2014; FRANCISCO, 2016, LOPES, 2012; HAADDAD, 2014; MAZROU *et al.*, 2021), entre os principais efeitos dessas secreções estão as atividades antifúngicas, antibacterianas, antivirais, imunossupressores, citostática e inibição de ATP (ADELL, 2004).

Competição, é onde ocorre a interação entre dois ou mais indivíduos envolvendo a disputa por nutrientes, como carbono, nitrogênio e ferro, e por espaço, sendo este um dos mecanismos de ação mais conhecido do gênero *Trichoderma* (REIS, 2014; ADELL, 2004; PEREZ *et al.*, 2014).

Indução de resistência, são mecanismos na qual a planta se defende de agressões causadas por fitopatógenos, através da produção de diferentes substâncias como lignina, fitoalexina e compostos fenolíticos. Sabe-se ainda que o gênero *Trichoderma* é capaz de ativar mecanismos de defesa, além de ativar mecanismos de estimulação de crescimento das plantas por meio da solubilização de fosfato e outros minerais, tornando-os disponíveis para as plantas, e podendo produzir substâncias que induzam a alongação celular nos vegetais superiores (REIS, 2014), eles também são considerados estimuladores de germinação e emergência de sementes (ADELL, 2004, PEREZ *et al.*, 2014; MAZROU *et al.*, 2021).

3.4 Bioinsumos à base de *Trichoderma* spp.

O uso de agentes de biocontrole é considerado uma alternativa sustentável e ambientalmente correta em relação ao uso de agrotóxicos químicos. Na produção

massal de fungos, a seleção dos meios de cultura poderá influenciar a qualidade, a quantidade e os custos da produção, por isso meios que contenham fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, vitaminas, macro e micronutrientes de forma equilibrados para o crescimento e esporulação do fungo são fatores decisivos. Além disso, o formato de cultivo como meio sólido, líquido ou bifásico também é importante, pois cada um possui vantagens e desvantagens, podendo variar a concentração de ativos, a quantidade de contaminação, e a taxa de tempo de vida de prateleira dos produtos, variando essas modalidades em relação à espécie de *Trichoderma* usado, (HADDAD, 2014).

Bioinsumos à base de *Trichoderma spp.* são uma realidade na agricultura, inúmeras formulações podem ser encontradas no mundo, sendo a Índia o país com a maior quantidade de formulações registradas. A maior parte das formulações possuem uma única espécie de *Trichoderma spp.* (67%), enquanto outras possuem combinações de mais de um isolado/espécie de *Trichoderma spp.*, ou até combinações de *Trichoderma spp.*, com outros microrganismos benéficos como *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, endomicorrizas, etc (WOO *et al.*, 2014).

A maioria das formulações de bioinsumos comercializadas no mundo se encontram na forma de pó molhável WP (55,3%), granulados (13,6%), líquidos (10,3%) e sólidos (6,2%). Em meados de 2010 a quantidade de bioinsumos registrados contendo *Trichoderma spp* era de cerca de 273 produtos (WOO *et al.*, 2014).

O mercado global de bioinsumos movimentou cerca de US\$ 6,387 bilhões em 2017, e estima-se que alcance US\$ 16,7 bilhões até 2024, com uma estimativa de crescimento anual de 15% (MEYER, *et al.*, 2019).

3.5 Bioinsumos no Brasil e a Legislação

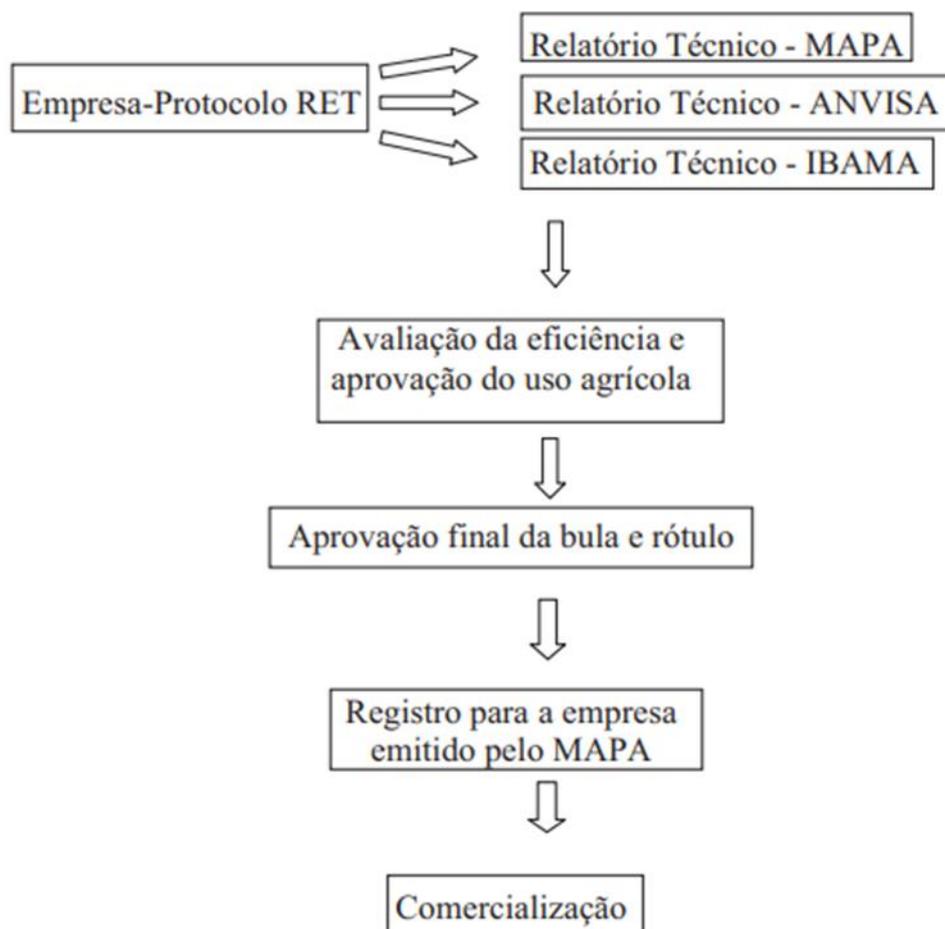
O primeiro bioinsumo à base de *Trichoderma* foi disponibilizado em 1987, e foi produzido pela Embrapa Clima Temperado, o primeiro registro de um produto comercial só ocorreu em 2006. No Brasil, os bioinsumos representaram menos de 20% dos produtos registrados em 2019, e no mesmo ano haviam cerca de 200 produtos à base de agentes de biocontrole registrados. Um aspecto que contribuiu para o crescimento do mercado de controle biológico no Brasil foi o avanço da legislação para o registro de produtos de baixa toxicidade e periculosidade, onde

estão incluídos os agentes de biocontrole, coordenados pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde). (MEYER, *et al.*, 2019).

No Brasil, a falta de bioinsumos à base de *Trichoderma spp*, devidamente registrados no MAPA se deve por se tratar de um processo oneroso e demorado, pois as empresas são submetidas aos mesmos critérios de um registro de agrotóxico. Essa lei é regulamentada pelos Decretos nº 98.816, de 11 de janeiro de 1990 e a de nº 4.074 de 04 de janeiro de 2002. Esta última é para a obtenção do (RET), Registro Especial Temporário, que permite que o bioinsumo seja destinado à pesquisa e que poderá passar por experimentos em locais credenciados pelo MAPA (MACHADO *et al.*, 2012).

Para a obtenção do registro a empresa deverá já ter de antemão o RET, após isso o produto terá que ser analisado pela ANVISA, que fará ensaios com animais, sempre extrapolando os resultados para os seres humanos e estabelecendo classes toxicológicas que variam de I a IV, sendo a Classe I (extremamente tóxico), a Classe II (altamente tóxico), a Classe III (moderadamente tóxico) e a Classe IV (pouco tóxico). O produto também terá que ser analisado pelo IBAMA que fará ensaios toxicológicos com organismos não alvo, estudará o comportamento do produto no meio ambiente com ensaios de mobilidade no solo, concentração nas cadeias tróficas, estudos físico-químicos, além de testes de metabolismo e degradação, classificando o produto quanto ao seu potencial de periculosidade ao meio ambiente. Após os testes desses três órgãos, há a expedição de um laudo que determina quais os patógenos e as culturas que poderão ser destinados esses bioinsumo, além de determinar as suas dosagens, os números de aplicações e o intervalo de segurança, realizando assim o registro do produto e publicando a decisão no Diário Oficial da União (MACHADO *et al.*, 2012) (Figura 3).

Figura 3 - Etapas exigidas pelo MAPA para a obtenção do registro de produto bioformulado com finalidade de controle biológico de doenças fitopatogênicas



Fonte: Machado et al., (2012)

Os bioinsumos atualmente registrados no MAPA, são em sua maioria à base de *T. harzianum*, (MACHADO et al., 2012), *T. asperellum*, *T. koningiopsis* e *T. stromaticum*, além de outros à base de *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* e *B. methylotrophicus* (MEYER, et al., 2019).

Esses bioinsumos podem ser aplicados de diversas formas como por pulverização foliar, aplicação pré-plantio em sementes ou materiais de propagação, tratamento pós-poda, incorporados ao solo, rega de raízes entre outros. Eles podem ser usados em estufas, viveiros, campo, pomares e em hidroponia, e possuem a capacidade de inibir um grande número de patógenos, entre eles *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium spp*, *Fusarium oxysporum*,

Verticillium spp e *Gauemannomyces graminis* (WOO *et al.*, 2014). Esses biofungicidas são utilizados nas culturas de soja, algodão, milho, feijão, morango, citrus, cana-de-açúcar, café, tabaco, hortaliças, ornamentais, frutíferas e espécies florestais. (MEYER, *et al.*, 2019).

3.6 Controle de qualidade

Segundo Ferreira *et al.* (2016), os dois fatores que motivam as vendas são preço e qualidade, sendo que somente a qualidade é o fator que proporcionará o retorno do cliente, e qualquer empresa pra ter lucro e continuidade operacional necessita possuir conhecimentos das expectativas dos clientes.

O controle de qualidade é uma ferramenta importante que reconhece as necessidades dos clientes e que estabelece padrões para atender essas necessidades, buscando sempre a melhoria contínua, e conduzindo a empresa à competição no mercado atual (FERREIRA *et al.*, 2016).

Com o uso de processos de controle de qualidade é possível desenvolver novos produtos e serviços melhores, e com mais agregação de valores como: produtos com mais qualidades, mais tecnologias, financeiramente mais acessível, de entrega rápida, entre outros, tornando essa empresa apta à sobreviver em meio a competição dos concorrentes, podendo ainda avaliar toda a sua cadeia de produção, através da obtenção de informações sobre a produção, custos, estoque, sempre com foco na máxima produção, corte de erros e gastos, avaliação de mercado promovendo uma melhoria contínua no processo produtivo e tornando-se mais flexível as mudanças do mercado globalizado (FERREIRA *et al.*, 2016) (Figura 4).

Figura 4 - Controle de Qualidade nos Sistemas de Produção



Fonte: Ferreira *et al.*, (2016)

A ausência do controle de qualidade pode acarretar em várias consequências financeiras, como custos desnecessários, retrabalhos, perdas, desperdícios, além de outros sérios problemas ambientais, como uso e poluição de recursos ambientais além dos planejados, o que impactará negativamente a empresa e contribuirá para uma insatisfação dos clientes (PAULA *et al.*, 2017)

A qualidade dos produtos e serviços se tornou importante quando surgiu a concorrência entre as indústrias automobilísticas japonesa e americana entre 1970 e 1980, onde os americanos possuíam mais foco em volume de produção e corte de recursos, e a indústria japonesa decidiu investir em qualidade, e com a implantação de ferramentas de gestão da qualidade ela conseguiu se tornar mais competitiva, tornando-se referência em qualidade e isso ampliou a sua competitividade no mercado americano (FERREIRA *et al.*, 2016)

Em laboratórios de controle de qualidade de produtos destinados à agricultura, no caso bioinsumos, a qualidade é alcançada quando se há controle sobre todas as etapas dos processos realizados naquele local, fazendo-se o uso de indicadores e metas, padronizando cada atividade envolvida, desde a chegada da amostra até a liberação do laudo. Todas as atividades devem ser documentadas por meio de procedimentos operacionais padrão (POP) e/ou instruções de trabalho (IT), que deverão sempre estar acessíveis aos profissionais envolvidos nas atividades laboratoriais (CHAVES, 2010).

Diante de todas essas premissas faz-se necessário a implantação, manutenção e atualização dos programas de qualidade, que garantam o bom desempenho do processo e do produto, bem como de atualizações contínuas dos

funcionários envolvidos nos processos, para que estejam cientes da importância dos resultados obtidos na cadeia produtiva de bioinsumos.

3.6.1 Controle de qualidade de bioinsumos

Com a produção de inúmeros produtos e formulações houve um aumento de bioinsumos com baixa qualidade, no Brasil são inexistentes as metodologias padronizadas para o controle de qualidade e por isso foi criada uma rede de pesquisa denominado Projeto Qualibio, o qual desenvolveu metodologias para avaliar a conformidade e a qualidade de bioinsumos formulados à base de agentes microbianos. Esse projeto foi financiado pelo MAPA e teve participação da Embrapa Arroz e Feijão, Instituto Biológico de São Paulo, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Universidade Federal de Pelotas e da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC/CEFET). Essas metodologias não foram oficializadas pelo MAPA, mas são utilizadas por praticamente todas as empresas, laboratórios e instituições de pesquisa. No Projeto Qualibio foram desenvolvidas as metodologias para quantificação total de conídios, para a porcentagem de conídios viáveis, e para a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC), esta última é a mais relevante e realista para os agricultores (MEYER, *et al.*, 2019).

3.6.2 Determinação do número total de conídios da amostra

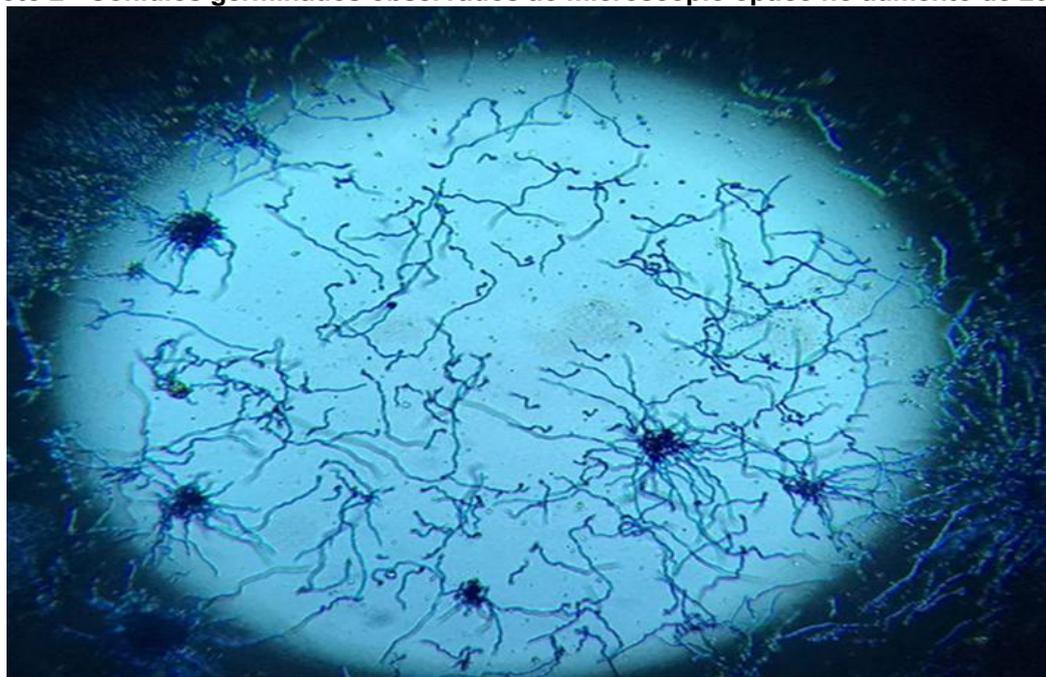
Este é um método quantitativo em que o resultado é expresso em números de conídios por massa ou volume de produto biológico formulado. Tem como base a preparação de uma suspensão de conídios de *Trichoderma*, seguida de uma diluição seriada e contagem do número de conídios com o auxílio de uma câmara de Neubauer ao microscópio óptico (MEYER, *et al.*, 2019).

3.6.3 Determinação do número de conídios viáveis

Este é um método quantitativo onde o resultado é expresso em porcentagem de conídios viáveis (germinados e ativos). Tem como base a preparação de uma suspensão de conídios de *Trichoderma*, seguida de uma diluição seriada e dispensa de uma alíquota dessa suspensão em áreas delimitadas de placas de Petri contendo

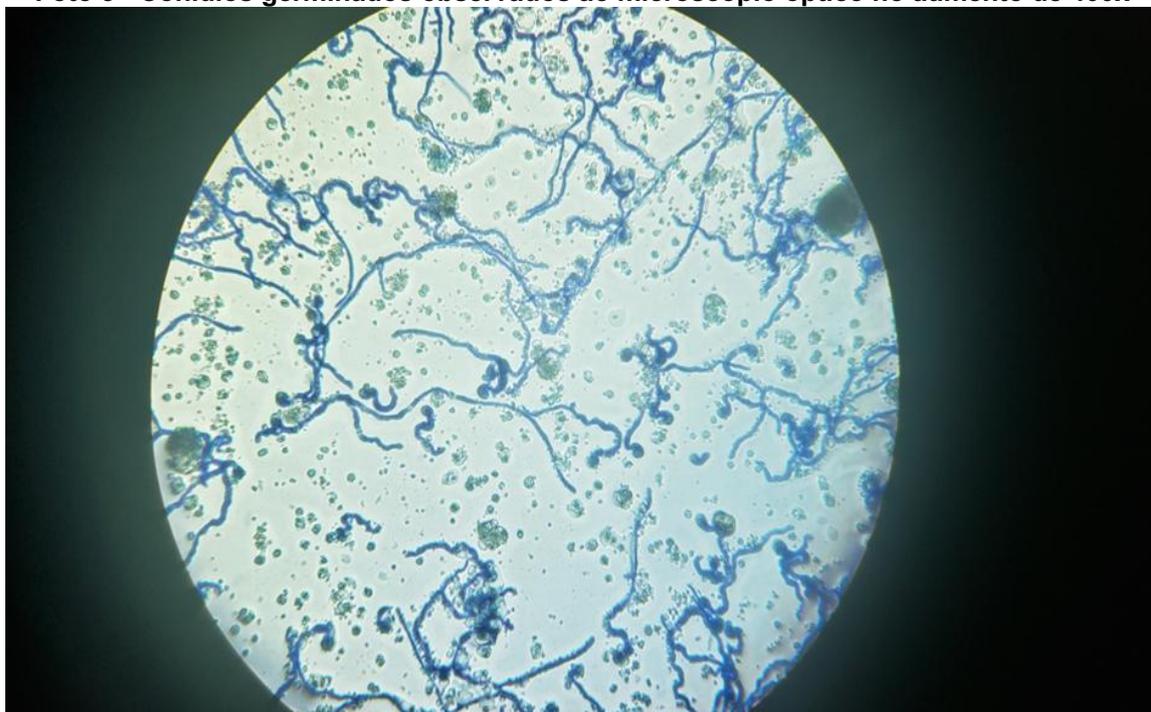
meio de Batata, Dextrose e Ágar (BDA), incubação em temperatura adequada para a germinação dos conídios e contagem dos números de conídios viáveis e total ao microscópio óptico (Foto 2 e 3) (MEYER, *et al.*, 2019).

Foto 2 - Conídios germinados observados ao microscópio óptico no aumento de 200x



Fonte: Autoria própria (2022)

Foto 3 - Conídios germinados observados ao microscópio óptico no aumento de 400x

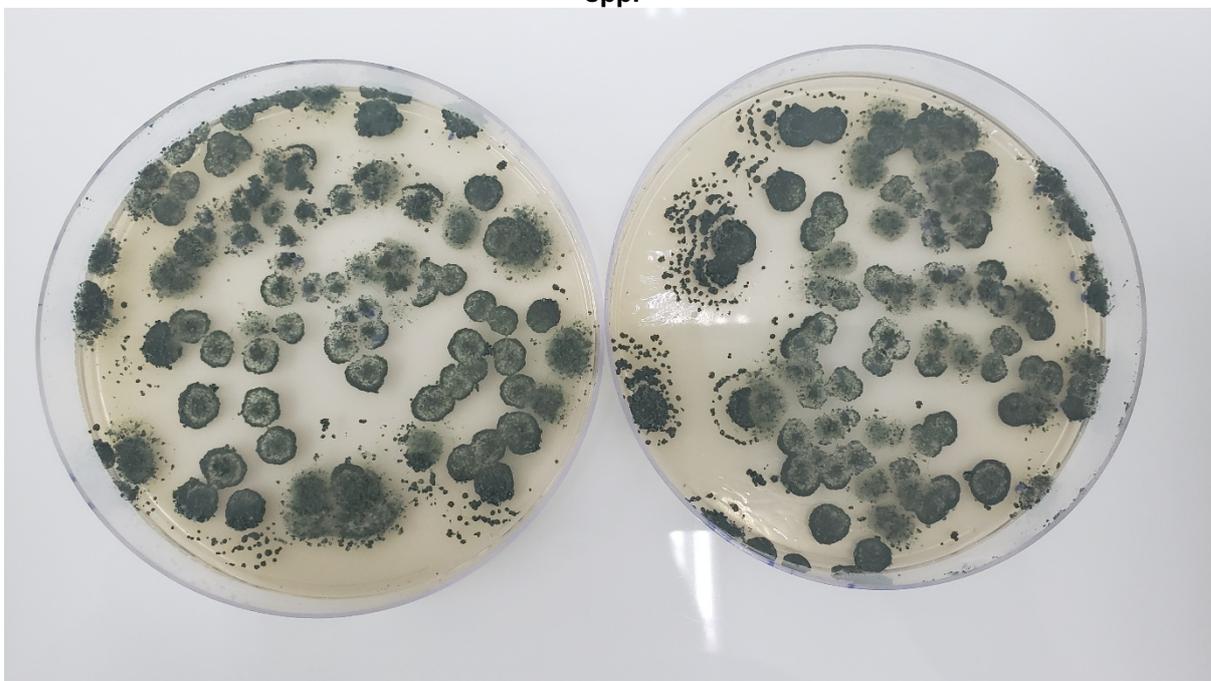


Fonte: Autoria própria (2022).

3.6.4 Determinação do número de unidades formadoras de colônias

Este é um método quantitativo, onde o resultado é expresso em unidades formadoras de colônia (UFC/ml). Tem como base a homogeneização do produto biológico com o diluente esterilizado (solução salina com adição de Tween 80). A partir dela é realizado diluições decimais seriadas, as quais são distribuídas em placas sobre meio BDA com Triton e incubadas à 25 °C, para posterior contagem do número de colônias formadas pelo *Trichoderma*, (Foto 4), (MEYER, *et al.*, 2019).

Foto 4 - Placas de Petri com meio de cultura BDA e colônias de fungo (UFC) de *Trichoderma* spp.



Fonte: Autoria própria (2022)

3.7 Técnicas moleculares

O emprego de técnicas de biologia molecular resultou por volta da década de 1980 e início de 1990, uma verdadeira revolução na taxonomia das bactérias e fungos (FIGUEIREDO, *et al.*, 2010). Com a descoberta da técnica de PCR houve uma revolução na pesquisa genética, essa técnica é baseada na síntese *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA pela ação da enzima DNA polimerase,

onde se permite a análise da variabilidade intra e interpopulacional com base em dados de marcadores moleculares, (OLIVEIRA, *et al.*, 2021; BERED, *et al.*, 1997).

A identificação dos microrganismos, é fundamental para a agricultura, e uma vez que os métodos convencionais dependem do isolamento, do cultivo em meios apropriados e da caracterização morfofisiológica e bioquímica, e mesmo assim em muitos casos, isso pode resultar na identificação errônea de isolados, por esses microrganismos serem passíveis de sofrer influência ambiental, a utilização de metodologias moleculares permite o estabelecimento de estratégias de identificação mais precisas e rápidas. (FIGUEIREDO, *et al.*, 2010), além de que o estudo da diversidade molecular entre as espécies ajudará na caracterização dos isolados com diferentes mecanismos de biocontrole e sua posterior implantação no manejo eficaz de fitopatógenos (RAI, *et al.*, 2016), e ainda segundo Oskiera *et al.*, (2017), análises genômicas comprovaram que diferentes linhagens de *Trichodermas* exercem seus efeitos benéficos por meio de mecanismos distintos em relação ao biocontrole, e que por isso foi sugerido que a aplicação de diferentes misturas de cepas poderiam melhorar a eficácia do biocontrole. Surgindo dessas misturas os produtos MIX que são mais eficazes mas por enquanto difíceis de se ter controle de qualidade.

Por ser muito difícil distinguir as diferentes cepas umas das outras, pois há altos níveis de variabilidade morfológica entre as espécies de *Trichoderma* em diferentes hospedeiros e regiões geográficas, e como as distinções morfológicas não são indicadores confiáveis do grau de divergência genética entre as espécies para a sua identificação, nos últimos anos várias técnicas moleculares foram usadas para diferenciar a sua população, (RAI *et al.*, 2016). Entre elas está o uso de marcadores moleculares.

Antes do surgimento dos marcadores moleculares, houve o uso de marcadores genéticos, o primeiro a surgir foi o marcador genético morfológico, depois vieram os marcadores genéticos bioquímicos como os terpenos e as isoenzimas, e as primeiras moléculas utilizadas foram os metabólitos secundários tais como as antocianinas e compostos fenólicos, (OLIVEIRA, *et al.*, 2021; TURCHETTO-ZOLET, *et al.*, 2017).

Polimorfismos de DNA surgem por causa de mutações, e o desenvolvimento de marcadores moleculares para a detecção e exploração desses polimorfismos é um avanço muito significativo no campo da biologia molecular, uma vez que esses marcadores localizados no DNA fornecem uma ilimitada fonte de informações ao

longo do genoma. Com o avanço das técnicas moleculares, os marcadores moleculares vêm sendo aperfeiçoados com algumas técnicas já apresentando modificações, havendo por isso vários tipos, com diferentes metodologias, princípios e aplicações, e a escolha do uso de um determinado tipo de marcador molecular irá depender dos tipos de recursos disponíveis, como recursos técnicos, financeiro, de equipamentos disponíveis em cada laboratório, além do organismo alvo e da complexidade apresentado pelo genoma deste, (TURCHETTO-ZOLET, *et al.*, 2017).

Os marcadores moleculares podem ser divididos em três categorias principais, os baseados em hibridização, em PCR e em sequenciamento. Também podem ser diferenciados conforme a herança alélica em dominantes ou codominantes (TURQUETTO-ZOLET, *et al.*, 2017).

3.7.1 Marcadores moleculares baseados por hibridização

Marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ou Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição, segundo Oliveira *et al.*, (2021), esses marcadores são baseados na digestão de todo o DNA das amostras com o uso de uma ou mais enzimas de restrição, e as pequenas frações obtidas são colocadas em eletroforese de gel de agarose ou poliacrilamina, depois de desnaturados essas frações são transferidas para uma membrana e uma sonda de fita simples, onde é hibridizada para se identificar os polimorfismos, sendo similar à técnica de Southern Blot. Esses marcadores também podem ser obtidos por meio de bibliotecas genômicas, (BERED *et al.*, 1997). Por meio de uma autorradiografia as sondas são detectadas e marcadas por elementos radioativos, atualmente são usadas sondas fluorescentes, essas marcas podem ser causada por substituição de nucleotídeos, rearranjo de DNA, inserção ou deleção, (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Uma das vantagens do uso dessa técnica [e que ela é codominante (OLIVEIRA *et al.*, 2021), possui alta consistência e repetibilidade (MILLACH, 1999). E desvantagens, essa técnica precisa de grande quantidade de DNA com alto grau de pureza (cerca 5 à 20 microgramas), e o uso de radioatividade, além disso precisa se ter conhecimento prévio da sequência estudada para se obter sondas específicas (OLIVEIRA *et al.*, 2021), além de ser uma técnica considerada elaborada, demorada

na obtenção de resultados, com custo relativamente alto, apresentando um grau de polimorfismo considerado de intermediário a baixo, (MILLACH, 1999).

Apesar de pouco usada em comparação com as técnicas baseadas em PCR, esta técnica foi precursora dos marcadores do tipo CAPS, (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), também conhecidos como PCR-RFLP, usados para detecções rápidas de polimorfismos em sequências conhecidas, (TURCHETTO-ZOLET, *et al.*, 2017).

Outra técnica por hibridização é os minissatélites ou locos VTNR, (Variable Number of Tandem Repeats) ou Repetições em Tandem de Regiões Variáveis, que são sequências repetitivas de DNA adjacentes em número variável, é uma técnica similar ao RFLP, variando apenas no tipo de sonda utilizado, possuindo as mesmas vantagens e desvantagens, exceto que os minissatélites apresentam um alto grau de polimorfismo (MILLACH, 1999).

3.7.2 Marcadores moleculares baseados por amplificação

A partir do surgimento da PCR, diferentes marcadores moleculares e técnicas foram surgindo, (TURCHETTO-ZOLET, *et al.*, 2017). A PCR esta baseada na amplificação enzimática de um fragmento de DNA flanqueado por dois primers hibridizados em fitas de DNA opostas, onde ciclos de desnaturação, anelamento dos primers e extensão do DNA resultam na amplificação do fragmento alvo, sendo esses primers oligonucleotídeos de até 20 ou 25 pb que servem de iniciadores para a síntese de DNA pela enzima Taq polimerase (BERED, *et al.*, 1997).

Técnica RAPD, (Random Amplified Polymorphic DNA), é uma técnica que faz uso de um único primer de aproximadamente 10 pb de uma sequência arbitrária (BERED, *et al.*, 1997; TURCHETTO-ZOLET, *et al.*, 2017), é a que apresenta menor custo, número de etapas, e menor tempo para a obtenção de resultados, sendo a mais fácil de implementar (MILLACH, 1999), requer pouca quantidade de DNA (15-25 ng), e consegue-se obter grande número de marcadores ao longo do genoma (TURCHETTO-ZOLET, *et al.*, 2017). Como desvantagens possui a baixa repetibilidade, e baixa consistência, além de ter um comportamento dominante. O grau de polimorfismo obtido varia dependendo da espécie em estudo (MILLACH, 1999).

Técnica ISSR, (Inter-simple sequence repeats) ou Repetição de Sequência Internas Simples, é uma técnica derivada da SSR, (Simple sequence repeats), e ela combina as vantagens da RAPD, como obter grande número de marcadores, mas com especificidade e reprodutibilidade maiores, uma vez que faz uso de um único primer mais longo com várias repetições para amplificação na PCR, não é necessário conhecimento prévio do alvo, possui comportamento dominante, e não possui etapas demoradas e caras (TURCHETTO-ZOLET, *et al.*, 2017).

Microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats) ou Repetição de Sequência Simples, essa técnica necessita de primers específicos, o que o torna um processo elaborado e caro, mas se os primers já estiverem disponíveis o seu custo se assemelha ao da técnica RAPD, com exceção do uso de géis de poliacrilamida (MILLACH, 1999). Os marcadores possuem curtas sequências de nucleotídeos (1-6) e necessitam de baixa quantidade de DNA para a amplificação por PCR, é multialélico permitindo a diferenciação entre homozigotos e heterozigotos, e por isso é considerado um marcador codominante, (OLIVEIRA, *et al.*, 2021). Pelos microssatélites serem abundantes no genoma, eles são fáceis de automatizar e são considerados, robustos e reprodutíveis, os padrões de polimorfismos apresentados são maiores do que qualquer outro marcador, e ainda com a maior disponibilidade de dados de sequências em domínio público, a identificação com o uso de SSR aliado com a utilização de bioinformática tornou esta técnica muito atrativa (TURCHETTO-ZOLET, *et al.*, 2017).

Marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) ou ASA (Amplified Specific Amplicon), também necessita de primers específicos já mapeados de sequências caracterizadas, muitos são obtidos da conversão de marcadores RAPD para SCAR podendo ocorrer a diminuição do nível de polimorfismo, é uma técnica que se assemelha com a de RAPD com a vantagem se der mais consistente, e a desvantagem de ter que desenvolver primers caso eles não estejam disponíveis o que pode elevar o custo da técnica (MILLACH, 1999).

Técnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados, é uma combinação das técnicas usadas em RFLP e RAPD, onde se combinam o uso de enzimas de restrição e amplificação por PCR, e assim como o RAPD, as AFLP estão presentes ao longo do genoma, serviu de base para metodologias de outros marcadores como os microssatélites e SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), (TURCHETTO-ZOLET, *et al.*,

2017). Essa técnica ocorre em quatro passos, o primeiro passo é a clivagem do DNA genômico, o segundo passo é a junção dos adaptadores com os fragmentos gerados na clivagem, o terceiro passo é a amplificação dos fragmentos por PCR, e o quarto passo é a divisão dos fragmentos em gel (OLIVEIRA, *et al.*, 2021). Esta é uma técnica que possui alta sensibilidade para detecção de variabilidade genética e é muito usada para caracterização, possui alto grau de polimorfismo, alto número de marcadores por gel analisado, sendo considerada a técnica mais elaborada e ainda é protegida por patente (MILLACH, 1999).

SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) ou Polimorfismo Amplificados Relacionados à Sequência, são marcadores dominantes, altamente polimórficos, onde se obtêm numerosas bandas com poucas combinações de primers, fazendo uso de dois primers de 17 ou 18 nucleotídeos, é uma técnica considerada reprodutível além de fácil de se implementar em laboratórios (SANDOVAL, *et al.*, 2019).

3.7.3 Marcadores moleculares baseados por sequenciamento

Os SNPs, (Single Nucleotide Polymorphism), ou Polimorfismo de base única, são polimorfismos específicos que ocorrem em uma única posição do genoma, em um único nucleotídeo por substituição, deleção ou inserção e a maioria ocorre em regiões não codificadoras. Essa técnica possui potencial para automatização de alto rendimento à custos moderados. Atualmente já é possível por causa do avanço tecnológico o sequenciamento de alto rendimento, possibilitando a identificação e genotipagem de SNP em um único passo (TURCHETTO-ZOLET, *et al.*, 2017).

Marcadores do tipo DarT (Diversity arrays technology), são marcadores por hibridização não muito populares, apesar de serem considerados confiáveis e robustos, usados para genotipar centenas de loci em um único ensaio, pois geram impressões digitais do genoma marcando presença versus ausência de fragmentos de DNA, e que nos últimos anos com o acréscimo de tecnologia NGS (Next Generation Sequencing ou Sequenciamento de Nova Geração), sendo renomeado como DarTseq, vem sendo usado em programas de melhoramento genético por sua eficiência (TURCHETTO-ZOLET, *et al.*, 2017).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Processo produtivo amostrado

A empresa está localizada no interior de São Paulo e possui duas fábricas, uma voltada para a produção de bioinsumos à base de fungos, e outra voltada a produção de bioinsumos à base de bactérias e fertilizantes. A empresa tem como missão oferecer ferramentas biotecnológicas para a agricultura e pecuária, proporcionando soluções sustentáveis, respeitando o meio ambiente, a legislação e as pessoas, e tem como visão ser referência em controle biológico e nutrição vegetal, através de pesquisa, tecnologia e produção de produtos de excelência.

E através da ciência está buscando novas formas de inovação em nossa cartela de produtos, esse ano há um novo projeto que é a criação de um novo bioinsumo à base de *Trichoderma*, mas esse produto terá a presença de três espécies de *Trichodermas* que são o *Trichoderma harzianum*, o *Trichoderma asperellum* e o *Trichoderma viride*, todos com inúmeros artigos publicados se referindo às suas qualidades como fungicida à fungos que causam doenças em culturas, como promovedor de crescimento de raízes, entre outras qualidades.

Com a criação desse produto, surge também toda uma nova gestão de processos voltados para a produção desse bioinsumo, e entre os processos necessários está o controle de qualidade desse novo projeto.

Ao se registrar esse produto no MAPA foi necessário declarar qual a sua composição, no caso, as três espécies de *Trichoderma* e quanto de cada um deles está presente na composição do produto e como já discutido anteriormente, o controle de qualidade de bioinsumos no Brasil, apresenta apenas algumas metodologias, não oficiais, como a determinação do número total de conídios, a determinação da quantidade de conídios viáveis e a determinação do número de unidades formadoras de colônias, e infelizmente nenhuma dessas técnicas serão aplicáveis no controle de qualidade desse novo produto, pois também como já discutido anteriormente nenhuma dessas metodologias de controle de qualidade poderá diferenciar um *Trichoderma* do outro. E como já visto em diversos artigos o *Trichoderma* é um fungo de difícil diferenciação por observação morfológica e fisiológica, tornando imprescindível o uso de técnicas moleculares para a especificação e para a determinação do número de conídios presente nas formulações.

4.2 Análise bibliográfica para a identificação molecular de diferentes espécies do gênero *Trichoderma spp* a partir de marcadores de DNA

O presente trabalho foi realizado por meio de coleta de dados de artigos que continham os primers necessários para caracterizar as três espécies de *Trichoderma*.

A busca por esses artigos foi realizada no site da Capes na base de dados do Web of Science, com os termos “molecular marker identification *Trichoderma harzianum*”, e após a mesma procura foi realizada para o *Trichoderma asperellum* e o *Trichoderma viride*. A pesquisa retornou um total de 32 artigos para a busca com o termo final “*trichoderma harzianum*”, um total de 7 artigos para o termo final “*trichoderma asperellum*”, e um total de 7 artigos para o termo final “*trichoderma viride*”. A avaliação foi realizada pela seleção dos artigos que apresentavam primers específicos para a identificação de uma das três espécies de interesse e as condições de PCR. Foram descartados os trabalhos que não apresentavam as informações, os que não permitiram a visualização e os duplicados (Tabela 1).

Tabela 1 - Seleção dos artigos usados na pesquisa mediante a apresentação de primers específicos para a identificação de cada espécie

	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Trichoderma viride</i>
Total de artigos	32	7	7
Exclusão (por falta de requisitos)	19	5	6
Exclusão (por falta de acesso)	4	1	0
Exclusão (por duplicata)	0	1	1
Inclusão (por atenderem as condições)	9	0	0

Fonte : Autoria própria (2022)

4.3 Seleção de trabalhos para diferenciação entre espécies de *Trichoderma*

Para organizar a proposta do procedimento de controle de qualidade molecular para *Trichoderma* foi realizada a seleção dos trabalhos obtidos para serem

replicados definindo os primers e as condições possíveis de serem aplicadas em uma reação multiplex.

Os dados foram organizados com as seguintes informações: autor, ano de publicação, primer apresentado, tamanho em pares de bases do primer e as condições usadas na PCR, para espécie de *Trichoderma*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Muitos autores descrevem que a caracterização morfológica de fungos do gênero *Trichoderma* não são conclusivas o suficiente para a identificação precisa das variantes deste gênero, e por este motivo o uso de técnicas moleculares é fundamental para diferenciar com precisão populações de *Trichoderma* (RAI *et al.*, 2016).

A eficácia do uso dos marcadores moleculares na identificação, caracterização, aplicação, e avaliação das relações genéticas entre eles e o meio que habitam são importantes para que os estudos sobre o uso do *Trichoderma* como agente de controle biológico possam ser mais refinados e específicos, podendo-se fazer uso desses marcadores no controle de qualidade de bioinsumos produzidos com duas ou mais espécies de *Trichoderma*.

Espera-se com esse trabalho a determinação de primers que possam ser usados em uma metodologia com técnicas de biologia molecular que possam identificar e quantificar os esporos de uma amostra, e que o procedimento seja mais vantajoso financeiramente que a compra de kits usados para tal finalidade.

A partir da pesquisa foi identificado um total de 46 artigos. Desses, 30 artigos foram descartados por não apresentarem os requisitos necessários como a presença de primers específicos para uma das espécies e as condições de PCR, 5 foram excluídos por não permitirem acesso ao artigo, e 2 foram encontrados em duplicatas, restando apenas 9 elegíveis para o presente trabalho. Desses 9 artigos, 7 apresentaram primers apenas para uma das espécies, 1 apresentou primers para duas das espécies e 1 apresentou primers para as 3 espécies. A maioria dos trabalhos contemplou a espécie *Trichoderma harzianum*, com menção nos 9 artigos, *Trichoderma viride* em 2, e *Trichoderma asperellum* em apenas 1.

5.1 Metodologias empregadas por autor

Nos trabalhos selecionados houve combinações de várias técnicas de análises e de produção de primers, para objetivos variados.

Bowen *et al.*, (1996), em seu artigo fez uso da análise RFLP, com sondas de hibridização produzidas por RAPD usando DNA de um isolado específico de

Trichoderma harzianum, e ele também fez uso de clonagem de produtos específicos da amplificação dos isolados, em plasmídeos de *Escherichia coli* que foram usados na análise RFLP. Foram produzidos 11 primers durante a PCR-RAPD com modelo baseado no DNA de *Trichoderma harzianum* C65 e iniciador RC12. Os produtos da PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose. O sinal de hibridização variou conforme os isolados usados, resultando em 6 sinais fortes e 6 sinais fracos permitindo a separação dos isolados usados em 2 grupos.

Cumagun *et al.*, (2006), teve como objetivo do seu estudo caracterizar 42 isolados de *Trichoderma* usando análises de UP-PCR, (reação em cadeia da polimerase universalmente iniciada), e rDNA-ITS1 além de identificar marcadores moleculares específicos para monitorar um isolado de *Trichoderma spp.*, em solo. O autor fez uso de marcadores RFLP nos fragmentos de ITS1 amplificado, usando a enzima de restrição (Sau3A), e repetiu o procedimento para UP-PCR, os primers UP foram usados individualmente ou em combinações de pares. O resultado revelou padrões de bandas ITS1 distintos entre esses 42 isolados, no qual corresponderam à 3 seções diferentes, seção A, B e C, sendo a C correspondente à *Trichoderma*, na qual havia apenas 2 isolados sendo um identificado como *Trichoderma viride* e o outro como *Trichoderma harzianum*.

Abd-elsalam *et al.*, (2010), o trabalho teve como objetivo a identificação de 7 isolados de *Trichoderma sp.* Fizeram uso de microssatélites (MP-PCR) e de DNA ribossomal (rDNA), onde a sequência central do microssatélite foi usado como primer. Também fizeram uso de clonagem e sequenciamento de marcadores ITS, usaram os marcadores com primer M13 (sequência central do fago M13), na pesquisa com ITS. Os isolados foram identificados por comparação da região intergênico ribossomal e das sequências espaçadoras entre 18S e 28S do rRNA, incluindo as regiões ITS1-5.8SrRNA-ITS2. Para a identificação da sequência fizeram uso do programa TrichOKEY versão 2.0 para a identificação a nível de espécie, e para a similaridade de sequências fizeram uso do banco de dados TrichoBLAST (em silico), onde a análise dividiu os isolados em 2 grupos.

Pérez *et al.*, (2014), o estudo teve como objetivo o desenvolvimento de marcadores moleculares (SCAR), através de ensaio RAPD para monitorar a colonização e o crescimento de *T. harzianum*. Para as análises de RAPD foram usados 16 primers arbitrários de 10-mer, que após amplificação um deles, o primer OPX-02, gerou uma banda de interesse, essa banda foi excisada em gel e purificada

com o uso de kits e depois foi ligada a um vetor, onde depois foram transformadas em *E. coli*. Cinco transformantes foram selecionados, e o inserto foi recuperado com o uso dos primers M13F e M13R. Esse inserto foi amplificado, sequenciado e editado e o resultado foi avaliado usando-se BLAST-n para se determinar se a sequência estava presente no banco de dados da NCBI, e um BLAST com a sequência do genoma de *T. harzianum* disponível na página do DOE Joint Genome Institute foi usado para se determinar o número de cópias do marcador SCAR. Os primers SCAR foram desenhados a partir da sequência resultante onde foram projetados usando-se a ferramenta NCBI primer-BLAST, Primer3, cinco primers foram criados, sendo 2 forward (2F1 e 2F2) e três reversos (2R1, 2R2 e 2R3), por meio de avaliação *in silico* dos primers foram determinadas várias informações, esses primers foram avaliados em 22 amostras de DNA de *Trichoderma* de 5 espécies diferentes, e conseguiu detectar o *T. harzianum* mesmo quando a amostra estava misturada com outras espécies de *Trichoderma spp.*

Abbasi *et al.*, (2016), o objetivo desse trabalho era a produção de mutantes com mais esporulação em relação ao *Trichoderma* selvagem, e avaliação das diferenças genéticas fazendo uso de marcadores moleculares. Fizeram uso de marcadores RAPD e rep-PCR, (PCR em sequências palindrômicas extragênicas repetidas), que é um método de impressão digital genômica que faz uso de primers de DNA correspondentes a elementos repetitivos intercalados, que ocorre naturalmente em bactérias como REP, ERIC e BOX e são muito usados para diversidade genética em fungos e bactérias. A análise RAPD, marcadores de regiões amplificadas caracterizadas por sequência (SCAR), seguidas por PCR em tempo real, identificou os isolados, separando os selvagens dos mutantes e a rep-PCR categorizou os isolados mutantes e selvagens de acordo com seus antagonismos. Os produtos resultantes foram analisados em gel de agarose, as bandas foram visualizadas em transluminador UV e os dados foram analisados no software MVSP. No total foram obtidos 115 mutantes e 24 foram selecionados para ser amplificados por RAPD. As análises dos amplicons usando 5 iniciadores aleatórios revelou diversidade genética significativa entre mutantes e selvagens, revelando que a mutação gama induziu alterações genéticas nos mutantes.

Hirpara *et al.*, (2016), o objetivo desse trabalho foi a avaliação de 11 isolados de *Trichoderma sp.*, em relação ao seu biocontrole contra o agente causal da podridão do caule do amendoim, *Sclerotium rolfsii*, com ênfase na avaliação da diversidade

molecular associada à atividade antagonista. A amplificação foi feita pelo método de PCR-SRAP com 256 combinações de primers, usando-se 16 primers SRAP forward e 16 primers SRAP reverse que foram rastreados com o uso de uma cepa de *Trichoderma*, resultando em 141 combinações de primers com amplificação positiva, nos quais foram usadas para as análises 115 combinações de primers que geraram um total de 1328 produtos amplificados, sendo que 1095 são polimórficos compartilhados e 199 são únicos. O primer SRAP-22 foi o primer que produziu o maior número de bandas, 21 bandas, enquanto o primer SRAP-15 foi o que produziu menos com a presença de apenas uma banda. Com base nas informações dos primers SRAP, os autores concluíram que os primers mais informativos para o DNA genômico das cepas de *Trichoderma* usados foram os primers SRAP-22 e SRAP-242, e o primer SRAP-26 foi o primer que amplificou as bandas específicas que diagnosticou os melhores antagonistas.

Rai *et al.*, (2016), nesse estudo os autores fizeram uso de microssatélites por serem considerados ideais para rastrear, caracterizar e avaliar a diversidade genética de várias espécies de fungos. Fizeram uso de sequências genômicas expressas e inteiras disponíveis em banco de dados públicos como o Joint Genome Institute, (*T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. reesei* e *T. virens*), e do NCBI, (*T. asperellum*), para informações sobre a ocorrência, a abundância relativa e a densidade relativa dessas espécies de *Trichodermas*. Fizeram uso de 15 locos SSRs, e produziram 18 conjuntos de primers, dos quais 15 apresentaram amplificação bem sucedida em todas as espécies do teste, nos quais 24 alelos foram detectados e dentre estes 5 loci foram altamente informativos sobre polimorfismos. ESTs foram criados (Expressed Sequence Tags – etiquetas de sequências expressas) e essas informações também foram baixadas de bancos de dados públicos. Para o estudo dos dados fizeram uso do software WebSat, e os primers foram projetados usando o software online PRIMER3. Os EST-SSRs desenvolvidos resultaram em aproximadamente 83% de amplificação.

Oskiera *et al.*, (2017), o objetivo do estudo desses autores foi o monitoramento da população, com detecção e quantificação, de *T. atroviride* e *T. harzianum* aplicados como biopreparação no solo de cultivo de alface, fizeram uso de 4 linhagens no total sendo 2 linhagens para cada espécie, essas espécies já estavam classificadas molecularmente por DNA barcoding, com base nas sequências ITS1 e ITS2 dos genes rRNA, e na sequência dos fatores de alongamento da tradução 1 alfa (*tef 1*), quitinase

18-5 (*chi18-5*), e gene da subunidade II da polimerase de RNA (*rpb2*). As técnicas empregadas para a detecção de *Trichoderma* foram por multiplex-PCR, rep-PCR e sequenciamento de *tef1*. Novos primers foram produzidos e combinados na multiplex-PCR para detectar a presença de *Trichoderma* no solo, os primers produzidos foram ERIC1R, ERIC2, BOXA1R, REP1R-I e REP2-I, para produzir esses primers os autores fizeram uso de sequências previamente descritas nas literaturas, (como de ITS1 e ITS2, *tef1*, *rpb2*, *chi18-5*, SCAR Bo7, Qo1e X18), foram mapeadas as sequências do genoma do *Trichoderma* disponíveis publicamente, e após as sequências serem alinhadas, regiões exclusivas de *T. harzianum* e *T. atroviride* foram identificadas e usadas para a produção dos primers de PCR, estes foram produzidos com o uso de CLC Genomics Workbench 7.5, e todos os primers foram sintetizados na Genomed AS em Varsóvia, Polônia. Os primers foram testados quanto à amplificação e os melhores foram validados quanto à especificidade por PCR. A multiplex-PCR, foi desenvolvida com uma combinação de primers específicos para cada espécie de *Trichoderma* e com primers universais de controle fúngicos como o ITS.

Lee *et al.*, (2020), o objetivo desses autores era a produção de um primer para detecção rápida de *Trichoderma spp*, que estavam contaminando plantações de cogumelos comestíveis da espécie *Pleurotus eryngii*. Nesse estudo foram usadas 11 espécies de *Trichoderma*. Os primers foram desenvolvidos com base na amplificação de ITS1 e ITS2 e *tef1*, as bandas específicas foram cortadas e sequenciadas, para cada reação pelo menos 3 genes foram sequenciados bidirecionalmente. As sequências ITS e *tef1* foram identificadas usando TrichO KEY2 e Tricho BLAST em combinação com o NCBI-BLAST. Várias sequências de ITS de *Trichoderma* foram recuperadas do GenBank para projetar os primers específicos para amplificar apenas *Trichoderma spp* e não os do cogumelo comestível *P. eryngii*. Os primers desenvolvidos foram o TDP-F e o TDP-R, e eles foram testados *in silico* com outras espécies fúngicas usando o software FastPCR. O uso desses primers detectou apenas *Trichodermas*, demonstrando a especificidade da detecção da presença desses em meio do cultivo de cogumelos comestíveis.

Conforme mencionado anteriormente nem todos os trabalhos tinham a intenção de identificar as espécies e caracterizar os isolados de *Trichoderma*, alguns tinham como objetivo apenas um marcador para diferenciar *Trichoderma spp.*, de outros gêneros de fungos que foi o caso do trabalho de Lee *et al.*, (2020), outros como (Pérez *et al.*, 2014; Cumagun *et al.*, 2006; Abbasi *et al.*, 2016; Rai *et al.*, 2016 e Hirpara

et al.,2016), conseguiram identificar e diferenciar os *Trichodermas* usados em seus trabalhos por espécies, e alguns conseguiram na mesma espécie diferenciá-los em cepas.

5.2 Primers *Trichoderma harzianum*

Na tabela 2 estão listados um total de 177 primers usados na identificação de *Trichoderma harzianum* que se resume a autor, ano de publicação e quantidade de primers descritos nos trabalhos.

Tabela 2 - Autor, ano, tipo e quantidade de primers descritos para *Trichoderma harzianum*

Autor	Ano	Tipo de primers	Quantidade de primers
Bowen <i>et al.</i>	1996	RFLP/RAPD (hibridização/amplificação)	01
Cumagum <i>et al.</i>	2000	RFLP (hibridização)	10
Abd-Elsalam <i>et al.</i>	2010	SSR (amplificação)	01
Pérez <i>et al.</i>	2014	SCAR/RAPD (amplificação)	05
Abbasi <i>et al.</i>	2016	SCAR/RAPD (amplificação)	10
Hirpara <i>et al.</i>	2016	SRAP (smplificação)	132
Rai <i>et al.</i>	2016	SSR (amplificação)	10
Oskiera <i>et al.</i>	2017	-	06
Lee <i>et al.</i>	2020	-	02
Total de Primers			177

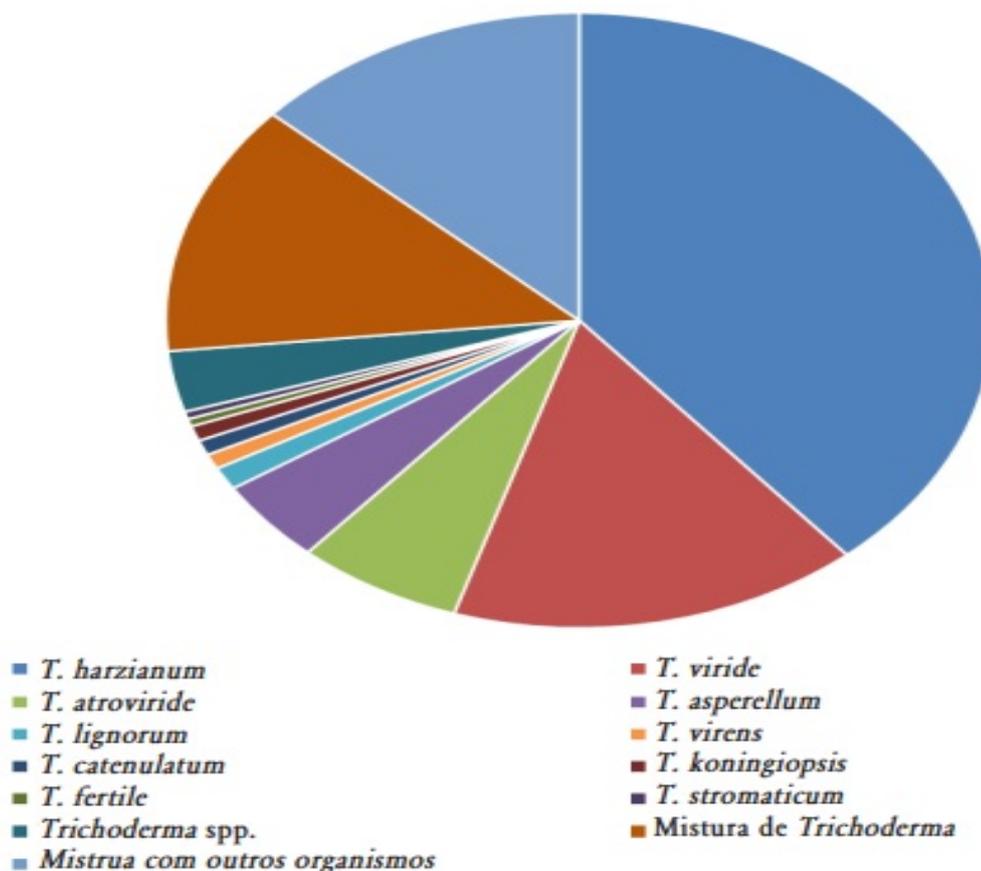
Fonte: Autoria própria (2022)

No quadro 4 em anexos, estão descritos os primers selecionados, por autor, ano de publicação, primers, pares de bases e condições de PCR para *Trichoderma harzianum*.

O Clado Harzianum é a morfo-espécie mais usada no controle biológico pois são as espécies com maior predominância em estudos de diversidade de espécies no solo e nos restos vegetais encontrados ao longo de várias regiões geográficas ao redor do mundo, por apresentarem facilidade de isolamento em meio artificial, por serem ótimos competidores no solo, por resistirem às drásticas variações ambientais e por apresentarem múltiplos mecanismos contra os fitopatógenos, (MEYER *et al.*, 2019). E por apresentarem essas características os bioinsumos à base de *T. harzianum* é a mais comercializada mundialmente, constituindo 38,8% dos produtos que contêm somente *Trichoderma*, 50% dos bioinsumos onde há misturas de espécies de *Trichoderma* e de 60% considerando todos os bioinsumos que tenham a presença de

Trichoderma misturados com outros fungos, bactérias os micorrizas, (gráfico 1), (MEYER *et al.*, 2019).

Gráfico 1 - Porcentagem de bioinsumos à base de cada espécie de *Trichoderma* comercializada



Fonte: Meyer *et al.*, (2019)

5.3 Primers *Trichoderma asperellum*

Na tabela 3 estão listados um total de 16 primers usados na identificação de *Trichoderma asperellum* que se resume a apenas um autor, ano de publicação e quantidade de primers descritos nos trabalhos.

Tabela 3 - Autor, ano e quantidade de primers descritos para *Trichoderma asperellum*

Autor	Ano	Quantidade de primers
Rai et al.	2016	16
Total de Primers		16

Fonte: Autorial própria (2022)

Para o fungo *T. asperellum* o número de trabalhos encontrados foi reduzido, e apenas o trabalho do autor Rai *et al.*, (2016) apresentou primers para esta espécie sendo no total 16 primers pela metodologia de microssatélites. Os microssatélites são marcadores moleculares codominantes, que fazem uso de curtas sequências de nucleotídeos e como descrito anteriormente possuem vantagens e desvantagens no seu uso, como possuir alto nível de polimorfismo, grande potencial de automação, e necessidade de baixas quantidades de DNA para iniciar a amplificação em PCR, e as desvantagens seriam ainda uma grande limitação no isolamento e no desenvolvimento de primers específicos para cada espécie estudada (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Como já descrito anteriormente o *T. asperellum* faz parte do Clado Viride, Subclado Hamatum, onde está presente também a espécie *T. asperelloides*, são espécies filogenéticas irmãs, com mesma morfologia mas com padrões moleculares e fisiológicos distintos, são consideradas micoparasitas agressivos e comuns em solos neutrópicos, no mercado mundial cerca de 4,4% dos bioinsumos são produzidos com este fungo, (gráfico 1), (MEYER *et al.*, 2019).

No quadro 2 estão presentes os primers selecionados à partir do trabalho de Rai *et al.*, (2016).

Quadro 2 - Marcadores microssatélites para *Trichoderma asperellum* a partir do trabalho de Rai *et al.*, (2016)

Autor	Primer	pb	Condições da PCR
Rai, et al., (2016)	TvSSR 1 – (5' – CTA TGG TGC CTC TGG TCT TTT C – 3') (5' – GAT GTT GGA CTT GTA ACC ACC C -3')	400- 500	Desnaturação à 95°C por 3 min., seguido de 5 ciclos de 94°C por 20s, de 58°C por 20s e de 72°C por 30s, depois são 40 ciclos de desnaturação à 94°C por 20s, anelamento à 57°C por 20s e extensão à 72°C por 20s, e uma extensão final à 72°C por 20 min.
	TvSSR 4 – (5' – CCC CTT TAC GAG GAG ATA CGA T – 3') (5' – GAG AGA GAA GAA GCG AAA GCA C – 3')	190- 250	Como descrito anteriormente.
	TvSSR 5 – (5' – GGA TCG GCA AGG AAT ATA AAC A – 3') (5' – CAA CTT CCA TAA AGA CCG AAG C – 3')	200- 290	Como descrito anteriormente.
	ThSSR1 – (5' – GCG ATT GAG AGG AAC GAA CT – 3')	190- 230	Como descrito anteriormente.

(5' – AAT CAA GTG AGG ATT TGC TGC T – 3')		
ThSSR2 – (5' – CAA TCC GGC TCT ACC TAC TCT C – 3') (5' – ATA TTG GCT TTA TTC GTC GTG G – 3')	500- 600	Como descrito anteriormente.
ThSSR4 – (5' – GTC GTC GGC CAT CAT TCC – 3') (5' – TTT CAA GGG CAG GAC TCT CTC T – 3')	150- 300	Como descrito anteriormente.
ThSSR5 – (5' – AGA CGC AGA TGA AAA GGA GC – 3') (5' – GTG GAC CTG AGC TTT GAT TGT T – 3')	450- 500	Como descrito anteriormente.
ThSSR6 – (5' – GCG AAT GTC ACC ATC ATC TTC – 3') (5' – TGA GAG AGC CGG AGT ATA GGA G – 3')	360- 400	Como descrito anteriormente.

Fonte: Autoria própria (2022)

5.4 Primers *Trichoderma viride*

Na tabela 4 estão listados um total de 66 primers usados na identificação de *Trichoderma viride* que se resume a apenas dois autores, ano de publicação e quantidade de primers descritos nos trabalhos.

Para o *T. viride* apenas dois trabalhos apresentaram primers, novamente o autor Rai *et al.*, (2016), que fez uso de microssatélites (SSR), e o autor Hirpara *et al.*, (2016), que fez uso SRAPs. Enquanto os SSRs são considerados codominantes os SRAPs são considerados dominantes, e uma técnica simples, barata e eficaz na produção de fragmentos de todo o genoma com alta reprodutibilidade e versatilidade. Enquanto os SSRs possuem primers formados por sequências de 1 a 6 nucleotídeos, e são considerados como uma técnica robusta e com grande capacidade de automação, ela ainda possui algumas dificuldades como a determinação de primers específicos, enquanto que os primers SRAPs possuem de 17 a 18 nucleotídeos que consistem em sequências centrais de 13 a 14 nucleotídeos, sendo as primeiras 10 a 11 bases da extremidade 5' de “preenchimento” sem uma constituição específica, seguidas por sequências CCGG- quando forem um primer forward ou de -AATT quando forem primers reversos. Esses primers demonstraram a capacidade de elucidação de variações genéticas em vários níveis taxonômicos e por isso são frequentemente usados na construção de mapas de ligação e identificação de loci de características quantitativas. Esse sistema é muito usado para o melhoramento de

culturas, e pode ser aplicado a diversos campos como o de sistemática, conservação, biogeografia e ecologia (ROBARTS; WOLFE, 2014).

Tabela 4 - Autor, ano e quantidade de primers descritos para *Trichoderma viride*

Autor	Ano	Quantidade de primers.
Hirpara <i>et al.</i>	2016	46
Rai <i>et al.</i>	2016	20
Total de Primers		66

Fonte: Autoria própria (2022)

A espécie *T. viride* faz parte do Clado Viride, este está subdividido em outros subclados, e por isso esse clado é composto por dezenas de outras espécies com diferentes padrões de morfologia, moleculares e fisiológicos. A espécie *T. viride* é considerada comum no hemisfério norte, em relação a produção de bioinsumos *T. viride* ocupa a segunda posição de fungo mais usado com 16,1%, (gráfico 1), (MEYER *et al.*, 2019). No quadro 3 estão os primers selecionados por autor, primer, número de bases e condições de PCR, para *T. viride*.

Quadro 3 - Autor, Ano de publicação, Primers, Número de bases e Condições da PCR, para *Trichoderma viride*

Autor	Primer	pb	Condições da PCR
Hirpara <i>et al.</i> , (2016)	SRAP – 81 - me 6 F – (5' TGAGTCCAAACCGGACA – 3') Em 1 R – (5' GACTGCGTACGAATTAAT – 3')	143	96°C por 4 min., 5 ciclos de 1 min à 94°C; 1.15 min à 35°C e 2 min. à 72°C. depois 30 ciclos de 1 min. à 94 °C; 1.15 min. à 50°C e 2 min. à 72°C, com extensão final de 10 min. à 72°C.
	SRAP – 165 - me 11 F – (5' TGAGTCCAAACCGGAAC – 3') em 5 R – (5' - GACTGCGTACGAATTAAC – 3')	593	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 244 - me 16 F – (5' TGAGTCCAAACCGGATT – 3') em 4 R – (5' – GACTGCGTACGAATTTGA – 3')	2904	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 246 - me 16 F – (5' TGAGTCCAAACCGGATT – 3')	2778	Como descrito anteriormente.

	em 6 R – (5' – GACTGCGTACGAATTGCA – 3')			
	SRAP – 255 - me 16 F – (5' – TGAGTCCAAACCGGATT – 3')	2918-389	Como anteriormente.	descrito
	em 15 R – (5' – GACTGCGTACGAATTGAT – 3')			
	SRAP – 256 - me 16 F – (5' – TGAGTCCAAACCGGATT – 3')	2158	Como anteriormente.	descrito
	em 16 R – (5' – GACTGCGTACGAATTGTC – 3')			
	SRAP – 26 - me 2 F – (5' – TGAGTCCAAACCGGAGC – 3')	1709	Como anteriormente.	descrito
	em 10 R – (5' – GACTGCGTACGAATTC – 3')			
	SRAP – 42 - me 3 F – (5' – TGAGTCCAAACCGGAA – 3')	240	Como anteriormente.	descrito
	em 10 R – (5' – GACTGCGTACGAATTC – 3')			
	SRAP – 63 - me 4 F – (5' – TGAGTCCAAACCGGAC – 3')	1038 – 744	Como anteriormente.	descrito
	em 15 R – (5' – GACTGCGTACGAATTGAT – 3')	432		
	SRAP – 72 - me 5 F – (5' – TGAGTCCAAACCGGAA – 3')	564	Como anteriormente.	descrito
	em 8 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCAC – 3')			
Hirpara et al. (2016)	SRAP – 76 - me 5 F – (5' – TGAGTCCAAACCGGAA – 3')	147	Como anteriormente.	descrito
	em 12 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCTC – 3')			
	SRAP – 81 - me 6 F – (5' – TGAGTCCAAACCGGACA – 3')	572 – 172	Como anteriormente.	descrito
	em 1 R – (5' – GACTGCGTACGAATTAAT – 3')	100		
	SRAP – 133 - me 9 F – (5' – TGAGTCCAAACCGGAGG – 3')	172	Como anteriormente.	descrito
	em 5 R – (5' – GACTGCGTACGAATTAAC – 3')			
	SRAP – 165 - me 11 F – (5' – TGAGTCCAAACCGGAAC – 3')	40	Como anteriormente.	descrito

	em 5 R – (5' - GACTGCGTACGAATTAAC – 3')		
	SRAP – 167 - me 11 F – (5' – 3237 TGAGTCCAAACCGGAAC – 3') em 7 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCCA – 3')	Como anteriormente.	descrito
	SRAP – 185 - me 12 F – (5' - 345 TGAGTCCAAACCGGAGA – 3') em 9 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCAG – 3')	Como anteriormente.	descrito
	SRAP – 200 - me 13 F – (5' - 116 TGAGTCCAAACCGGAGT – 3') em 8 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCAC – 3')	Como anteriormente.	descrito
	SRAP – 202 - me 13 F – (5' - 155 TGAGTCCAAACCGGAGT – 3') em 10 R – (5' – GACTGCGTACGAATTC – 3')	Como anteriormente.	descrito
	SRAP – 218 - me 14 F – (5' – 394 TGAGTCCAAACCGGATG – 3') em 10 R – (5' – GACTGCGTACGAATTC – 3')	Como anteriormente.	descrito
	SRAP – 233 - me 15 F – (5' - 462 TGAGTCCAAACCGGATC – 3') em 9 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCAG – 3')	Como anteriormente.	descrito
	SRAP – 236 - me 15 F – (5' - 535 TGAGTCCAAACCGGATC – 3') em 12 R – (5' - GACTGCGTACGAATTCTC – 3')	Como anteriormente.	descrito
	SRAP – 244 - me 16 F – (5' – 356 TGAGTCCAAACCGGATT – 3') em 4 R – (5' – GACTGCGTACGAATTTGA – 3')	Como anteriormente.	descrito
	SRAP – 255 - me 16 F – (5' – 456 TGAGTCCAAACCGGATT – 3') em 15 R – (5' – GACTGCGTACGAATTGAT – 3')	Como anteriormente.	descrito
Rai, et al. (2016)	TvSSR 1 – (5' – CTA TGG TGC CTC TGG TCT TTT C – 3')	Desnaturação à 95°C por 3 min., seguido de 5 ciclos de	

(5' – GAT GTT GGA CTT GTA ACC C -3')			94°C por 20s, de 58°C por 20s e de 72°C por 30s, depois são 40 ciclos de desnaturação à 94°C por 20s, anelamento à 57°C por 20s e extensão à 72°C por 20s, e uma extensão final à 72°C por 20 min.
TvSSR 4 – (5' – CCC CTT TAC GAG GAG ATA CGA T – 3') (5' – GAG AGA GAA GAA GCG AAA GCA C – 3')	190-250	Como anteriormente.	descrito
TvSSR 5 – (5' – GGA TCG GCA AGG AAT ATA AAC A – 3') (5' – CAA CTT CCA TAA AGA CCG AAG C – 3')	200-290	Como anteriormente.	descrito
ThSSR1 – (5' – GCG ATT GAG AGG AAC GAA CT – 3') (5' – AAT CAA GTG AGG ATT TGC TGC T – 3')	190-230	Como anteriormente.	descrito
ThSSR2 – (5' – CAA TCC GGC TCT ACC TAC TCT C – 3') (5' – ATA TTG GCT TTA TTC GTC GTG G – 3')	500-600	Como anteriormente.	descrito
ThSSR4 – (5' – GTC GTC GGC CAT CAT TCC – 3') (5' – TTT CAA GGG CAG GAC TCT CTC T – 3')	150-300	Como anteriormente.	descrito
ThSSR5 – (5' – AGA CGC AGA TGA AAA GGA GC – 3') (5' – GTG GAC CTG AGC TTT GAT TGT T – 3')	450-500	Como anteriormente.	descrito
ThSSR6 – (5' – GCG AAT GTC ACC ATC ATC TTC – 3') (5' – TGA GAG AGC CGG AGT ATA GGA G – 3')	360-400	Como anteriormente.	descrito
TaSSR1 – (5' – AAG CGG TCA GTT GAA AGT AAC G – 3') (5' – AAG GGT TTT GCT TGT CCA GAT A – 3')	180-250	Como anteriormente.	descrito

TaSSR4 – (5' – CTT GAC CTG CTA CAA CAA CTG C – 3')	400-500	Como anteriormente.	descrito
(5' – TGT CCA TCT CTC TCT CTC TTC TCA – 3')			

Fonte: Autoria própria (2022)

5.5 Seleção de primers para diferenciação entre espécies de *Trichoderma*

Entre todas as técnicas apresentadas neste trabalho as técnicas dos autores Rai *et al.*, (2016); Abd-Elsalam *et al.*, (2010); Pérez *et al.*, (2014); e Oskiera *et al.*, (2017), foram as que tinham como objetivo avaliar a diversidade genética dos isolados, e portanto foram esses trabalhos que apresentaram diferenciação entre as espécies de *Trichoderma* spp. E entre esses autores o trabalho do Oskiera *et al.*, (2017), é o que possui a proposta de maior viabilidade de implantação para uma proposta de controle de qualidade, pois o autor faz uso de uma metodologia onde a análise é por reação multiplex, utilizou sequências disponibilizadas em bancos genéticos, utilizou várias sequências como ITS1, ITS2, tef1, rpb2 e chi18-5 para se chegar a diferenciação das espécies e fez uso de programas para desenhar os primers, além dos primers terem sido sintetizados por uma empresa externa.

5.6 Organização de procedimento padrão para implantar processo de controle de qualidade de bioinsumos com dois ou mais espécies

O procedimento padrão será estabelecido conforme a viabilidade das metodologias apresentadas anteriormente, e atualmente a empresa investiu na criação de um laboratório de biologia molecular, onde está disponível alguns insumos, equipamentos como vórtex, centrífuga e pipetas e a aquisição de um RT-PCR da Qiagen o Qiaquant 96. Esse equipamento realiza o método real time PCR, onde utiliza primers marcados por compostos fluorescentes, e nos leitores de fluorescência esses sinais são convertidos em dados numéricos, informando a quantidade de DNA que está se formando na reação e se ligando ao primer com o fluoróforo e emitindo uma fluorescência com um determinado comprimento de onda, esses resultados são apresentados na forma de gráficos, e por ser um equipamento de RT-PCR real time, conseguimos monitorar a reação de forma contínua, analisando os dados durante o

processo. Esses dados são quantitativos, pois os resultados das fluorescências são convertidos em dados numéricos e são também qualitativos pois nos informa a presença ou a ausência do alvo, em caso de presença haverá a amplificação do alvo com a emissão da fluorescência, formação de gráfico e conversão deste em dados numéricos, no caso de ausência não haverá amplificação do alvo.

Conforme discutido anteriormente a metodologia apresentada no trabalho de Oskiera *et al.*, (2017), seria a metodologia que melhor atende a proposta de controle de qualidade, pois o trabalho conseguiu diferenciar as espécies de *Trichoderma* spp, fazendo uso do procedimento de PCR multiplex, onde mais de um segmento genômico pode ser amplificado em uma única reação, cada segmento com seu par de primers específico, os autores também fizeram uso de diferentes sequências do genoma para garantir maior especificidade, e a maioria dessas sequências estão disponíveis em bancos genéticos, fizeram uso de programas para mapear e alinhar os genomas, para desenhar os primers e também para avaliar a amplificação, e sintetizaram os primers em uma empresa externa.

Mediante todas as possibilidades que a metodologia de Oskiera *et al.*, (2017) pode proporcionar, estes autores apresentaram primers apenas para a espécie de *T. harzianum*, sendo necessário testar esses primers com o alvo presente na empresa para se avaliar se haverá amplificação ou se haverá a necessidade de se adicionar mais sequências, ou talvez até a troca por outros primers. Além disso para as outras duas espécies, *T. asperellum* e *T. viride*, teriam que passar pelas mesmas avaliações e seus primers teriam que ser retirados dos outros trabalhos, como no caso de *T. asperellum* que foi mencionado em apenas um trabalho, o do autor Rai *et al.*, (2016), com a presença de 16 primers, podendo estes não serem suficientes para a identificação da linhagem presente na empresa, necessitando de reajustes para que possa ser amplificado, o mesmo ocorrendo com o *T. viride*. Além disso esse primers já teriam que ser modificados, pois é de interesse da empresa obter resultados de amplificação e conseqüentemente resultados de quantificação somente de esporos viáveis, por isso seriam necessárias novas pesquisas que identificassem sequências que estão ativas em esporos viáveis, para poder sintetizar primers que possam diferenciá-los dos esporos inativos, podendo até ter uma quantificação de esporos totais na ausência desse primer, e uma quantificação de esporos viáveis na presença deste, podendo se ter um resultado de esporos ativos versus esporos totais por espécie.

Esses testes de identificação e quantificação dos esporos seriam aplicados no produto final, para se comprovar que o mesmo possui as quantidades de esporos viáveis descritos na bula, garantindo assim a qualidade do produto para a distribuição e venda. Esses testes também seriam aplicados nos lotes armazenados para testes de shelf life, com o intuito de monitoração da quantidade de esporos viáveis, e da qualidade do armazenamento dos lotes ao longo do seu tempo de validade.

Algumas das dificuldades encontradas para a realização desse trabalho foram a quase inexistência de trabalhos que abordem o controle de qualidade de produtos à base de microrganismos, e de trabalhos que abordem o controle de qualidade com o uso de metodologias moleculares, sinalizando que há um campo muito vasto para ser explorado e pesquisado.

Devido a pouca oferta de primers para as espécies de *T. asperellum* e *T. viride*, ficou claro que há a necessidade de mais pesquisas e testes para a determinação de primers mais específicos para a identificação e para a caracterização dos mesmos, entre elas a inclusão de sequências que indiquem a viabilidade dos esporos. A pouca oferta de primers para essas duas espécies em comparação com a quantidade de primers encontrados para *T. harzianum* se deve provavelmente a grande quantidade de produtos produzidos com este fungo, e isso ocorre por vários motivos como serem ótimos competidores no solo em relação as outras espécies, por apresentarem múltiplos mecanismos de defesas contra fitopatógenos, por serem encontrados em maiores quantidades no solo, e por estarem presentes em várias regiões geográficas ao redor do mundo, sinalizando com isso que são resistentes aa variações drásticas de temperatura, entre outras características.

Para a implantação de uma metodologia de controle de qualidade molecular na empresa serão necessárias várias pesquisas e testes, como a criação de protocolos de busca, mapeamento e alinhamento das sequências; busca, testes e alinhamento de programas que desenhem os primers; busca e cotação de serviços das empresas que possam sintetizar os primers; busca e pesquisa por programas que possam reunir, analisar e armazenar os dados numéricos obtidos pela RT-PCR; além de precisarmos mapear todo o processo de montagem do controle de qualidade molecular, para que possamos planejar uma metodologia de validação para o protocolo de controle de qualidade molecular de bioinsumos à base de *Trichoderma* spp., e futuramente estender esta proposta para os bioinsumos produzidos à partir de outros microrganismos.

Esse trabalho é relevante por trazer informações sobre questões de controle de qualidade e sobre controle de qualidade molecular, ambos voltados para o controle de qualidade de bioinsumos produzidos à base de microrganismos, uma área pouco explorada até o momento, sendo de conhecimento apenas algumas metodologias, como o da Qualibio da Embrapa que ainda não são consideradas metodologias oficiais, podendo-se considerar quase inexistentes trabalhos e protocolos para o controle de qualidade molecular, sinalizando com isso uma área vasta que carece de pesquisa, testes e investimento.

6 CONCLUSÃO

Uma das metodologias mais promissoras foi o uso de sequências de primers SCARs e PCR multiplex, que se mostrou eficiente na identificação das espécies e por adotar o uso de programas e softwares na produção dos primers gerou também economia de recursos financeiros.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, S.; SAFAIE, N.; SHAMS-BAKUSH, M.; SHAMBAZI, S. Biocontrol activities of gamma induced mutants of *Trichoderma harzianum* against some soilborne fungal pathogens and their DNA fingerprinting. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 14, n.4, p. 260-269, 2016.
- ABD-ELSALAM, K. A.; ALMOHIMEED, I.; MOSLEM, M. A.; BAHKALI, A. H. M-13 microsatellite PCR and rDNA sequence markers for identification of *Trichoderma* (Hypocreaceae) species in Saudi Arabian soil. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 4, p. 2016-2024, 2010.
- ADELL, C. C. **Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (Hypocreales-Fungi), mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências do Campo de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, p. 220, 2004.
- ALKOORANEE, J. T.; YIN, Y. T.; ALEDAN, T. R.; JIANG, Y. F.; LU, G. Y.; WU, J. S.; LI, M. T. Systemic resistance to powdery mildew in *Brassica napus* (AACC) and *Raphanus alboglabra* (RRCC) by *Trichoderma harzianum* TH12. **Plos One**, v. 10, n. 11, nov. 2015.
- BERED, F.; NETO, J. F. B.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, v. 27, n. 3, p. 513-520, 1997.
- BOWEN, J. K.; FRANICEVIC, S. C.; CROWHURST, R. N.; TEMPLETON, M. D.; STEWART, A. Differentiation of a specific *Trichoderma* biological control agente by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 24, p. 207-217, 1996.
- BUSTAMANTE, D. E.; CALDERON, M. S.; LEIVA, S.; MENDOZA, J. E.; ARCE, M.; OLIVA, M. Three new species of *Trichoderma* in the *harzianum* and *longibrachiatum* lineages from *Peruvian cacao* crop soils based on integrative approach. **Mycologia**, v. 113, n. 5, p. 1056-1072, jun. 2021.
- CHAVES, C. D. Controle de qualidade no laboratório de análises clínicas. **Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 46, n. 5, out. 2010.
- Citações e frases famosas**, 2023. Disponível em: <citacoes.in/citacoes/102738-john-fitzgerald-kennedy-quanto-mais-aumenta-nosso-conhecimento-mais-evide/>. Acesso em: 14 jan. 2023.
- CORDIER, C.; EDEL-HERMANN, V.; MARTIN-LAURENT, F.; BLAL, B.; STEINBERG, C.; ALABOUVETTE, C. SCAR based real time PCR to identify a biocontrol strain (T1) of *Trichoderma atroviride* and study its population dynamics in soils. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, n. 1, p. 60-68, jan. 2007.
- CUMAGUN, C. J. R.; HOCKENHULL, J.; LUBECK, M. Characterization of *Trichoderma* isolates from Philippine rice fields by UP-PCR and rDNA-ITS1 analysis: Identification of UP-PCR markers. **Journal of Phytopathology** – Phytopathologische Zeitschrift, v. 148, n. 2, p. 109-115, feb. 2000.
- DOU, K.; LU, Z. X.; WU, Q.; NI, M.; YU, C. J.; WANG, M.; LI, Y. Q.; WANG, X. H.; XIE, H. L.; CHEN, J.; ZHANG, C. L. MIST: a Multilocus identification system for *Trichoderma*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 18, sep. 2020.
- FERREIRA, J. D.; BUOSI, V. V. A.; GASPARINI, V. A. A importância da qualidade nas organizações. **Unopar Cient., Ciênc. Jurid. Empres.**, v. 17, n. 1, p. 50-55, mar. 2016.

FIGUEIREDO, Márcia do Vale Barreto; BURITY, Hélio Almeida; OLIVEIRA, José de Paula; SANTOS, Carolina Etienne de Rosália e Silva; STAMFORD, Newton Pereira (ed.). **Biotecnologia aplicada à agricultura: Textos de Apoio e Protocolos Experimentais**. Brasília, 2010.

FRANCISCO, M. R. **Seleção e identificação de *Trichoderma spp.* e potencial para produção de enzimas industriais**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, p. 65, 2016.

HADDAD, P. E. **Avaliação de isolados de *Trichoderma spp.* para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Meloidogyne incognita* em soja e produção em meios líquidos**. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo, p. 102, 2014.

HIRPARA, D. G.; GAJERA, H. P.; BHIMANI, R. D.; GOLAKI, B. A. The SRAP based molecular diversity related to antifungal and antioxidant bioactive constituents for biocontrol potentials of *Trichoderma* against *Sclerotium rolfisii* scc. **Current Genetics**, v. 62, p. 619-641, Aug. 2016.

LEE, S.H.; JUNG, H.J.; HONG, S. B.; CHOI, J. L.; RYU, J. S. Molecular markers for detecting a wide range of *Trichoderma spp.* that might potentially cause green mold in *Pleurotus eryngii*. **Mycobiology**, v. 48, n. 4, p. 313-320, jul. 2020.

LOPES, F. A. C. **Caracterização molecular, filogenética e enzimática de isolados de *Trichoderma spp.*** Dissertação (Mestrado em Biologia) – Curso de Pós-Graduação em Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, p. 104, 2012.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F.; ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: O fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v.35. p. 274-288, 2012.

MAZROU, Y. S. A.; MAKHLOUF, A. H.; ELSEEHY, M. M.; AWAD, M. F.; HASSAN, M. M. Antagonistic and molecular characterization of biological control agent *Trichoderma harzianum* from Saudi Arabia. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n.4, jan.2021.

MELO, L. S. **Identificação molecular e produção de enzimas celulolíticas por *Trichoderma spp.*** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Agroflorestal) – Programa Multi Institucional de Pós-Graduação, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, p. 60, 2009.

MEYER, Maurício Conrado; MAZARO, Sérgio Miguel; SILVA, Juliano Cesar (org.). ***Trichoderma: uso na agricultura***. Brasília, 2019.

MILLACH, S. C. K. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**, 1999.

OLIVEIRA, A. J.; OLIVEIRA, T. C.; SANTOS, A. A. C.; SIQUEIRA, T. A.; DUARTE, W. M.; CALDEIRA, D. S. A.; VILARINHO, M. K. C.; ALMICI, M. S.; SILVA, G. F.; BARELI, M. A. A.; KARSBURG, I. V. Principais marcadores moleculares. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, 2021.

OSKIERA, M.; SZCZECH, M.; STEPOWSKA, A.; SMOLINSKA, U.; BARTOSZEWSKI, G. Monitoring of *Trichoderma* species in agricultural soil in response to application of biopreparations. **Biological Control**, v. 113, p. 65-72, oct. 2017.

PAULA, L N.; ALVES, A. R.; NANTES, E. A. S. A importância do controle de qualidade em indústria do segmento alimentício. **Revista Conhecimento Online**, v. 2, p. 78-91, jul./dez. 2017.

PEREZ, G.; VERDEJO, V.; GONDIM-PORTO, C.; ORLANDO, J.; CARU, M. Designing a scar molecular marker for monitoring *Trichoderma cf. harzinum* in experimental communities. **Journal of Zhejiang University Science B**, v.15, n.11, p. 966-978, nov. 2014.

RAI, S.; KASHYAP, P. L.; KUMAR, S.; SRIVASTAVA, A. K.; RAMTEKE, P. W. Comparative analysis of microsatellites in five diferente antagonistic *Trichoderma* species for diversity assessment. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 32, n. 1, jan. 2016.

REIS, M. T. **Identificação e avaliação do potencial de uso de isolados de *Trichoderma* contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii***. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, p. 133, 2014.

ROBARTS, D. W. H.; WOLFE, A. D. Sequence related amplified polymorphism (SRAP) markers: A potencial resource for studies in plant molecular biology. **Applications in Plant Sciences**, v.2, jul. 2014.

SANDOVAL, C. A. T.; CRUZ, M. C.; MORALES, R. B.; GUZMÁN, G. G. L.; HERMOSILLO, Y. A. P. Molecular analysis of genetic diversity in soursop (*Annona muricata* L.) using SRAP markers. **Rev. Fitotec. Mex.**, v. 42, p. 209-214, 2019.

STEINDORFF, A. S. **Genômica estrutural e funcional de fungos do gênero *Trichoderma***. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Instituto de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, p. 98, 2016.

TURCHETTO-ZOLET; Andreia Carina; TURCHETTO, Caroline; ZANELLA, Camila Martini; PASSAIA, Gisele. **Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações**. Ribeirão Preto, 2017.

WOO, S. L.; RUOCCO, M.; VINALE, F.; NIGRO, M.; MARRA, R.; LOMBARDI, N.; PASCALE, A.; LANZUISE, S.; MANGANIELLO, G.; LORITO, M. *Trichoderma* based products and their widespread use in agriculture. **The Open Mycology Journal**, v. 8, p. 71-126, jul. 2014.

**ANEXO - AUTOR, ANO DE PUBLICAÇÃO, PRIMERS, NÚMERO DE BASES E CONDIÇÕES DA
PCR, *Trichoderma harzianum***

Quadro 4 - Autor, ano de publicação, primers, número de bases e condições da PCR, *Trichoderma harzianum*

Autor	Primer	pb	Condições da PCR
Bowen et al., (1996)	RC12: (5' – CGC ACC AAG CTT GTC AGC CAG CT – 3')	853	3 min. à 94°C, 45 ciclos de 1 min à 94°C e 1 min. à 45 °C, 3 min. à 72°C, seguido de 7 min. à 72°C.
Cumagun et al., (2000)	L45: (5' – GTA AAA CGA CGG CCA GT – 3') 3-2: (5' – TAA GGG CGG TGC CAG T – 3') AA2M2: (5' – CTG CGA CCC AGA GCG G – 3') AS4: (5' – TGT GGG CGC TCG ACA C – 3') AS15: (5' – GGC TAA GCG GTC GTT AC – 3') AS15inv: (5' – CAT TGC TGG CGA ATC GG – 3') L21: (5' – GGA TCC GAC GGT GGC GGT TCT – 3') FoK1: (5' – GGA TGA CCC ACC TCC TAC – 3') L15/AS19: (5' – GAG GGT GGC GGC TAG – 3') 0.3-1: (5' – CGA GAA CGA CGG TTC T – 3')		3 min. à 94°C para desnaturação, 30 ciclos com desnaturação à 92°C por 50s, anelamento à 58°C por 60s e extensão à 72°C por 60s, 72°C por 3 min.
Abd-El salam et al., (2010)	M13: (5': GAG GGT GGC GGT TCT – 3')		Pré-desnaturação à 93°C por 3 min., seguido de 45 ciclos de 93°C de desnaturação à 1 min., 55°C para anelamento por 1 min., 72°C de extensão por 1 min. e 72°C final de extensão por 10 min.
Pérez et al., (2014)	2F1: (5' – TCC GCC ACC ATC TAG ACC AAT CG – 3') 2F2: (5' – TGG CTC GTC GTA GTT CGG AGA AG – 3') 2R1: (5' – CCA CCG CGG GAT TCA TGC ACT – 3') 2R2: (5' – CCA GAT CGG CCA CCG AAG AAA C – 3') 2R3: (5' – GCC ACC CAC CGC GGG ATT CA – 3')	2-23 51- 73 474- 494 397- 328 480- 499	2 min. de desnaturação à 95°C, 40 ciclos de 15s de desnaturação à 95°C e 1 min. de hibridização à 64°C e 1 min. de extensão à 72°C.
Abbasi et al., (2016)	OPA-10: (5' – GTGATCGCAG – 3') OPA-11: (5' – CAATCGCCGT – 3')		92°C por 3 min., 30 ciclos de 92°C por 1 min e 33°C por 1

	OPA-14: (5' – TCTGTGCTGG – 3')			min; 72°C por 2 min e 72°C por 5 min.
	OPA-18: (5' – AGGTGACCGT – 3')			
	OPA-16: (5' – AGCCAGCGAA – 3')			
	rep 1R-I: (5' – IIIICGICGICATCIGGC – 3')			94°C por 7 min., seguido de 35 ciclos de 92°C por 1 min e 43°C por 1 min.; 72°C por 2 min e 10 min. à 72°C.
	rep 2-I: (5' - IIIICGNCGNCATCNGGC – 3')			94°C por 7 min., seguido de 40 ciclos de 92°C por 1 min. e 40°C por 1 min.; 72°C por 2 min, e 10 min. à 72°C.
	Box A1R: (5' – CTACGGCAAGGCGACGCTGACG – 3')			94°C por 3 min., seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min; 53°C por 1 min; 65°C por 2 min., seguido de 65°C por 8 min.
	Eric 1R: (5' – ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC – 3')			95°C por 2 min., seguido de 35 ciclos à 94°C por 1 min. e 51°C por 1 min; e 72°C por 2 min., seguido por 7 min à 72°C
	Eric2: (5' – AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG – 3')			
Hirpara et al., (2016)	SRAP – 119 - me 8 F - (5' – TGA GTC CAA ACC GGA CT – 3')	353		96°C por 4 min., 5 ciclos de 1 min à 94°C; 1.15 min à 35°C e 2 min. à 72°C. depois 30 ciclos de 1 min. à 94 °C; 1.15 min. à 50°C e 2 min. à 72°C, com extensão final de 10 min. à 72°C.
	em 7 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCCA – 3')			
	SRAP – 151 - me 10 F - (5' – TGAGTCCAAACCGGAAA – 3')	2419		Como descrito anteriormente.
	em 7 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCCA – 3')			
	SRAP – 153 - me 10 F - (5' – TGAGTCCAAACCGGAAA – 3')	2684		Como descrito anteriormente.
	em 9 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCCAG – 3')			
Hirpara et al., (2016)	SRAP – 155 - me 10 F - (5' – TGAGTCCAAACCGGAAA – 3')	398		Como descrito anteriormente.
	em 11 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCTA – 3')			

	SRAP – 158 - me 10 F - (5' – 376 TGAGTCCAAACCGGAAA – 3' em 14 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCTT – 3')		Como descrito anteriormente.
	SRAP – 160 - me 10 F - (5' – 172 TGAGTCCAAACCGGAAA – 3') em 16 R – (5' – GACTGCGTACGAATTGTC – 3')		Como descrito anteriormente.
	SRAP – 161 - me 11 F - (5' – 1322 TGAGTCCAAACCGGAAC – 3') em 1 R – (5' – GACTGCGTACGAATTAAT – 3')		Como descrito anteriormente.
	SRAP – 168 - me 11 F - (5' – 112 TGAGTCCAAACCGGAAC – 3') em 8 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCAC – 3')		Como descrito anteriormente.
	SRAP – 22 - me 2 F - (5' – 108 TGAGTCCAAACCGGAGC – 3') em 6 R – (5' – GACTGCGTACGAATTGCA – 3')		Como descrito anteriormente.
	SRAP – 54 me 4 F – (5' - TGAGTCCAAACCGGAC – 3') em 6 R – (5' – GACTGCGTACGAATTGCA – 3')	738- 893	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 56 - me 4 F - (5' - 152 TGAGTCCAAACCGGAC – 3') em 8 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCAC – 3')		Como descrito anteriormente.
	SRAP – 64 - me 4 F - (5' - 662 TGAGTCCAAACCGGAC – 3') em 16 R – (5' – GACTGCGTACGAATTGTC – 3')		Como descrito anteriormente.
	SRAP – 77 - me 5 F - (5' - 121 TGAGTCCAAACCGGAA – 3') em 13 R – (5' - GACTGCGTACGAATTCTG – 3')		Como descrito anteriormente.
Hirpara et al., (2016)	SRAP – 119 - me 8 F - (5' – TGA GTC CAA ACC GGA CT – 3') em 7 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCCA – 3')	261 e 109	Como descrito anteriormente.

	SRAP – 135 - me 9 F - (5' - 161 TGAGTCCAAACCGGAGG – 3') em 7 R – (5' - GACTGCGTACGAATTCCA – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 148 - me 10 F - (5' - 400 TGAGTCCAAACCGGAAA – 3') em 4 R – (5' - GACTGCGTACGAATTTGA – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 151 - me 10 F - (5' - 897 TGAGTCCAAACCGGAAA – 3') em 7 R – (5' - GACTGCGTACGAATTCCA – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 158 - me 10 F - (5' - 467 TGAGTCCAAACCGGAAA – 3') em 14 R – (5' - GACTGCGTACGAATTCTT – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 181 - me 12 F - (5' - 124 TGAGTCCAAACCGGAGA – 3') em 5 R – (5' - GACTGCGTACGAATTAAC – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 189 - me 12 F - (5' - 201 TGAGTCCAAACCGGAGA – 3') em 13 R – (5' - GACTGCGTACGAATTCTG – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 194 - me 13 F - (5' - 223 TGAGTCCAAACCGGAGT – 3') em 2 R – (5' - GACTGCGTACGAATTTGC – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 200 - me 13 F - (5' - 2215 TGAGTCCAAACCGGAGT – 3') em 8 R – (5' - GACTGCGTACGAATTCAC – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 201 - me 13 F - (5' - 212 TGAGTCCAAACCGGAGT – 3') em 9 R – (5' - GACTGCGTACGAATTCAG – 3')	Como descrito anteriormente.
Hirpara et al., (2016)	SRAP – 218 - me 14 F - (5' - 1012 TGAGTCCAAACCGGATG – 3') em 10 R – (5' - GACTGCGTACGAATTC – 3')	Como descrito anteriormente.

	SRAP – 226 - me 15 F – (5' - 1699 TGAGTCCAAACCGGATC – 3') em 2 R – (5' - GACTGCGTACGAATTTGC – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 232 - me 15 F – (5' - 1952 TGAGTCCAAACCGGATC – 3') em 8 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCAC – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 238 - me 15 F – (5' - 866 e TGAGTCCAAACCGGATC – 3') 147 em 14 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCTT – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 240 - me 15 F – (5' - 127 e TGAGTCCAAACCGGATC – 3') 101 em 16 R – (5'GACTGCGTACGAATTGTC – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 245 - me 16 F – (5' – 1414 TGAGTCCAAACCGGATT – 3') e 821 em 5 R – (5' - GACTGCGTACGAATTAAC – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 7 - me 1 F – (5' – 272 TGAGTCCAAACCGGATA – 3') em 7 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCCA – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 26 - me 2 F – (5' – 636 e TGAGTCCAAACCGGAGC – 3') 303 em 10 R – (5' – GACTGCGTACGAATTC – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 33 - me 3 F – (5' – 157 TGAGTCCAAACCGGAA – 3') em 1 R – (5' – GACTGCGTACGAATTAAT – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 39 - me 3 F – (5' – 289 TGAGTCCAAACCGGAA – 3') em 7 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCAC – 3')	Como descrito anteriormente.
Hirpara et al., (2016)	SRAP – 54 - me 4 F – (5' - 1188 TGAGTCCAAACCGGAC – 3') – 441 em 6 R – (5' – GACTGCGTACGAATTGCA – – 379 3')	Como descrito anteriormente.

	SRAP – 64 - me 4 F – (5' - 1460 TGAGTCCAAACCGGAC – 3') em 16 R – (5'GACTGCGTACGAATTGTC – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 72 - me 5 F – (5' - 217 TGAGTCCAAACCGGAA – 3') em 8 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCAC – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 77 - me 5 F – (5' - 1240 TGAGTCCAAACCGGAA – 3') – 171 em 13 R – (5' - GACTGCGTACGAATTCTG – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 119 - me 8 F - (5' – TGA GTC CAA 205 ACC GGA CT – 3') em 7 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCCA – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 122 - me 8 F - (5' – TGA GTC CAA 109 ACC GGA CT – 3') em 10 R – (5' – GACTGCGTACGAATTC – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 135 - me 9 F – (5' - 2457 TGAGTCCAAACCGGAGG – 3') em 7 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCCA – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 137 - me 9 F – (5' - 194 TGAGTCCAAACCGGAGG – 3') em 9 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCAG – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 142 - me 9 F – (5' - 831 TGAGTCCAAACCGGAGG – 3') em 14 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCTT – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 151 - me 10 F - (5' – 326 TGAGTCCAAACCGGAAA – 3') em 7 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCCA – 3')	Como descrito anteriormente.
Hirpara et al., (2016)	SRAP – 152 - me 10 F - (5' – 463 TGAGTCCAAACCGGAAA – 3') em 8 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCAC – 3')	Como descrito anteriormente.

	SRAP – 159 - me 10 F - (5' – 373 TGAGTCCAAACCGGAAA – 3') em 15 R – (5' – GACTGCGTACGAATTGAT – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 165 - me 11 F - (5' – 163 TGAGTCCAAACCGGAAC – 3') em 5 R – (5' - GACTGCGTACGAATTAAC – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 179 - me 12 F - (5' - 1601 TGAGTCCAAACCGGAGA – 3') em 3 R – (5' – GACTGCGTACGAATTGAC – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 181 - me 12 F - (5' - 1799 TGAGTCCAAACCGGAGA – 3') em 5 R – (5' - GACTGCGTACGAATTAAC – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 182 - me 12 F - (5' - 362 TGAGTCCAAACCGGAGA – 3') em 6 R – (5' – GACTGCGTACGAATTGCA – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 190 - me 12 F - (5' - 162 TGAGTCCAAACCGGAGA – 3') em 14 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCTT – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 198 - me 13 F - (5' - 272 TGAGTCCAAACCGGAGT – 3') em 6 R – (5' – GACTGCGTACGAATTGCA – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 201 - me 13 F - (5' - 145 TGAGTCCAAACCGGAGT – 3') em 9 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCAG – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 223 - me 14 F - (5' – 1671 TGAGTCCAAACCGGATG – 3') em 15 R – (5' – GACTGCGTACGAATTGAT – 3')	Como descrito anteriormente.
Hirpara et al., (2016)	SRAP – 236 - me 15 F - (5' - 1489 TGAGTCCAAACCGGATC – 3') em 12 R – (5' - GACTGCGTACGAATTCTC – 3')	Como descrito anteriormente.

	SRAP – 243 - me 16 F – (5' – 600 TGAGTCCAAACCGGATT – 3') em 3 R – (5' – GACTGCGTACGAATTGAC – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 252 - me 16 F – (5' – 320 TGAGTCCAAACCGGATT – 3') em 12 R – (5' - GACTGCGTACGAATTCTC – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 19 - me 2 F – (5' – 1731 TGAGTCCAAACCGGAGC – 3') em 3 R – (5' – GACTGCGTACGAATTGAC – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 22 - me 2 F – (5' – 310 TGAGTCCAAACCGGAGC – 3') em 6 R – (5' – GACTGCGTACGAATTGCA – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 39 - me 3 F – (5' – 488 TGAGTCCAAACCGGAA – 3') em 7 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCCA – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 57 - me 4 F – (5' - 1341 TGAGTCCAAACCGGAC – 3') em 9 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCCAG – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 76 - me 5 F – (5' - 340- TGAGTCCAAACCGGAA – 3') 202 em 12 R – (5' - GACTGCGTACGAATTCTC – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 142 - me 9 F – (5' - 884 TGAGTCCAAACCGGAGG – 3') em 14 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCTT – 3')	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 151 - me 10 F - (5' – 697 – TGAGTCCAAACCGGAAA – 3') 352 – em 7 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCCA – 178 3')	Como descrito anteriormente.
Hirpara et al., (2016)	SRAP – 232 - me 15 F – (5' - 1015 TGAGTCCAAACCGGATC – 3') em 8 R – (5' – GACTGCGTACGAATTCCAC – 3')	Como descrito anteriormente.

	SRAP – 240 - me 15 F – (5' - 284 – TGAGTCCAAACCGGATC – 3') em 16 R – (5'GACTGCGTACGAATTGTC – 3')	177	Como descrito anteriormente.
	SRAP – 242 - me 16 F – (5' - 108 TGAGTCCAAACCGGATT – 3') em 2 R – (5' - GACTGCGTACGAATTTGC – 3')		Como descrito anteriormente.
Rai, et al., (2016)	TvSSR 1 – (5' – CTA TGG TGC CTC TGG TCT TTT C – 3') (5' – GAT GTT GGA CTT GTA ACC C -3')	400- 500	Desnaturação à 95°C por 3 min., seguido de 5 ciclos de 94°C por 20s, de 58°C por 20s e de 72°C por 30s, depois são 40 ciclos de desnaturação à 94°C por 20s, anelamento à 57°C por 20s e extensão à 72°C por 20s, e uma extensão final à 72°C por 20 min.
	TvSSR 4 – (5' – CCC CTT TAC GAG ATA CGA T – 3') (5' – GAG AGA GAA GCG AAA GCA C – 3')	190- 250	Como descrito anteriormente.
Rai, et al., (2016)	TvSSR 5 – (5' – GGA TCG GCA AGG AAT ATA AAC A – 3') (5' – CAA CTT CCA TAA AGA CCG AAG C – 3')	200- 290	Como descrito anteriormente.
	TaSSR1 – (5' – AAG CGG TCA GTT GAA AGT AAC G – 3') (5' – AAG GGT TTT GCT TGT CCA GAT A – 3')	180- 250	Como descrito anteriormente.
	TaSSR4 – (5' – CTT GAC CTG CTA CAA CTG C – 3') (5' – TGT CCA TCT CTC TCT CTC TTC TCA – 3')	400- 500	Como descrito anteriormente.
Oskiera et al., (2017)	QTh – 8F: (5' – CAT GGA AAC ACA GAC GGA – 3') QTh – 3R: (5' – AGA TAG AGA TGG AGA GAA AG – 3')	200	94°C por 3 min., seguido de 35 ciclos de desnaturação de 30s e anelamento de 94°C por 30s, extensão por 1 min. à 72°C e extensão final por 10 min. à 72°C.

	QTh – 5F: (5' – GGG TTG TTC GCA TGG AAG – 3')	2000	Como descrito anteriormente.
	QTh – 4R: (5' – GTT GGA GAT GGG AGG AAG – 3')		
	TVD – lf: (5' – CGT TGG TTC CCA TTC AGC GCT TC – 3')	1500	Como descrito anteriormente.
	TVD – lr: (5' – TCC AAG AGC ATT TCC CCG CAA CA – 3')		
Lee et al., (2020)	TDP-F: (5' – CGA GTT TAC AAC TCC CAA A – 3')	100	98°C por 30s, 35 ciclos de desnaturação à 98°C por 10s, anelamento à 60°C por 30s e extensão à 72°C por 1 min, e um ciclo final de extensão à 72°C por 7 minutos.
	TDP-R: (5' – GAA AGT TGG GTG TTT AAC G – 3')		

Fonte: Autoria própria (2022)