

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**CURSO DE MESTRADO**

**Diversidade de espécies do Clado *Chlorosporum* e  
descrição polifásica de *Trichoderma* sp. nov. Strait  
MTS29**

**LENON LIMA DE SANTANA**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

**AGOSTO - 2022**

**Diversidade de espécies do Clado *Chlorosporum* e descrição  
polifásica de *Trichoderma* sp. nov. strain MTS29**

**LENON LIMA DE SANTANA**

Biólogo

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2022

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias.

**Orientador:** Phellippe Arthur Santos Marbach

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

**AGOSTO - 2022**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S232d

Santana, Lenon Lima de.

Diversidade de espécies do *Clado chlorosporum* e descrição polifásica de *Trichoderma* sp. nov. strain MTS29 / Lenon Lima de Santana. \_ Cruz das Almas, BA, 2022.  
62f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. Phellippe Arthur Santos Marbach.

1.Fungos – Microbiologia. 2.Fungos – Diversidade biológica – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 579

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB. Responsável pela Elaboração Antonio Marcos Sarmento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO**

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DO CLADO *Chlorosporum* E  
DESCRIÇÃO POLIFÁSICA DE *Trichoderma* sp. nov. strain  
MTS29**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LENON  
LIMA DE SANTANA**

Realizada em 30 de agosto de 2022

Documento assinado digitalmente  
 PHELLIPPE ARTHUR SANTOS MARBACH  
Data: 26/01/2023 21:12:47-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Phellippe Arthur Santos Marbach  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB  
Examinador Interno (Orientador)

Documento assinado digitalmente  
 JORGE TEODORO DE SOUZA  
Data: 27/01/2023 12:25:43-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza  
Universidade Federal de Lavras - UFLA  
Examinador Externo

Documento assinado digitalmente  
 LEANDRO LOPES LOGUERCIO  
Data: 19/04/2023 16:54:26-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Leandro Lopes Loguercio  
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC  
Examinador Externo

“Quem olha pra você  
Quem vê o teu sorriso  
Não imagina  
O que passou  
O que sofreu  
O quanto chorou  
De decepções;  
Fecharam tantas portas  
Quando pediu ajuda  
Ouvindo tantas palavras  
Que era em vão tua luta  
Tentaram te impedir  
Para não prosseguir  
Você não desistiu  
Enfrentou  
Milhões de guerras pra chegar até aqui  
Sabes bem  
Que a tua história ainda não chegou ao fim  
Enfrentou  
Milhões de guerras pra chegar até aqui  
Sabes bem  
Que a tua história ainda não chegou ao fim”  
(Célia Sakamoto - música A vitória é certa)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pois sem ele nada seria possível, nem mesmo a existência!

As minhas garotas, minhas duas princesas, Ana Helena e Ana Laura que são o meu maior bem, mesmo não entendendo bem o que acontece a simples presença delas pode tornar a noite mais sombria no dia iluminado, amo vocês de um jeito que jamais imaginei que poderia amar, alguém ou algo, por vocês eu enfrento qualquer desafio!

A minha companheira de todos os dias, os ouvidos que captam minha voz nos momentos de desabafo, a minha melhor amiga, parceira, aquela que divide os bons e maus momentos, suas vitórias são minhas assim como as minhas também são suas. Obrigado Andressa, eu amo você!

Aos meus pais Joseval e Miriam, por toda a criação e anos dedicado à minha formação como pessoa, pelo apoio, conselhos e todo amor, amo vocês e obrigado por continuarem confiando em mim!

A meu orientador Phellippe Marbach, pela parceria e conselhos ao longo desses anos, pela orientação na confecção deste trabalho e por acreditar que sou capaz.

Aos meus irmãos Luan e Lorena por todos os momentos de apoio e por sempre acreditarem em mim, vocês são alguns dos meus portos seguros, amo vocês.

Aos meus amigos/colegas de laboratório (Lucas, Tainá, Matheus, Samantha, Gabriel e Djalma), pela ajuda nos mais variados momentos e necessidades que o LABEV nos impõe, vocês são ótimos, com vocês a labuta se torna mais leve, amo vocês minha família número 3.

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, por me proporcionar a oportunidade de formação acadêmica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Aos meus amigos e amigas e familiares que mesmo eu estando distante nesse momento sei que torcem por mim e me apoiam para seguir sempre em frente.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma na minha vida e na minha formação, nada na vida é por acaso. Obrigado por tudo!

## **Diversidade de espécies do Clado *Chlorosporum* e descrição polifásica de *Trichoderma* sp. nov. strain MTS29**

Autor: Lenon Lima de Santana

Orientador: Phellippe Arthur Santos Marbach

**RESUMO:** O gênero *Trichoderma* é o principal gênero fúngico utilizado na promoção de crescimento de plantas e no controle biológico de fitopatógenos. O objetivo deste trabalho foi fazer uma revisão da diversidade de espécies de *Trichoderma* do Clado *Chlorosporum* usando sequências dos genes *tef1* e *rpb2* disponíveis no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e a descrição e potencial de biocontrole de fitopatógenos de *Trichoderma* sp. nov. MTS29. A análise combinada das filogenias moleculares e os resultados obtidos com o ASAP (*Assemble Species by Automatic Partitioning*) indicaram que as sequências de *tef1* e *rpb2* disponíveis no NCBI representam pelo menos 14 espécies desconhecidas, além das 10 espécies descritas do clado, que estão distribuídas em quatro continentes, com predominância para Ásia e Europa. Análises filogenéticas indicaram que o isolado *Trichoderma* sp. nov. MTS29 é uma nova espécie do Clado *Chlorosporum* e possui colônias hialinas mudando para o verde após sete dias, pústulas brancas e esverdeadas, conídios verdes, lisos, (sub)globosos e elipsoidais e conidióforos do tipo pachybasium-like. Clamidósporos, odor característico ou pigmentação solúvel não foram observados. *Trichoderma* sp. nov. MTS29 inibiu o crescimento de *Aspergillus welwitschiae* e *Moniliophthora perniciosa* (agentes etiológicos da podridão vermelha do sisal e da vassoura-de-bruxa do cacauero, respectivamente) em ensaios de cultura pareada e de produção de compostos voláteis inibidores do crescimento micelial. *Trichoderma* sp. nov. MTS29 é a primeira espécie descrita do Clado *Chlorosporum* oriunda do Brasil e a primeira isolada na restinga, o que mostra que a microbiota deste ecossistema possui uma diversidade fúngica com potencial para aplicações biotecnológicas.

**Palavras – Chave:** Funga, *Trichoderma*, restinga.

## SPECIES DIVERSITY OF THE CLADE *CHLOROSPORUM* AND POLYPHASIC DESCRIPTION OF *Trichoderma* sp. nov. strain MTS29

Autor: Lenon Lima de Santana

Orientador: Phellippe Arthur Santos Marbach

**Abstract:** The genus *Trichoderma* is the main fungal genus used in the promotion of plant growth and in the biological control of phytopathogens. The objective of this work was to review the diversity of *Trichoderma* species of the Clade *Chlorosporum* using *tef1* and *rpb2* gene sequences available at NCBI (National Center for Biotechnology Information) and the description and biocontrol potential of *Trichoderma* sp. nov. MTS29. The combined analysis of molecular phylogenies and the results obtained with ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning) indicated that the *tef1* and *rpb2* sequences available at NCBI represent at least 14 unknown species, in addition to the 10 described species of the clade, which are distributed in four continents, predominantly Asia and Europe. Phylogenetic analyzes indicated that the isolate *Trichoderma* sp. nov. MTS29 is a new species of the Clade *Chlorosporum* and has hyaline colonies changing to green after seven days, white and greenish pustules, green, smooth, (sub)globose and ellipsoidal conidia and pachybasium-like conidiophores. Chlamydospores, characteristic odor or soluble pigmentation were not observed. *Trichoderma* sp. nov. MTS29 inhibited the growth of *Aspergillus welwitschiae* and *Moniliophthora perniciosa* (etiological agents of red rot of sisal and witches' broom of cacao, respectively) in assays of paired culture and production of volatile compounds that inhibit mycelial growth. *Trichoderma* sp. nov. MTS29 is the first described species of the Clade *Chlorosporum* from Brazil and the first isolated from the restinga, which shows that the mycobiota of this ecosystem has a fungal diversity with potential for biotechnological applications.

**Keywords:** Funga, *Trichoderma*, restinga.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Número de acesso do *tef1* e *rpb2* dos isolados relativos identificados no Clado *Chlorosporum* recuperados do NCBI e utilizados neste estudo.....26
- Tabela 2.** Identidade dos isolados de *Trichoderma* do Clado *Chlorosporum* agrupados de acordo de acordo com o ASAP.....30

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema do <i>tef1</i> e as regiões propostas.....	25
<b>Figura 2.</b> Filogenia de máxima verossimilhança revelada por RAxML a partir de uma análise do alinhamento da sequência do <i>tef1</i> de isolados do Clado <i>Chlorosporum</i> .....	28
<b>Figura 3.</b> Taxa de crescimento dos fitopatógenos <i>A. welwitschiae</i> e <i>M. perniciosa</i> , na presença e na ausência do agente de biocontrole ( <i>T. MTS29</i> ), para observar a inibição dos fitopatógenos.....	31
<b>Figura 4.</b> Crescimento da colônia do <i>T. MTS29</i> na presença dos fitopatógenos <i>A. welwitschiae</i> e <i>M. perniciosa</i> .....	32
<b>Figura 5.</b> Ensaio de Antagonismo mostrando relação de antibiose e parasitismo.....	32
<b>Figura 6.</b> Ensaios de compostos voláteis indicando a taxa de crescimento do agente de biocontrole e dos fitopatógenos em milímetros ao longo de 10 dias.....	32
<b>Figura 7.</b> Árvore filogenética de máxima verossimilhança de <i>rpb2</i> obtida no RAxML.....	34
<b>Figura 8.</b> <i>Trichoderma miltoni</i> . MTS29.....	35
<b>Figura 9.</b> Representação do conidióforos de <i>Trichoderma</i> sp. nov. MTS29.....	37

## SUMÁRIO

Artigo 1 - Diversidade de espécies do Clado <i>Chlorosporum</i> e descrição polifásica de <i>Trichoderma</i> sp. nov. strain mts29.....	13
<b>1. Introdução</b> .....	14
<b>2. Referencial teórico</b> .....	15
2.1 Taxonomia dos fungos .....	15
2.2 importância do gênero <i>Trichoderma</i> .....	16
2.3 Clado <i>Chlorosporum</i> .....	18
<b>3. Material e Métodos</b> .....	20
3.1 Coleta e isolamento de cepa.....	20
3.2 Recuperação de sequências de nucleotídeos.....	20
3.3 Extração de DNA.....	21
3.4 Amplificação e sequenciamento.....	22
3.5 Análises filogenéticas.....	22
3.6 Identidade e delimitação de espécies baseadas em sequência.....	23
3.7 Atividade antagônica e avaliação na produção de compostos orgânicos voláteis <i>in vitro</i> contra <i>Aspergillus welwitschiae</i> e <i>Moniliophthora perniciosa</i> ....	23
3.8 Análise morfológica.....	24
<b>4. Resultados</b> .....	24
4.1 Caracterização das sequências de <i>tef1</i> recuperadas.....	24
4.2 Filogenias e delimitação de supostas novas espécies pelo ASAP e valores de identidade entre os AGP .....	27
4.3 Ação de antagonismo direto e produção de compostos orgânicos voláteis de <i>T. miltoni</i> .....	31
4.4 Descrição de <i>Trichoderma miltoni</i> sp. nov. ....	33
<b>5. Discussão</b> .....	38
5.1 Adição de uma nova espécie ao Clado <i>Chlorosporum</i> .....	38
5.2 Limites do Clado <i>Chlorosporum</i> .....	39
5.3 Novas espécies dentro do Clado <i>Chlorosporum</i> .....	39
5.4 Identidade entre os isolados Tipo em comparação com os AGP.....	41
5.5 Importância biotecnológica e as implicações de uma identificação incorreta.....	42
5.6 <i>Trichoderma miltoni</i> sp. nov., potencial de antagonismo a partir da interação direta contra fitopatógenos.....	42
<b>6. Conclusão</b> .....	44
<b>7. Referências</b> .....	47

## 1. INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos que desempenham importantes papéis ecológicos, atuando como decompositores, parasitas e simbiontes (LIU et AL., 2018; SEXTON & HOWLETT, 2006), contribuindo desta forma para a homeostase do meio ambiente. Além disso os fungos são o segundo grupo de organismos eucariotos mais abundantes que existe (SCHOCH, et al, 2012), ressaltando a importância deles para a natureza. Além da importância ecológica os representantes do Reino Fungi possuem importância para o homem como a exemplo, na produção de fármacos, no ramo alimentício, na agricultura, na indústria têxtil, na produção de biocombustíveis e na área médica (AZEVEDO, 2011; ABREU et al., 2015).

Dada a importância que os fungos representam, existe uma necessidade de classificá-los e organizá-los em grupos; através dessa organização, é possível explorar de maneira mais efetiva a utilidade que cada um desses organismos possui (DREYFUSS e CHAPELA, 1994), ou encontrar maneiras de combater fungos potencialmente patogênicos (PELZER et al., 2011). Ressaltase a importância dos estudos taxonômicos, nos quais a taxonomia de fungos explora características morfológicas (macromorfologia e micromorfologia) e identificação molecular. Os trabalhos taxonômicos são importantes para a classificação dos organismos e a revisão desses trabalhos é essencial pois a partir delas alguns problemas existentes na classificação podem ser detectados e corrigidos (BISSETT, 1984, 1991a, 1991b, 1991c; BISSETT et al., 2015). No gênero *Aspergillus* existe problemas na classificação dos parálogos  $\beta$ -tubulina e tubC (HUBKA & KOLARIK, 2012), no gênero *Trichoderma* até 2013 não existia um consenso sobre a taxonomia do gênero, pois as descrições eram baseadas de acordo com os estágios morfosexuais. Quando o fungo estava na fase sexuada era descrito como *Hypocrea*, quando encontrado na forma assexuada era classificado como *Trichoderma*. Dessa forma em 2013 os dois gêneros foram unificados permanecendo o nome *Trichoderma*, por ser mais antigo e a classificação para o gênero *Hypocrea* entrou em desuso. Em 2015 foi publicado um trabalho de revisão do gênero, nele 252 de espécies foram revisadas de modo a se adequar com as normas do ICN (*international code of nomenclature*) (BISSETT et al., 2015). Apesar da correção do gênero ter ocorrido, outras situações dentro do gênero *Trichoderma* requerem atenção por deixarem

dúvidas quanto a classificação de espécies, como é o caso de *T. breve*, que morfológicamente se assemelha *T. harzianum*, porém as análises filogenéticas indicam que ele possui maior relação com *T. bannaense* (CHEN & ZGUANG, 2017).

O Clado *Chlorosporum* é caracterizado por espécies com conídios globosos e/ou subglobosos, conidióforos do tipo verticilatum ou gliocladium, além de produzirem estroma semitransparentes, amarelado ou esverdeado (CHAVERRI e SAMUELS, 2003). Em um estudo recente com 119 isolados de do gênero *Trichoderma*, onde foram identificadas 12 espécies, um isolado do Clado *Chlorosporum*, *T. Cremeum* AN392, apresentou a melhor atividade para celulase e xilanase, indicando um potencial para estudos e aplicações biotecnológicas (BŁASZCZYK et al., 2016). A fim de revisar e entender a relação filogenética das espécies de *Trichoderma* dentro do Clado *Chlorosporum* e poder resolver problemas dentro deste grupo, este trabalho tem como objetivo resolver possíveis incongruências dentro do clado a partir de análises filogenéticas por meio dos genes *tef1*, *rpb2* e além de realizar a descrição de uma nova espécie de acordo com requisitos exigidos na sociedade taxonômica de micologia.

## **2. Referencial teórico**

### **2.1 Taxonomia dos fungos**

Os fungos são organismo eucariotos, heterotróficos, possuem quitina na sua parede celular e não celulose, porém eles foram considerados plantas por muito tempo, até que Whittaker (1969) em um trabalho sobre diversidade taxonômica propôs que os fungos eram integrantes de um reino distinto do Reino Plantae, sendo assim o Reino Fungi se estabeleceu como o quinto Reino de classificação biológica. Segundo Tedersoo (2018) os fungos estão atualmente classificado em nove graus taxonômicos (espécie, gênero, família, ordem, classe, subfilo, filo, sub-reino e reino), o Reino está dividido em 9 subreinos que comportam 18 filós, 23 subfilós, 74 classes, 215 ordens, 731 famílias e 5377 gêneros.

A grande quantidade de espécies fúngicas se reflete na sua onipresença nos mais variados ecossistemas de água doce, marinho e terrestres, participando de processos importantes como a decomposição de matéria orgânica e ciclagem de nutrientes além de estarem envolvidos com o controle populacional, atuam

também como mutualistas intestinais anaeróbicos e mutualistas de organismos autotróficos (RODRIGUEZ et al., 2009; ASPLUND e WARDLE, 2017).

Devido à grande quantidade e variedade de espécies, à irregularidade nos ciclos de vida, e a possuir uma morfologia relativamente simples, os fungos apresentam dificuldade na determinação de limites entre espécies, consequentemente impossibilitando a unificação de parâmetros taxonômicos. Para além disso outros causadores para essa obscuridade são seus pequenos corpos, plasticidade metabólica e ecológica e o seu desenvolvimento dentro de um substrato (CAI e DRUZHININA, 2021).

Realizar taxonomia em fungos nunca foi uma tarefa fácil, pois muitas vezes existia a dificuldade de delimitar os limites entre espécies, contudo, com o avanço de técnicas moleculares, o estudo taxonômico passou a ter um novo nível de aprofundamento nas suas análises, o que permitiu uma maior precisão na caracterização das espécies (LÜCKING et al., 2020). As técnicas moleculares forneceram um novo conjunto de caracteres a serem analisados pelos taxonomistas, a partir de seu conjunto genômico (BALINT et al., 2016).

Com o advento das técnicas moleculares, é possível utilizar algumas sequências de DNA, que são padronizadas e capazes de auxiliar de maneira mais correta na identificação e classificação de espécies, essas sequências são chamados de DNA *barcode* (HEBERT et al., 2003); atualmente algumas regiões do DNA já são conhecidas e utilizadas como DNA *barcodes*, em fungos por exemplo o ITS é utilizado como um marcador universal, porém existem marcadores mais específicos e adequados para grupos de fungos, como o RPB2 que além de utilizado como marcador universal é marcador para Sordariomycetes, PGK (Fosfoglicerato Quinase) marcador utilizado para *Penicillium*, TUB2 ( $\beta$ -tubulina II) utilizado como marcador para *Aspergillus*, e TEF1, marcador molecular para *Trichoderma* (JAKLITSCH 2009, 2011; LÜCKING et al., 2020)

## 2.2 Importância do gênero *Trichoderma*

Os fungos do gênero *Trichoderma* possuem grande importância por serem utilizados na promoção de crescimento de plantas, combate a pragas e na indústria biotecnológica. Isso acontece por causa do alto potencial na produção enzimática, como por exemplo *T. reesei* que é um fungo altamente estudado

devido a sua condição como produtor industrial de enzimas para produção de alimentos, ração e biorefinaria (DRUZHININA et al., 2016; Oszust 2021).

Testes *in vitro* forneceram informações em relação as atividades cellulases (FPU), carboximetilceluloses (CMC),  $\beta$ -glucosidase (BGL), xilanase (XYL), protease (PRO) e de amilase (AMY), sendo observadas em espécies de vários gêneros, porém no gênero *Trichoderma* de uma maneira mais generalista, as espécies demonstraram uma melhor atividade no conjunto dessas atividades (OSZUST et al., 2021). Algumas espécies são estudadas devido a sua capacidade de produzir enzimas como xilanases e quitinases, outras produzem imunossupressores que regulam respostas das células T, podendo contribuir no tratamento de algumas doenças. Além disso, existem espécies deste gênero que são utilizados no controle biológico (FERREIRA et al., 2008; ABD-AZIZ et al., 2008; LI et al., 2019). Oszust (2021) propôs que um produto feito à base de um consorcio de espécies de *Trichoderma* fosse formulado para utilização durante plantio, de modo a promover o crescimento e a proteção da rizosfera de plantas de framboesa devido ao grande potencial enzimático conjunto das espécies desse gênero. Outro estudo realizado na Arábia Saudita mostrou uma quantidade significativa de *Trichoderma* presente no solo, e que isolados de espécies desse gênero se mostraram eficazes na ação antagônica contra fungos fitopatogênicos reduzindo o crescimento deles, com destaque para o *F. oxysporum* (redução de 82% do crescimento), causador do Mal-do-Panamá (ALWADAI et al., 2022).

Além do potencial de inibição que os isolados de *Trichoderma* possuem, testes utilizando *T. asperellum*, *T. harzianum* e *T. longibrachiatum*, mostraram que eles podem atuar com efeito de antibiose sobre *F. solani* (UCP 1395, UCP 1075, UCP1083 e ucp1098), sendo registrado nos testes, que eles atuam como micoparasitas, sobrepondo uma colônia sob a outra e extraindo os nutrientes da hifa do fitopatógeno, causando sua morte (FILIZOLA et al., 2019). Atualmente são vistas muitas possibilidades de aplicação do potencial biotecnológico desses organismos, pois além dos papéis já citados que eles desempenham, ainda são utilizados na produção de fármacos, biocombustíveis, tintas e tecidos (DRUZHININA e KUBICEK, 2016), todas essas aplicabilidades trazem retorno financeiro, reforçando a sua importância, que por sua vez retorna parte deste dinheiro novos para estudos, podendo descobrir novas utilizações e potencializando as suas aplicações (OLIVEIRA et al., 2006).

Existe um interesse muito grande pela mudança de fontes de energia poluente e não renovável por fontes de energia limpa e renovável; nesta ótica, o

uso de microrganismos para realizar esta tarefa já vem sendo utilizado e cada vez mais estudos vão surgindo em busca de organismos promissores para tal feito (JOSHI et al., 2022). O biocombustível é um excelente exemplo e uma alternativa de substituição do petróleo. Espécies de *Trichoderma* vem sendo utilizadas em estudos para produção deste combustível, no qual se utiliza a biomassa vegetal (como lignocelulose), que através das ações metabólicas do fungo tem como produto o biocombustível, que se torna desejável quando a sua obtenção é feita em escala economicamente viável (CHIRINO-VALLE et al., 2016; JOSHI et al., 2022). Dentre as espécies de *Trichoderma* utilizados na produção de biocombustíveis o *T. harzianum* é amplamente utilizado, devido ao alto conhecimento sobre essa espécie, que possibilitou explorar o alto potencial de conversão de substratos lignocelulósico em açúcares solúveis (BENOLIEL et al., 2013). Ferreira Filho e colaboradores (2017) realizaram análises com ferramentas de bioinformática na busca por enzimas de várias espécies de *Trichoderma*, que são filogeneticamente relacionadas; essas enzimas já conhecidas de *T. harzianum* são voltadas para a indústria de produção de biocombustíveis, que apesar de estudos mostrarem a grande capacidade que *T. harzianum* possui na produção de biocombustíveis, o seu uso tem sido maior na área de biocontrole de fitopatógenos (PERAZZOLLI et al., 2012). Além de *T. harzianum*, outras espécies de *Trichoderma* como o *T. viride*, *T. hamatum*, *T. asperellum* vem sendo utilizadas no controle biológico, contra fitopatógenos como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., que afetam diversas culturas, como amendoim, alho, tomate, pepino e banana (YEDIDIA et al., 2003; ALFANO et al., 2007, NAHER et al., 2014; AMANAH, 2017; TAYALA et al., 2021).

Além do uso dos *Trichoderma* nos mais variados ramos da indústria, eles são estudados devido à alta capacidade de se adaptarem a diversos ambientes e interagir com animais, plantas e até outros fungos, podendo essas interações serem positivas ou não (DRUZHININA et al., 2011). Um fator que corrobora com o vasto estudo de espécies de *Trichoderma* é a sua onipresença nos mais variados ambientes, espécies de diversos clados, podem ser encontrados em uma gama de habitats como, solo, casca de árvore, madeira em decomposição, associado a outros organismos (BŁASZCZYK et al., 2011).

### **2.3 Clado *Chlorosporum***

Através de estudos taxonômicos, o clado é atualmente composto por 10 espécies descritas e oficialmente reconhecidas: *T brevicrassum*, *T chlorosporum*, *T costaricense*, *T cremeoides*, *T. cremeum*, *T rosulatum*, *T sinuosum*, *T surrotundum*, *T thelephoricola*, e *T zonatum*. Este clado era classificado anteriormente como um complexo de espécies, mas a partir da descrição das espécies *T. cremeum*, *T. surrotundum*, *T. sinuosum*, *T. chlorosporum*, e *T. thelephoricola*, foi revelado uma relação filogenética bem suportada entre as espécies através dos valores de *bootstrap* utilizando os genes *rpb2* e *tef1*. Deste modo os autores do trabalho decidiram classificar esse grupo como clado (CHAVERRI e SAMUELS, 2003).

*Trichoderma costaricense* (INB 0003527695.) foi coletado na Costa Rica. Uma característica desse isolado é a baixa resistência em temperaturas mais baixas, morrendo ao alcançar a temperatura de 4°C. *T. surrotundum* (G.J.S. 88-73), *Trichoderma cremeum* (ATCC:MYA-2862), *Trichoderma sinuosum* (BPI:843649) e *Trichoderma thelephoricola* (G.J.S. 95-135) foram coletados em diferentes regiões dos Estados Unidos, sendo que todas essas espécies foram coletadas a partir de lascas de madeira (CHAVERRI e SAMUELS, 2003). Apesar de apresentarem semelhanças morfológicas e serem isoladas de ambiente de solo ou como endofíticos, uma espécie do Clado *Chlorosporum*, *T. sinuosum*, já foi encontrada em ambiente clínico e, apesar de não ter comprovação sobre sua ação como agente etiológico de infecções, ele demonstrou uma capacidade de crescer em temperaturas próximas do 40°C, o que pode indicar um possível papel patogênico desse fungo (SANDOVALDENIS et al., 2014).

*T. zonatum* (HMJAU 34820 e HMJAU 34825), *T. rosulatum* (HMAS 252548) e *T. brevicrassum* (HMAS 248871), foram coletados a partir de amostras de solo na china (ZHU e ZHUANG, 2015; CHEN e ZHUANG 2017; ZHU et al., 2017). Apesar de *T. brevicrassum* ser uma espécie descoberta recentemente, o isolado TC967 foi utilizado em estudo, desempenhando um bom papel de biocontrole e promovendo o crescimento de pepino, além de apresentar alta atividade de quitinase contra o *Rizoctonia solani*, fungo fitopatogênico que afeta diversas plantações de interesse econômico, como pepino, batata, arroz, feijão, cebola, dentre outras (SINGH et al., 2002; BREWER e LARKIN, 2005; ZHANG e ZHUANG, 2020). Outras aplicações biotecnológicas/biocontrole que esses fungos apresentam, já conhecida são a produção de antibióticos peptaibols, o que já foi comprovado em isolados de *T. thelephoricola* (ROHRICH et al., 2015); Um isolado de *T. cremeu* apresentou

bons resultados na promoção de crescimento, além da atividade na inibição do crescimento radial de algumas espécies fúngicas como *Fusarium oxysporum* (VINALE et al., 2016), fitopatógeno de difícil combate na agricultura de plantas como a banana (*Musa spp*). O potencial que *T. chlorosporum* apresenta no biocontrole e promoção do crescimento vegetal em orquídeas medicinais é outro exemplo de possibilidades para este clado (YUAN et al., 2008).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta e isolamento de cepa

O isolados de *Trichoderma* foram obtidos de uma amostra de serrapilheira coletada no período de 28 de agosto de 2012, em uma Área de Proteção Ambiental na restinga de Guaibim, BA (13° 16' 10"S 38° 57' 33" W). A amostra foi classificada como MTS, abreviação referente a Mata Sul. Antes do isolamento a amostra foi armazenada a 4°C. O material de serapilheira foi preparado utilizando 25g da amostra e diluído até alcançar a concentração de  $10^{-3}$ , onde essa diluição foi estriado em placa de Petri com 15 cm de diâmetro contendo ágar suplementado com 100 mg/L de cloranfenicol, meio de cultura seletivo para fungos celulolíticos, sendo posteriormente incubadas a 25°C. A colônia do isolado foi transferida para placas de petri de 9 cm de diâmetro após 5 dias, com meio de cultura ágar extrato de malte e incubadas a 25°C, tempo suficiente para o início da conidiação. Plugs de 5mm de diâmetro das colônias com 4 dias foram transferidas para tubo de 2,0 mL contendo 1,0 mL de salina e agitado fortemente. Em placas de petri de 9 cm contendo ágar extrato de malte as amostras foram espalhadas na diluição de  $10^{-5}$  e incubadas a 25°C. Uma microcolônia foi transferida para placas de petri após 1 dia, contendo ágar extrato de malte e incubadas a 25°C por 7 dias, sendo salvas pelo método de Castellani. A amostra foi identificada como MTS29 e acrescentada ao acervo de culturas microbiológicas, mantido no Laboratório de Biologia Evolutiva (LABEV) na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

#### 3.2 Recuperação de sequências de nucleotídeos

As sequências de *tef1* dos isolados do Clado *Chlorosporum* foram recuperadas a partir base de dados; coleção de nucleotídeos, disponível no

banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Para a obtenção dessas sequências foi realizada a busca a partir do nome da espécie e através do *Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide* (BLASTN), no qual foram posteriormente recuperadas todas as sequências do gene relacionados a espécies deste clado, mesmo aqueles que não tem sua classificação a nível de espécie. Essas buscas foram realizadas em maio de 2022. Ainda foram recuperadas as sequências do *rpb2* de todas as espécies relacionadas ao Clado *Chlorosporum*. Alguns isolados possuíam apenas o *tef1* e alguns isolados apenas o *rpb2*, porém a maior parte dos isolados possuem ambos os genes sequenciados e a sequência depositada na base de dados.

### 3.3 Extração de DNA

Foi realizada extração de DNA do isolado MTS29, do gênero *Trichoderma* a partir da coleção de fungos armazenados no Laboratório de Biologia Evolutiva – LABEV, de espécies da restinga da APA de Guaibim-BA. O fungo foi colocado para crescer em placas, com 3-5 repetições, após o fungo crescer o micélio foi removido e colocado em almofariz. Após essa etapa foi adicionado nitrogênio líquido de modo a permitir o rompimento de estruturas celulares de maneira que o DNA seja exposto. Foi utilizado 1,0 ml de CTAB, tampão utilizado para realizar a extração é adicionado no almofariz juntamente com o micélio macerado, em seguida a amostra é colocado em um eppendorf de 2,0 ml e levado ao banho-maria a 65°C por 30 min, sendo que a cada 10 min os tubos foram agitados manualmente e colocado no banho-maria até finalizar os 30 min, ou seja, essa agitação foi realizada 3 vezes. Depois é adicionado 650 uL de clorofórmio: álcool isoamílico (CIA-24:1) e misturados manualmente até formar emulsão. Depois que a emulsão é formada os tubos serão levados para centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos, processo realizado 3 vezes, depois de cada passagem na centrifuga o material passou por lavagem e a cada lavagem o sobrenadante foi recuperado. Após a recuperação do sobrenadante um volume igual de isopropanol gelado foi adicionado e em seguida a amostra foi colocada por 10 min em um ultrafreezer à – 80°C ou 24 horas em temperatura -20°C. Depois de resfriada, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante descartado. O pellet formado foi lavado duas vezes com etanol 70 %, e levado para ser secado em temperatura ambiente em uma estufa previamente estéril e ligada. Após a secagem o pellet foi ressuscitado em 49 µL de TE contendo 0,30 µg. mL<sup>-1</sup> de

RNAse em concentração final, a amostra foi incubada por 30 minutos em banho-maria a 37° C para a ressuspensão do DNA e ação enzimática da RNAse.

### 3.4 Amplificação e sequenciamento

A amplificação e o sequenciamento das regiões de interesse dos genes *tef1* e *rpb2* foram feitas utilizando os *primers* F- TEF1-728 F e TEF1LLErev para o *tef1* e fRPB2-5F e fRPB2\_7cR para o *rpb2*. as reações de PCR seguiram as programações seguidas de acordo com o proposto por Liu et al., (1999) e Jacklistch et al., (2005). Os resultados obtidos a partir do PCR foram purificados com o kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit GE Healthcare, em seguida eles foram enviados para a ATCgene Análises Moleculares Ltda, empresa responsável para fazer o sequenciamento, o sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). As sequências foram editadas no programa DNA Dragon 1.1.9.1 Sequence Contig Assembler Software.

### 3.5 Análises filogenéticas

As sequências foram recuperadas a partir do NCBI no formato FASTA, de modo que os dados estivessem em um formato de leitura acessível para o MAFFT (*Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences*) (KATO et al., 2009, 2019), nele foi realizado o alinhamento múltiplo. O arquivo de alinhamento múltiplo de saída do MAFFT, em formato FASTA, foi editado no MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) e no MEGA 11 (TAMURA et al., 2013, 2021), de modo que deixamos apenas a região 2 do *tef1*, que utilizamos na filogenia, no ASAP e para calcular a identidade. O programa *JmodelTest* 2.1.6, foi utilizado para avaliar os melhores modelos evolutivos, o modelo HKY (Hasegawa-Kishino-Yano) + G (distribuição Gamma), para o *tef1* e *rpb2*. As análises filogenéticas foram realizadas na plataforma CIPRES (<https://www.phylo.org/>), os arquivos formato FASTA foram convertidos para arquivos de entrada formato NEXUS. Para realizar as análises no RAxML on XSEDE, os arquivos NEXUS, foram convertidos em *relaxed Phylip*, e o modelo utilizado na análise foi o GTRGAMMA com 1000 *bootstraps* obtendo a árvore mais verossímil. Para realizar as inferências Bayesianas foi utilizado o MrBayes 3.2, com o método algorítmico Monte Carlo de Cadeia de Markov (MCMC). As

árvores geradas foram visualizadas no FigTree v1.4.4 e editadas no CorelDraw 2020.

### **3.6 Identidade e delimitação de espécies baseadas em sequência**

Para determinar os limites entre as espécies do Clado *Chlorosporum*, o software ASAP (*Assemble Species by Automatic Partitioning*) foi utilizado, este web-service calcula a divergência entre as sequências formando grupos ranqueados, quanto mais alto os valores, mais divergentes as sequências são (PUILLANDRE et al., 2021). Com a formação de grupos foi feita uma análise de identidade na ferramenta BLASTN entre as sequências dos grupos e as sequências dos isolados tipos com os diferentes grupos formados.

### **3.7 Atividade antagônica e avaliação na produção de compostos orgânicos voláteis *in vitro* contra *Aspergillus welwitschiae* e *Moniliophthora perniciosa***

Foram feitas suspensões de esporos 1 mL de ágar-água dos isolados utilizando 5 µl para inoculação, com exceção do isolado de *M. Perniciosa*, que foram utilizados discos de 5 mm de diâmetro do micélio feito com colônias crescidas previamente entre 10 e 12 dias. Os ensaios de antagonismo foram realizados em placas de Petri de 9 cm contendo o meio BDA com os fungos (fitopatógeno e agente de biocontrole) sendo inoculados a 0,5 cm da borda da placa e 8 cm de distância entre eles, além de serem feitas placas controle (apenas com o fitopatógeno ou somente com o agente de biocontrole), as placas foram seladas com papel filme e incubadas em BOD a 25° por 5 dias, ensaio adaptado do experimento de Magalhães et al., (2017) que incubou em BOD a 28°C por 10 dias. Para a avaliação dos COVs, o material biológico foi inoculado no centro de uma placa de Petri de 9 cm, em seguida as placas foram colocadas fundo com fundo e a parte interna de uma placa ficou voltada para a parte interna da outra placa, com uma barreira física feita com papel filme de modo que um fungo não possa entrar em contato com o outro e, foram feitas 15 perfurações para permitir que os COVs possam passar de uma placa para a outra, as placas foram seladas com papel filme e colocadas em BOD a 25° por 14 dias. Os experimentos tiveram quatro repetições e foram repetidos integralmente duas vezes. Para avaliar a inibição dos fitopatógenos foi comparado o crescimento

deles na presença e na ausência do agente de biocontrole e foram realizadas medições a cada 24 horas até o final do experimento.

### **3.8 Análise morfológica**

As análises morfológicas foram realizadas com três repetições no tempo e em triplicata para cada isolado, utilizando os meios Ágar Nutriente Sintético (SNA), Ágar farinha de milho (CMD) e Ágar Batata Dextrose (BDA), à 25 °C por 7 dias, utilizando placa de plástico com 20 ml de meios de cultura. A inoculação foi realizada utilizando suspensão de esporo de 1 ml de ágar-água e utilizado 3 µl dessa suspensão para inoculação. As características macromorfológicas analisadas nesse período foram, o tipo de crescimento, formação do micélio aéreo, início da conidiação, início da produção de pústulas, a cor da colônia, exsudato e pigmentos solúveis. Assim como sua taxa de crescimento após 72 horas. As características microscópicas analisadas como conídio, clamidósporo, conidióforos, fiálides e pústulas dos isolados fúngicos foram analisadas em microcultivos em placas de Petri, a preparação das lâminas ocorreu entre 7 e 10 dias, com ácido láctico e visualizadas utilizando o microscópio óptico. O comprimento e largura do clamidósporo, conformação do conidióforo, comprimento e largura das células oriundas das fiálides bem como a largura da base e o comprimento e largura do ponto mais largo das fiálides e comprimento e largura das pústulas. A foto documentação das colônias foi registrada com câmera Canon T6i, já estruturas microscópicas foram foto documentadas através do microscópio Zeiss Axio Imager.A2 e Leica.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Caracterização das sequências de *tef1* recuperadas**

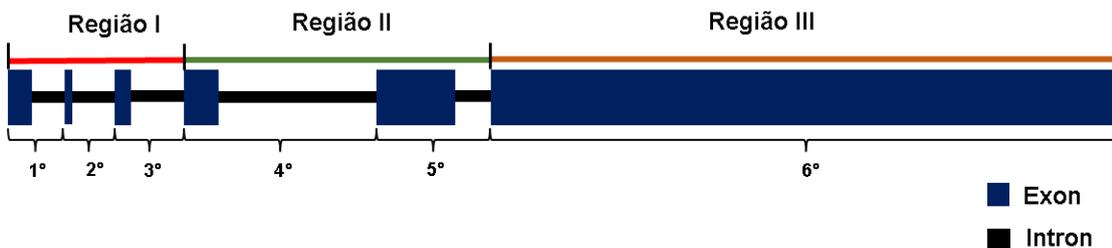
Para realizar o alinhamento múltiplo é necessário que as sequências de bases estejam corretamente alinhadas, a fim gerar sinal filogenético. Deste modo para auxiliar na análise determinamos regiões do *tef1* de acordo com a localização dos exons e introns. Foi estabelecido um critério que definiu 3 regiões para o gene. As regiões foram nominadas como região I (início do primeiro exon

ao final do quarto exon), II (início do quarto intron até o final do quinto intron) e III (sexto exon) (Figura 1).

As sequências do *tef1* recuperadas no banco de dados do NCBI variaram em comprimento de 861 a 1194 nucleotídeos, tendo uma cobertura sobre a maior parte do gene. Alguns isolados recuperados nos bancos de dados não possuem a região II e/ou região III sequenciada, desta forma para realizar o alinhamento múltiplo do *tef1* isolados sem essas 2 regiões e isolados apenas com a região I foram descartados para evitar ruídos filogenéticos.

Foram recuperadas as sequências de *tef1* de 77 isolados relacionados ao Clado *Chlorosporum* (Tabela 1), essas sequências estão distribuídas em 10 espécies conhecidas: *T. brevicrassum*, *T. chlorosporum*, *T. costaricense*, *T. cremeoides*, *T. cremeum*, *T. rosulatum*, *T. sinuosum*, *T. surrotundum*, *T. thelephoricola* e *T. zonatum*, além de 3 isolados ainda não classificados taxonomicamente a nível de espécie: *T. sp.* TAMA 04, *T. sp.* 11013 e *T. sp.* 10308 (Tabela 1).

**Figura 1** - Esquema do *tef1* e as regiões propostas



Autor: Lenon Lima de Santana, 2022

**Tabela 1** – Número de acesso do *tef1* e *rpb2* dos isolados relativos identificados no Clado *Chlorosporum* recuperados do NCBI e utilizados neste estudo.

Nome	Strain	Número de acesso no GenBank	
		RPB2	TEF1- $\alpha$
<i>Trichoderma brevicrassum</i>	HMAS:248871	KY688008.1	KY688064.1
	HMAS:248872	KY688009.1	KY688065.1
<i>Trichoderma chlorosporum</i>	G.J.S. 98-1	AY391906.1	AY737737.1; AY391968.1
	DAOM:232832/ G.J.S. 88-33	KJ842194.1/ AY391903.1	KJ871143.1/ AY391966.1
	P.C. 4	AY391907.1	AF328561.1 <sup>1</sup>
	G.J.S. 95-88	AY391905.1	
	G.J.S. 91-150	AY391904.1	AY391967.1 <sup>2</sup>
<i>Trichoderma costaricense</i>	PC 21	AY391921.1	AY737741.1; AY391980.1
<i>Trichoderma cremeum</i>	DAOM:176235D		KJ871141.1
	BMCC:LU627		KJ871138.1
	AN392		JX184094.1
	GJS 91-125	AF545511.1	AY737736.1; AF534598.1
	DAOM:231312	KJ842195.1	KJ871140.1
	TAMA 0186	AB856752.1	AB856679.1
	G.J.S. 02-52	AY391922.1	AY391981.1 <sup>2</sup>
	S112	KF134790.1	
	NNIBRFG22286	MW073294	
<i>Trichoderma cremeoides</i>	S117		KJ665458.1
	S98		KJ665463.1
	S192	KJ665254.1	KJ665460.1
	S113		KJ665457.1
	S191		KJ665459.1
	S112	KJ665253.1	KJ665456.1
	S431		KJ665462.1
	S207		KJ665461.1
<i>Trichoderma miltoni</i>		OQ677418	OQ677412
<i>Trichoderma rosulatum</i>	7752	KF730005.1	KF729984.1
<i>Trichoderma sinuosum</i>	HMAS:252541	KF730003.1	KF729983.1
	HMAS:252542	KF730006.1	KF729985.1
	S333		KJ665727.1
	PC8/ DAOM:232839	AY391942.1/KJ842198.1	AY737743.1; AY391997.1/
	C.P.K 2008		KJ871139.1
	C.P.K 1595	FJ179619.1	FJ860698.1
	S349	KJ665341.1	FJ860697.1
	S270	KJ665339.1	KJ665728.1
	S378	KJ665342.1	KJ665723.1
	S274		KJ665729.1
	S295		KJ665724.1
	S276	KJ665340.1	KJ665726.1
	S158	KJ665338.1	KJ665725.1
	uthsc:07-3543		KJ665722.1
	Tc25		HG931262.1
	G.J.S 90-117	AY391928.1	KP890332.1
	G.J.S. 90-38	AY391930.1	AY391987.1 <sup>2</sup>
	G.J.S. 90-41	AY391931.1	AY391988.1 <sup>2</sup>
	G.J.S. 90-88	AY391932.1	AY391989.1 <sup>2</sup>
	G.J.S . 91-72	AY391933.1	AY391990.1 <sup>2</sup>
	G.J.S. 92-79	AY391934.1	
	G.J.S. 95-147	AY391935.1	AY391991.1 <sup>2</sup>
	G.J.S. 95-203	AY391936.1	AY391992.1 <sup>2</sup>
	G.J.S. 95-205	AY391937.1	AY391993.1 <sup>2</sup>
	G.J.S. 95-206	AY391938.1	
	G.J.S. 95-209	AY391939.1	
	G.J.S. 97-205		AY391994.1 <sup>2</sup>
	G.J.S. 97-221	AY391940.1	AY391995.1 <sup>2</sup>
	G.J.S. 98-163	AY391941.1	AY391996.1 <sup>2</sup>
	P.C. 9	AY391943.1	AY391998.1 <sup>2</sup>
	G.J.S. 90-131	AY391929.1	
<i>Trichoderma sp.</i>	TAMA 0434	AB856753.1	AB856680.1
<i>Trichoderma sp.</i>	11013	MF095882.1	MF095884.1
<i>Trichoderma sp.</i>	10308	MF095883.1	MF095885.1
<i>Trichoderma surrotundum</i>	GJS 8873	AF545540.1	AY737734.1; AF534594.1
	DAOM:231315	KJ842196.1	
<i>Trichoderma thelephoricola</i>	9368	KU051701.1	KU051706.1
	9287	KU051700.1	KU051705.1
	DAOM:232843	KJ842197.1	KJ871136.1
	C.P.K 2480		FJ860712.1
	CBS 120925	FJ860600.1 JQ685886.1	FJ860711.1
	S572		KJ665752.1
	S577		KJ665753.1
	CBS 121138	FJ860601.1	
	GJS 95-135	AY391958.1	AY392006.1; AY737735.1
<i>Trichoderma zonatum</i>	220	MF374806.2	MF374809.1
	225	MF374807.2	MF374810.1

<sup>1</sup> Sequencias excluida por ser curta

<sup>2</sup> Somente região III (figura 1)

## 4.2 Filogenias e delimitação de supostas novas espécies pelo ASAP e valores de identidade entre os AGP

As espécies estudadas tiveram suas sequências de *tef* e *rpb2* recuperadas da base de dados NCBI para realizar as análises filogenéticas, incluindo espécies filogeneticamente relacionadas. Contudo alguns isolados não foram incluídos nas análises combinadas dos genes por possuírem apenas o *rpb2*, todos os números de acesso estão disponíveis na tabela 1.

O isolado descrito como *T. chlorosporum* P. C. 4, possui uma sequência do *tef1* muito curta e que estava interferindo nos resultados, por isso decidimos removê-la, apesar da sequência ser curta também notamos que esse fragmento é idêntico ao outro isolado do AGP17, *T. chlorosporum* DAOM:232832.

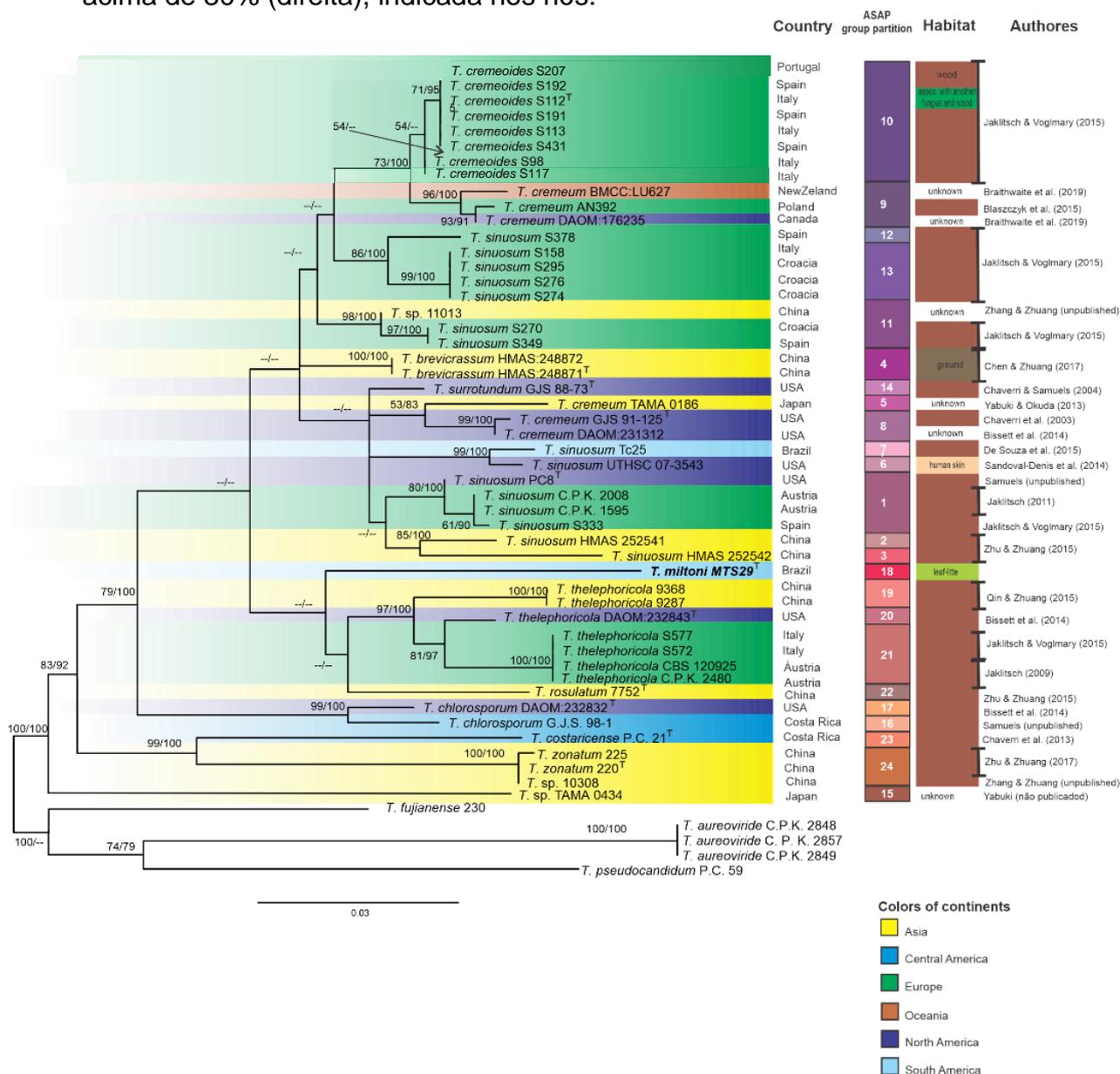
Os isolados incluídos nas análises são aqueles que possuem as regiões II e III do *tef1*, sendo *T. sinuosum* a espécie mais representada foi com 13 isolados, as análises indicam que não é um clado monofilético (Figura 2). Outra espécie que não apresentara monofilia é *T. cremeum*, que tem 5 isolados em 2 cladogramas distintos da árvore. Os cladogramas formados pela análise do *tef1* possuem valores estatísticos bem consistentes na composição para isolados estreitamente mais relacionados, com valores de *bootstrap* para máxima verossimilhança e inferência bayesiana, como o grupo formado por *T. thelephoricola* com valores de 100 para ambas as análises.

*Trichoderma sinuosum* está presente em diversos cladogramas da árvore filogenética, todos esses cladogramas possuem valores estatísticos consistentes, indicando que estes isolados não são filogeneticamente relacionados. Algumas espécies foram utilizadas como grupo externo, *T. virescentiflavum*, *T. thailandicum*, *T. aureoviride*, *T. fujianense* e *T. pseudocandidum*, de modo a aumentar o sinal filogenético aumentando o número de sítios não ambíguos e reduzindo a probabilidade de termos homoplasias.

Estas análises foram realizadas de modo a entender a relação dos isolados e inferir possíveis novas espécies com o auxílio do ASAP. O resultado da análise para delimitação de espécie encontrou um total de 22 grupos de partição para os 50 isolados do Clado *Chlorosporum*, desconsiderando os isolados que compõem o grupo externo. No ASAP *partition group* (APG) a formação dos grupos está diretamente relacionada com os cladogramas da árvore

filogenética, com exceção do AGP 6 que é indicado em 2 pontos distinto da árvore e por espécies Tipo diferente (Figura 2).

**Figura 2** – Filogenia de máxima verossimilhança revelada por RAxML a partir de uma análise do alinhamento da sequência do *tef1* de isolados do Clado Chlorosporum. O clado contendo *T. aureoviride*, *T. pseudocandidum* e *T. fujianense*, foi usado como grupo externo MV acima de 50% (esquerda), PP acima de 80% (direita), indicada nos nós.



Autor: Lenon Lima de Santana, 2022

Os APGs 1, 6, 7, 12, 14, 15, 17, 19, 20 e 21 contém o Tipo das 10 espécies descritas no clado. Para inferir sobre possíveis novas espécies usamos os dados fornecidos pelo ASAP, combinados com a biogeografia, filogenia e quando

possível ao substrato no qual o fungo é encontrado. *Trichoderma sinuosum* está presente nos AGPs 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 e 11, indicando que para além do grupo no qual a espécie tipo está incluso, os outros AGPs indicam pelo menos 7 novas espécies que até o momento estão descritas como *T. sinuosum* (Tabela 2).

O AGP 2 é formado por 3 isolados descritos como *T. cremeum*, porém o isolado Tipo está presente no AGP 12, que contém outro isolado relacionado a essa espécie, ambos encontrados nos Estados Unidos. Além desses 2 grupos o AGP13 tem apenas 1 integrante relacionado a *T. cremeum*, porém a análise de ASAP e a localização indicam que essa espécie apesar de próxima filogeneticamente de *T. cremum*, representa uma nova espécie (Tabela 2).

A espécie que homenageia o nome do clado está representada em 2 AGP (6 e 15), os isolados do grupo 6 foram coletados nos Estados Unidos, enquanto o isolado do grupo 15 foi isolado na Costa Rica, além dessas diferenças a filogenia tem valores de nós que separam esses 2 grupos muito bem suportados pelas análises de Máxima Verossimilhança (MV) e baesiana. A situação dos isolados relacionados a *T.thelephricola* é semelhante pois os 2 AGP (16 e 17), são separados também pelos valores estatísticos presentes na árvore filogenética e pela localização geográfica, na qual o grupo 16 os 4 isolados estão presentes exclusivamente na Europa, enquanto o grupo 17 tem dois isolados da China e 1 dos Estados Unidos. A espécie descrita neste trabalho, *T. miltoni* sp. nov., tanto nas análises filogenéticas do *tef1* e do *rpb2*, bem como no APG (18) é separado de todas as outras espécies do clado indicando que é uma nova espécie, além de ser a única espécie deste trabalho coletada em serapilheira (Figura 2).

Os valores de identidade foram calculados através do algoritmo do programa BLAST. As identidades entre os isolados de um mesmo AGP foram superiores a 98,56%, já os valores de identidade entre isolados de diferentes AGP e os tipos variaram de 82,81% à 98,95% (tabela 2).

**Tabela 2** – Identidade dos isolados de *Trichoderma* do Clado *Chlorosporum* agrupados de acordo de acordo com o ASAP.

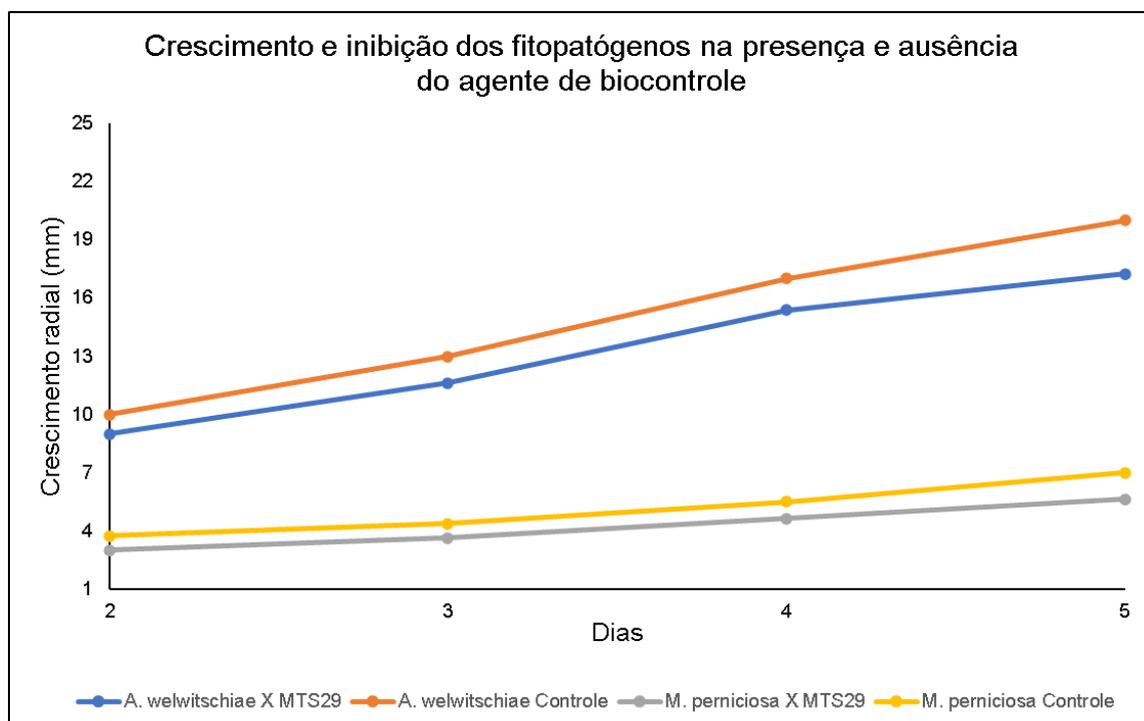
	Possíveis novas espécies	Variação do <i>tef1</i> nos ASAP group Partitions (%) Varia	Variação do <i>tef1</i> com as espécies Tipo do Clado <i>Chlorosporum</i> (%)										
			<i>T. brevicrassum</i>	<i>T. chlorosporum</i>	<i>T. costaricense</i>	<i>T. cremeoides</i>	<i>T. cremeum</i>	<i>T. miltoni</i>	<i>T. rosulatum</i>	<i>T. sinuosum</i>	<i>T. surrouundum</i>	<i>T. thelephorica</i>	<i>T. zonatum</i>
AGP1	Não	98,76-99,58	94,57-94,97	91,27-91,70	86,21-86,65	94,22-94,43	95,09-95,29	89,04-89,06	86,11-86,35	*	98,60	91,43-91,65	84,51-85,07
AGP2	Sim	-	94,74	92,09	87,00	94,83	95,49	89,21	87,34	96,42	98,24	92,89	85,13
AGP3	Sim	-	92,90	90,43	83,88	92,11	92,99	87,15	85,35	93,92	95,79	90,41	82,81
AGP4	Não	100	*	92,46	87,11	95,63	95,91	90,38	87,69	95,50	95,10	93,49	85,84
AGP5	Sim	-	95,53	91,20	85,02	94,36	96,96	88,25	86,61	94,09	97,25	92,41	84,33
AGP6	Sim	-	94,95	90,70	86,59	94,41	94,84	88,35	87,15	95,80	97,57	91,83	85,59
AGP7	Sim	-	95,27	91,25	85,71	94,41	94,84	88,54	87,79	95,97	97,92	91,83	85,94
AGP8	Não	100	95,73-95,94	91,91-92,21	85,87-86,09	96,73-96,95	*	89,31-89,53	88,06-88,27	95,09-95,30	97,59-97,94	93,16-93,38	85,19
AGP9	Sim	98,56-100	95,44-95,66	92,42-92,75	85,68-87,91	97,19-97,86	96,33-96,88	90,29-90,62	88,03-89,01	94,16-95,11	96,47-97,20	93,99-94,00	86,15-86,78
AGP10	Não	99,14-100	95,07-95,87	92,68-93,30	85,38-86,28	*	96,38-97,01	89,73-90,36	88,18-88,82	94,42-94,65	97,54	93,42-93,98	86,31
AGP11	Sim	100	94,49-94,85	90,99-91,63	86,38-87,05	94,53-95,19	94,30-94,66	89,57-90,25	87,77-88,41	93,36-94,00	98,60-98,95	92,66-93,30	84,58-85,12
AGP12	Sim	-	94,44	91,90	86,31	93,86	95,96	88,86	86,78	94,00	97,11	92,31	85,81
AGP13	Sim	100	94,44-95,10	90,66-90,68	85,68	95,42	95,53-95,54	88,89	85,74	94,68	98,59	91,88	84,76
AGP14	Não	-	95,10	94,27	90,29	97,54	97,59	94,22	89,72	98,60	*	95,76	85,11
AGP15	Sim	-	88,02	89,29	84,97	86,81	89,16	0,86	84,34	88,57	90,76	89,59	86,62
AGP16	Não	-	92,34	97	84,70	92,89	92,06	88,29	87,70	92,21	93,68	91,96	87,47
AGP17	Sim	-	91,90	*	84,63	92,11	91,04	88,76	86,48	90,97	93,97	90,32	86,20
AGP18	--	-	90,38	89,44	84,22	89,73	89,31	*	86,74	89,06	94,22	90,29	84,11
AGP19	Sim	100	91,28-94,8	90,69-92,22	88,66-89,18	92,19-94,57	91,30-93,71	88,84-90,38	87,63-90,49	89,62-92,63	95,41	96,13-98,55	85,82-86,96
AGP20	Não	-	93,36	91,70	87,25	93,44	93,16	90,29	89,03	91,65	95,76	*	87,38
AGP21	Sim	100	91,86	91,78	87,25	91,47	91,67	88,55	87,74	89,72	94,35	96,75	86,92
AGP22	Não	-	88,68	88,44	83,33	88,21	91,67	86,74	*	86,35	89,72	89,03	83,60
AGP23	Não	-	87,78	86,52	*	86,28	86,09	84,11	83,33	86,65	90,29	87,25	89,89
AGP24	Não	99,79-100	85,62-85,84	87,09-87,32	89,60-89,98	86,08-86,31	85,19-85,65	84,11	83,60-83,83	84,71-85,00	85,11	87,15-87,38	*

(-) representam os AGP que só possuem 1 isolado, (\*) indica o AGP que o isolado Tipo faz parte, (--) AGP da espécie descrita neste trabalho.

### 4.3 Ação de antagonismo direto e produção de compostos orgânicos voláteis de *T. miltoni*

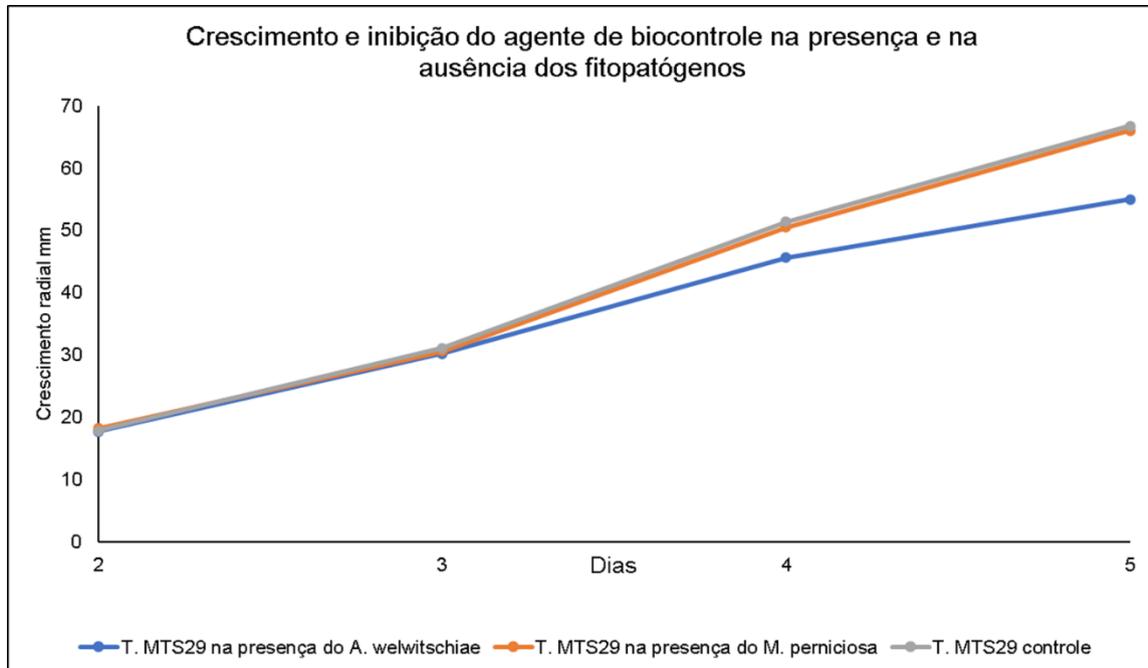
A espécie recém-descoberta do Clado *Chlorosporum*, foi testada contra os fitopatógenos *Aspergillus welwitschiae*, causador da podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana*) e *Moniliophthora perniciosa*, agente etiológico da vassoura-de-bruxa do *Theobroma cacao* (cacau) (Duarte et al., 2018; Evans, 1978). Os testes envolveram avaliação da existência de antagonismo direto em experimentos de cultura dupla (Figura 5). Este resultado tem como objetivo trazer para além da descoberta de uma espécie nova, potenciais aplicações que ela poderia ter. Os ensaios de antagonismo indicaram que *T. miltoni* consegue inibir o crescimento tanto do *A. welwitschiae* (Figura 3), quanto da *M. perniciosa* (Figura 3), no entanto a espécie do gênero *Aspergillus* também conseguiu inibir o crescimento do *Trichoderma* (Figura 4).

**Figura 3.** Taxa de crescimento dos fitopatógenos *A. welwitschiae* e *M. perniciosa*, na presença e na ausência do agente de biocontrole (*T. MTS29*), para observar a inibição dos fitopatógenos.



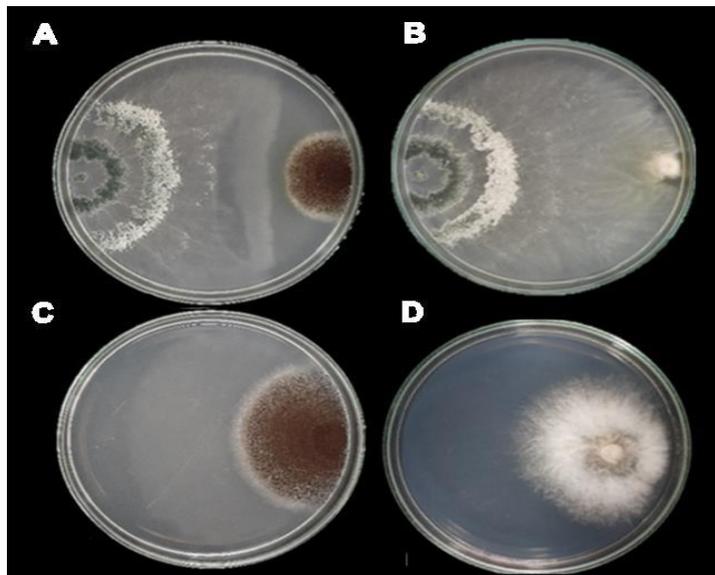
Autor: Lenon Lima de Santana, 2022

**Figura 4.** Crescimento da colônia do *T. MTS29* na presença dos fitopatógenos *A. welwitschiae* e *M. perniciososa*, comparados com o crescimento do controle (*T. MTS29* crescendo sozinho em uma placa) ao longo de 5 dias, para observar se houve inibição.



Autor: Lenon Lima de Santana, 2022

**Figura 5.** Ensaio de Antagonismo mostrando relação de antibiose e parasitismo. Tratamentos: *T. sp. nov.* strain MTS29 contra *A. welwitschiae* (A) e *M. perniciososa* (B). Controles: *A. welwitschiae* (C); *M. perniciososa* (D).

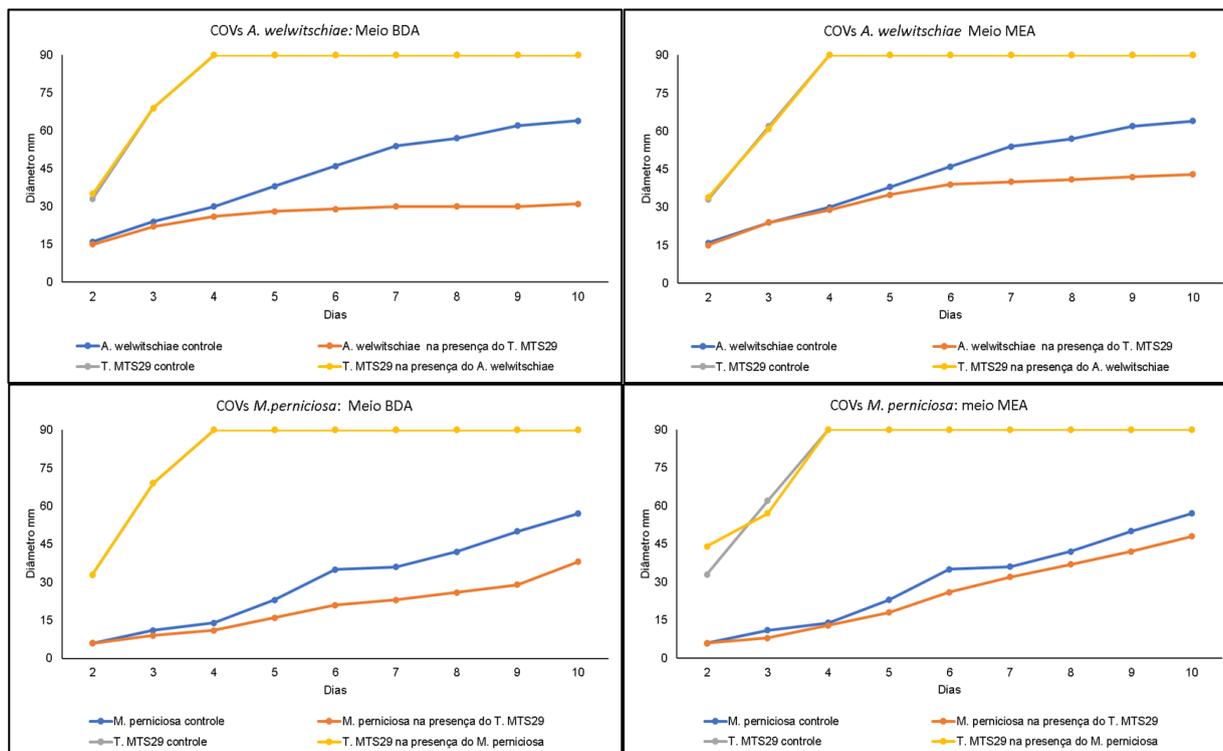


Autor: Lenon Lima de Santana, 2022

Os ensaios de compostos voláteis mostraram que o *T. MTS29*, conseguiu inibir os dois fitopatógenos em diferentes meios de cultura (BDA e MEA). No meio MEA a inibição do crescimento micelial foi de 32,8% para o *Aspergillus* e

de 15% para o *Moniliophthora*, enquanto no meio BDA os valores de inibição micelial aumentaram substancialmente, sendo 51% para o *Aspergillus* e 33% para o *Moniliophthora* (Figura 6).

**Figura 6.** Ensaios de compostos voláteis indicando a taxa de crescimento do agente de biocontrole e dos fitopatógenos em milímetros ao longo de 10 dias, com o fitopatogeno sempre no meio BDA e o agente de biocontrole em diferentes meios. Agente de biocontrole crescendo em meio BDA (A e C) e o agente de biocontrole crescendo no meio MEA (B e D).

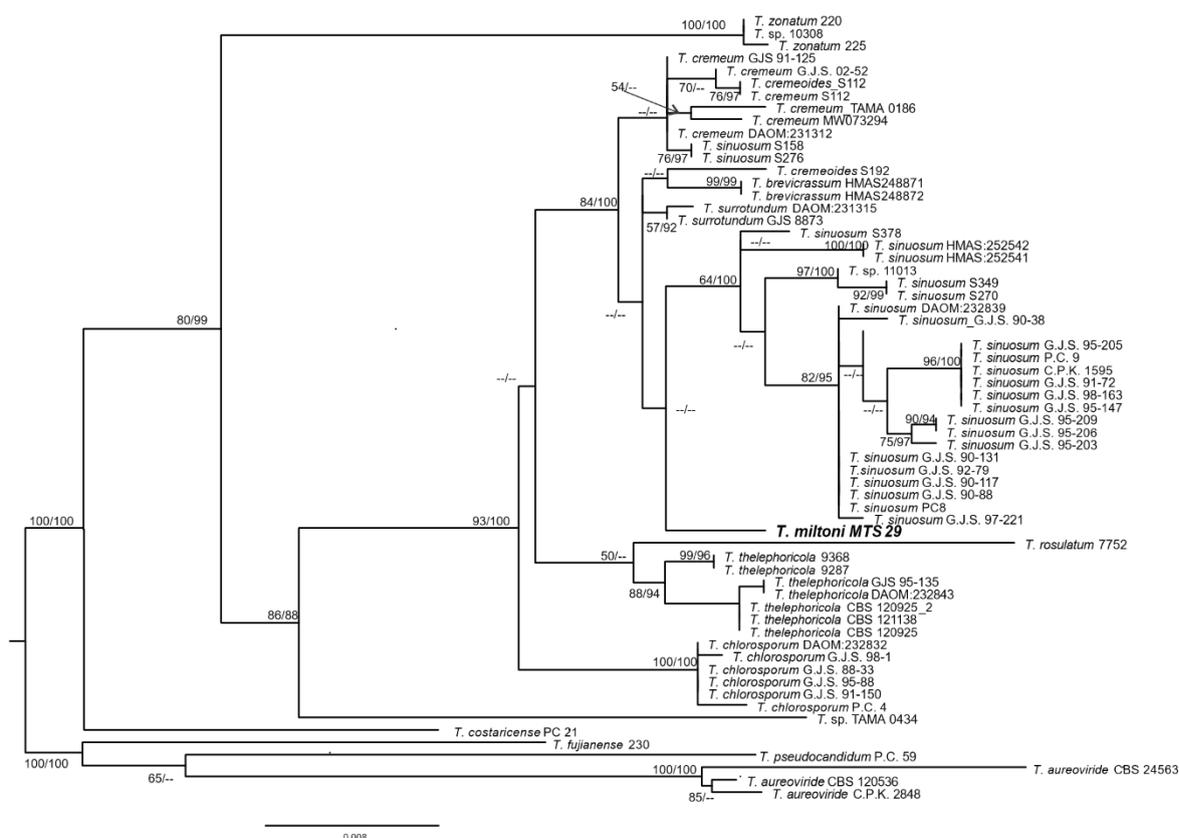


#### 4.4 Descrição de *Trichoderma miltoni* sp. nov.

Através da caracterização morfológica, fisiológica e filogenética é possível inferir que o isolado presente no AGP18 representa uma nova espécie, *Trichoderma miltoni* sp. nov. (Figura 2). A partir do resultado filogenético é possível destacar que *T. miltoni* não possui relação filogenética próxima com nenhuma outra espécie do clado, pois este isolado é apresentado de forma separada das demais espécies, porém é um membro presente do Clado chlorosporum por possuir uma maior identidade do *tef1* = 96.01% com *T. cremeoides* S117 e o *rpb2* = 99.34% com *T. surrotundum* G.J.S. 88-73. Este

resultado é corroborado pela árvore do *tef1* (Figura 2) assim como pela árvore de *rpb2* (Figura 7).

**Figura 7** – Árvore filogenética de máxima verossimilhança de *rpb2* obtida no RAxML. O clado contendo *T. aureoviride*, *T. pseudocandidum* e *T. fujianense*, foi usado como grupo externo. MV acima de 50% (esquerda), PP acima de 80% (direita), indicado nos nós.



Autor: Lenon Lima de Santana, 2022

As análises morfológicas mostraram que *T. miltoni* possui semelhanças com outras espécies do Clado *Chlorosporum*, como a aparência da colônia no meio CMD como o crescimento de poucas hifas aéreas, no entanto existem características macromorfológicas que distingue essa espécie de uma forma geral, quando comparada a outra espécie como o conidióforo mais semelhante a seção *Pachibasium-like*, enquanto outras espécies desse clado possuem o conidióforo mais semelhante ao tipo *Trichoderma-like*.

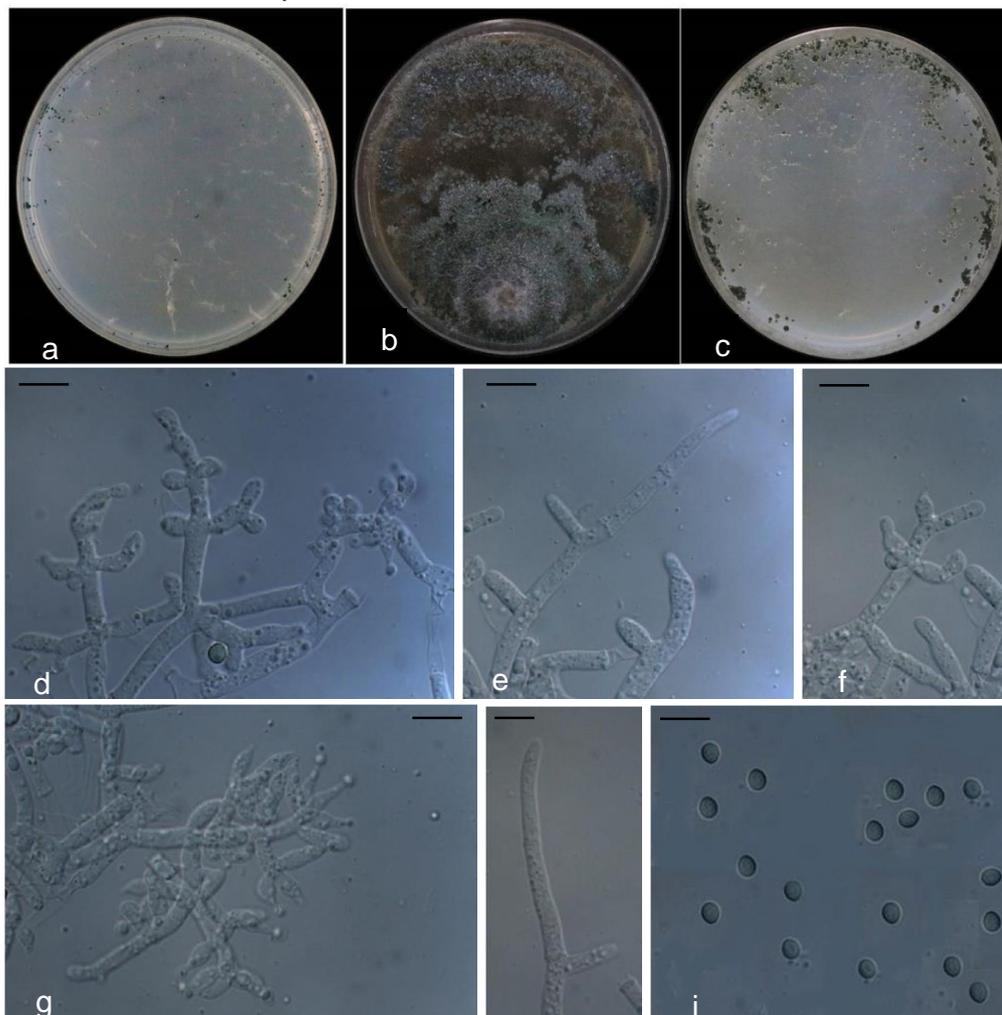
#### Taxonomia

*Trichoderma miltoni* sp. nov. De SANTANA, L. L., SALES, L. S., ANDRADE, J. P., SOUZA, J. T., MARBACH, P. A. S.

MycoBank No: Não depositado.

Etimologia: *miltoni* nomeado em homenagem ao geógrafo Milton Santos, considerado um dos grandes intelectuais do Brasil no século XX, autor de mais de 40 grandes obras como, “O Espaço dividido”, “A Urbanização Desigual”, “Espaço e Método” e “A Urbanização Brasileira”, nas quais ele se mostrava um crítico a maneira como a globalização era tratada e a quem ela beneficiava, além disto ele incluiu populações menos favorecidas através da ampliação dos estudos geográficos populacionais, dando enfoque ao desenvolvimento urbano e territorial. Destaque para o Prêmio Vautrin Lud, sendo o único brasileiro a conquistar.

Figura 8. *Trichoderma miltoni*. MTS29. – (a - c) Cultura em 7 dias a 20°C; (a) SNA, (b) BDA, (c) CMD (d - g) Em CMD 20°C; (d - e) conidióforo; (f) fialides; (g) conídio. Barras = 10µm.



Autor: Lenon Lima de Santana, 2022

Tipificação: Tipo: Brasil, Bahia, Valença, Guaibim, serapilheira.

Teleomorfo. Desconhecido

**Descrição.** Em CMD após 72h, colônia com crescimento radial 22-33mm a 20°C, micélio cobrindo a placa após 7 dias a 20°C. Colônia hialina e pouco branca, micélio vegetativo inicialmente aderido à superfície do meio de cultura com crescimento radial irregular. Hifas aéreas curtas e imperceptíveis. Pústulas brancas, solitárias e agregadas 0,3 - 1,5 x 0,4 - 1,4 mm (n=30) na periferia da placa observada em 6 dias. Conidiação observada em 7 dias presente nas pústulas, inicialmente verde-claro tornando-se verde-escuro após 10 dias. Nenhum odor distinto observado. Presença de pigmento amarelo-claro. Conidióforos *pachybasium-like*, sinuoso com ramos férteis emergindo da base, pareado ou solitário contendo 1-2 ramos, às vezes com prolongamentos estéreis no eixo principal, fialides livremente arranjadas solitárias ou pareadas, lageniformes a estreitamente lageniforme e ampuliforme, formando aglomerados na base ou em toda a estrutura. 4 - 10 (-14) x 2 - 5 µm, l/w 1 - 1,5, 2 - 4 µm largo na base (n=90) surgindo de uma célula 7 - 15 (-18) x 3 - 6 µm (n = 50). Conídios verdes, lisos, (sub)globoso e elipsoidal 1 - 4 x 1 - 5 µm, l/w 0,7 - 1, 3 (-2) (n=90). Clamidósporos não observados.

Em BDA após 72h, raio da colônia com crescimento 20-22 mm a 20°C, micélio cobrindo a placa após 11 dias a 20°C. Colônia inicialmente hialina e branca, tornando-se verde-claro em 3 dias, micélio vegetativo inicialmente aderido à superfície do meio de cultura na borda da colônia com crescimento irregular. Pústulas brancas e verde-claras observadas ao redor do inóculo em 4 dias, condensando-se em anéis concêntricos verdeescuros. Conidiação observada em 4 dias ao redor do inóculo. Nenhum odor distinto foi observado. Pigmento solúvel ausente.

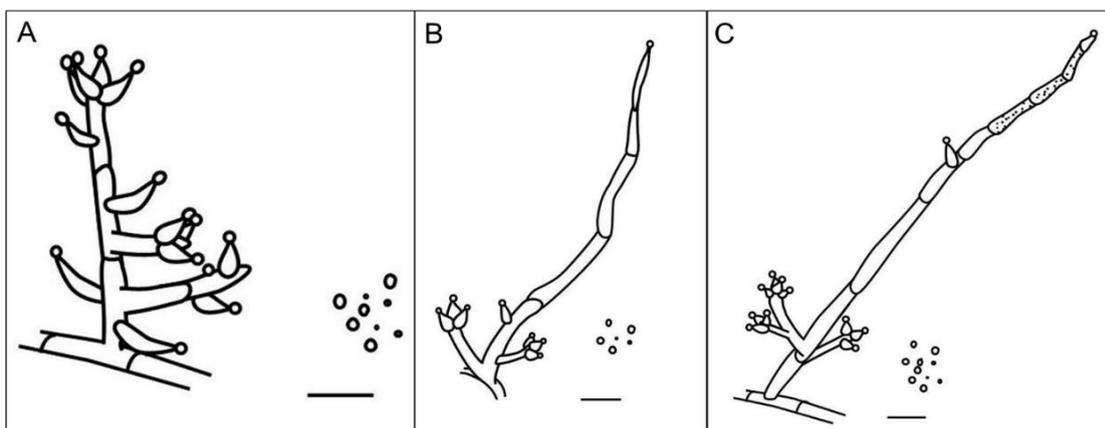
Em SNA após 72h, raio da colônia com crescimento 10-16 mm a 20 °C de diâmetro, micélio cobrindo a placa em 9 dias à 20°C, colônia inicialmente hialina, tornando-se parcialmente branca e tornando esverdeada após 9 dias, o micélio vegetativo aderiu inicialmente a superfície do meio de cultura com hifas aéreas curtas e imperceptíveis. Pústulas brancas e verdes, solitárias e agregadas na periferia da placa vista em 11 dias. Conidiação observada após 9 dias. Nenhum odor distinto foi observado. Nenhum pigmento solúvel foi notado.

**Distribuição.** América do Sul, Brasil, Bahia, Valença, praia de Guaibim.

**Nota:** *Trichoderma* sp. nov. MTS29, é semelhante a *Trichoderma chlorosporum* morfo/fisiologicamente no meio CMD. As duas espécies possuem poucas hifas aéreas, ausência de odor característico, a formação de pústulas em ambas as espécies, se concentra na região próxima a borda da placa, ambos possuem conídios (sub)globoso de textura glabra. A forma apresentada pelos conidióforos de *T.* sp. nov. MTS29, são do tipo *pachybasium-like*, enquanto o *T. chlorosporum* possui conidióforos do tipo *trichoderma-like*. Em BDA as diferenças ficam mais evidentes, enquanto *T. chlorosporum* possui muito micélio aéreo após 10 dias o *T.* sp. nov. MTS29, após 7 dias, apresenta muitas pústulas por toda a placa e pouco micélio aéreo.

Das estruturas analisadas microscopicamente os conidióforos apresentaram forma mais semelhante a seção *Pachibasium*, do que para espécies do próprio gênero *Trichoderma* (figura 9). Muitas vezes com estruturas longas e estéreis.

**Figura 9** - Representação do conioforos de *Trichoderma* sp. nov. MTS29 (A) conidióforo pachibasium reduzido; (B) conidióforo com prolongação estéril; (C) conidióforo com prolongação estéril e pontuações. Barras = 10µm.



Autor: Lenon Lima de Santana, 2022

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Adição de uma nova espécie ao Clado *Chlorosporum*

Quando o isolado MTS29 é comparado com a espécie mais próxima (*T. chlorosporum*), descrito por Chaverri et al. (2003) pode-se observar que alguns aspectos da morfologia deles se assemelham como o formato dos conídios do MTS29 que varia entre (sub)globoso e elipsoidal enquanto o *T. chlorosporum* apresenta conídios (sub)globosos, virídio e glabra, além das características macromorfológicas como a disposição das pústulas na placa, e a presença de poucas hifas aéreas, no entanto outras características já diferem, como o conidióforo do tipo pachibasium-like no isolado MTS29 e do tipo *trichodermalike* no *T. chlorosporum*, a presença de pigmentação no isolado estudado e a ausência na espécie mais próxima, tornando possível distinguir as duas espécies a olho nu, não indicando sequer uma provável espécie críptica.

Diferentes espécies de fungos do gênero *Trichoderma* possuem os conidióforos do tipo paquibásio, e apesar da estrutura que as hifas assumem nessas espécies não há dúvida quanto ao grupo ao qual eles pertencem. Em análises filogenéticas utilizando o ITS1 e ITS2, endochitinase (*ech42*) e *tef1*, feitas por Lu et al. (2004), com espécies do gênero *Trichoderma* com este tipo de conidióforo, indicou que elas formam dois grupos, um com espécies mais próximas de *T. minutisporum* e outro com espécies mais próximas de *T. polysporum*. Esses dados reforçam o fato de fungos do gênero *Trichoderma* possuírem uma alta plasticidade fenotípica.

Algumas características morfológicas são restritas a algumas espécies, porém outras podem estar presentes em várias espécies e até mesmo uma espécie apresentando mais de uma variação de conidióforo como a espécie descrita neste trabalho que possui três, conidióforo pachibasium reduzido, conidióforo com prolongação estéril e conidióforo com prolongação estéril e pontuações (figura 5). Além de apresentar também três diferentes tipos de conídios. Essas características podem estar diretamente ligadas com a capacidade dos organismos desse gênero povoarem diferentes ambientes e diferentes regiões do globo, e mesmo quando em mesma região essas espécies apresentam alta diversidade (Kubicek et al. 2003; Blaszczyk et al. 2011).

## 5.2 Limites do Clado *Chlorosporum*

Para recuperar as sequências de *tef1* e *rpb2* dos isolados do Clado *Chlorosporum* utilizamos algumas sequências de espécies já descritas como referência (Chaverri e Samuels, 2003). Realizando buscas no NCBI através da ferramenta BLASTN, onde recuperamos todas as sequências que se enquadravam nos valores definidos pelo ponto de corte. O ponto de corte estabelecido foi de aproximadamente 97% para o *tef1* e 99% para o *rpb2* (Cai e Druzhinina, 2021). Ao todo recuperamos as sequências dos 2 marcadores de 75 isolados (Tabela 1), mas para as análises realizadas fizemos uma separação com uma árvore com todas as sequências de *rpb2* (figura 7), contendo 57 isolados (Tabela 1) e para a árvore do *tef1* (Figura 2) triamos as sequências e colocamos apenas os isolados que possuem as regiões 2 e 3 do gene (figura 1) de modo a uniformizar as análises e as deixar congruente com o que foi proposto por Cai e Druzhinina (2021), totalizando 50 isolados, apenas alguns isolados não foram incluídos por não possuírem as sequências de nucleotídeos abrangendo as regiões necessárias de maneira que o resultado pudesse ser consistente. As sequências utilizadas representam todas as espécies conhecidas atualmente, e os valores de identidade entre as espécies do Clado foram superiores a 95%, indicando que toda espécie com valor de identidade abaixo representa uma espécie outro clado.

Nenhuma espécie foi encontrada no continente africano, partindo da ideia de que este trabalho traz informação sobre todas as espécies do clado já descritas, é possível afirmar que o clima mais seco não é propício para espécies do Clado *Chlorosporum*. Assim como observamos que a maioria das espécies foram encontradas no hemisfério norte, onde o clima é mais temperado, o que pode ser uma preferência para os fungos deste Clado.

## 5.3 Novas espécies dentro do Clado *Chlorosporum*

Os isolados recuperados para as análises filogenéticas foram selecionados a partir de uma busca através da identidade entre as sequências de isolados de referência do Clado com o que estava disponível na rede, sendo escolhidos alguns isolados não identificados a nível de espécie, mas pelo alto valor de identidade havia indícios que se tratava de espécies do Clado *Chlorosporum*. Dessa maneira as análises de filogenia bem como no ASAP foram feitas com 44 isolados inicialmente distribuídos em 10 espécies

conhecidas. Os 22 grupos de partição do ASAP, são bem sustentados pela filogenia, apesar de haver problema no AGP6, que é formado pelo Tipo de *T. surrotundum* e 2 isolados descritos como *T. chlorosporum* (DAOM:232832 e P.C. 4), enquanto o ASAP agrupa esses 3 isolados, a filogenia os coloca em clados bem distintos na árvore, indicando que não há relação filogenética próxima entre eles. Para checar essa variação fizemos testes com o tamanho das sequências, indicando que quando a sequência é muito extensa ela pode acabar interferindo na precisão do resultado.

Os isolados descritos como *T. sinuosum*, formaram 7 AGP (tabela 2), além de serem separados na árvore filogenética e mesmo quando próximos na árvore, os ramos indicam uma divergência evolutiva (Figura 2). Essa distinção entre os isolados dessa espécie já foi indicada anteriormente por Jaklitsch e Voglmary (2015), na qual eles definem 4 grupos para *T. sinuosum*, formando clados bem suportados estatisticamente a partir da análise do *tef1* e que esses grupos são de prováveis novas espécies. O isolado *T. sp.11013*, agrupa com os isolados S349 e S270, refletindo a topologia encontrada na árvore gerada por Jaklitsch e Voglmary (2015).

*Trichoderma thelephoricola* entrou neste trabalho com 7 isolados, todos coletados em amostra de madeira, a delimitação no ASAP formou 2 grupos, sendo 1 composto por 4 isolados europeus e outro formado por 2 isolados asiáticos e 1 isolado norte americano, o que pode indicar um processo de especiação devido ao distanciamento geográfico (Referência).

A espécie *T. zonatum* foi descrita por Zhu e Zhuang (2017), na qual dois isolados (220 e 225) foram coletados em solo da China, tanto na análise filogenética quanto nos dados do ASAP esses isolados agrupam, ratificando que eles pertencem a uma mesma espécie (Figura 2), o outro isolado encontrado neste clado (*T. sp. 10308*) e no AGP20 (Tabela 2), é um isolado ainda não identificado a nível de espécie, porém com os dados coletados a partir da abordagem polifásica, é provável que este isolado seja pertencente integrante da espécie *T. zonatum*.

Neste trabalho, dos 3 isolados não identificados a nível de espécie e com sequência do *tef1* já depositadas na rede, a única espécie que não agrupa com nenhum outro isolado já descrito foi *T. TAMA 0434*, oriunda do Japão, este isolado tem valores estatísticos para Máxima verossimilhança e bayesiana bem suportados na árvore filogenética, além de formar um AGP separado dos demais isolados, indicando uma provável nova espécie.

Antes das análises realizadas neste trabalho, *T. cremeum* foi adicionado a este estudo com 6 isolados, porém após as análises realizadas, foi observado que eles separam em 3 grupos, o primeiro formado por BMCC:LU627, DAOM:176235 e AN392 (Figura 2), cada isolado deste vem de um continente distinto e se relacionam estreitamente na escala evolutiva, indicando que eles podem ter sido separados recentemente impedindo um processo de especiação (Referência). Este grupo é mais próximo de *T. cremeoides* do que dos outros isolados de *T. cremum*, mas ainda assim existem diferenças que o separam como espécie (Figura 2). Os outros 2 grupos são compostos pelos isolados GJS 91-125, DAOM:231312 (AGP12) e TAMA 0186 (AGP13), apesar de se relacionarem ainda, não é possível afirmar que ainda são indivíduos de uma mesma espécie, isso porque além da barreira geográfica que separa esses isolados, o comprimento dos ramos indica que é possível que o processo de especiação já diferencia estes isolados o suficiente para defini-los como espécies distintas (Figura 2).

#### **5.4 Identidade entre os isolados Tipo em comparação com os AGP**

Os isolados dos diferentes AGP foram comparados com os isolados tipo de todas as espécies atualmente descritas do Clado Chlorosporum, juntamente com a espécie descrita neste trabalho. *Trichoderma surrotundum*, foi o isolado que apresentou maiores valores de identidade global quando comparados com todos os AGP, isso acontece porque a sequência de bases do *tef1* no arquivo de alinhamento é menor que o das demais cepas.

*Trichoderma thelephoricola* era representado por 7 isolados antes dos resultados das análises da filogenia e ASAP, após essas análises os isolados foram separados em 3 grupos, com identidade que variam com o tipo de *T. thelephoricola* entre 96,13% e 98,55% (tabela 2). Quando comparado com os valores dos AGPs individualmente, a identidade de *T. thelephoricola* ultrapassa a identidade dos isolados de um mesmo AGP, isso acontece porque esses isolados são filogeneticamente muito próximos e pela sequência do *T. thelephoricola* 9287, ser mais curta em uma região que contém mais variação nos pares de base.

Cai e Druzhinina (2021) propuseram que o *tef1* das espécies de *Trichoderma* tivessem um ponto de corte de 97%, indicando que todo isolado com valor de identidade superior a essa percentagem fosse considerado de

uma mesma espécie. Porém neste trabalho é possível identificar que isolados de diferentes espécies, indicados tanto pela filogenia quanto pelo ASAP, podem possuir valores de identidades superior a 97%, como o caso citado de *T. thelephorica* no parágrafo anterior e os isolados tipo de *T. cremeoides* que possui valores de identidade com os isolados do AGP9 e *T. chlorosporum* com o AGP 17 iguais ou superiores a 97% (tabela 2).

### **5.5 Importância biotecnológica e as implicações de uma identificação incorreta**

O isolado AN392, classificado até o momento como *T. cremeum* foi caracterizado como um bom produtor enzimático (BŁASZCZYK et al., 2016), porém as análises indicaram que ele não pertence a espécie citada e sim a uma nova espécie. Um produto comercializado a partir de uma identificação equivocada pode acarretar problemas futuros, deste modo é imprescindível que se utilize todas as ferramentas possíveis para minimizá-los. Em uma revisão sobre o complexo de espécies *Harzianum*, foram apresentados 4 produtos comerciais que agem no controle biológico, AkTRlvator®, Promot® WP, WP Trichosan® e Vitalin®, porém nenhum deles são produzidos por cepas do clado/espécie *T. harzianum*, indicando que a atribuição anterior equivocada poderia induzir produtores a utilizarem cepas próximas ineficazes (Chaverri et al., 2015).

### **5.6 *Trichoderma miltoni* sp. nov., potencial de antagonismo a partir da interação direta contra fitopatógenos**

O gênero *Trichoderma* vem sendo cada vez mais estudado devido ao potencial que espécies desse gênero vem apresentando, dentre os mecanismos desenvolvidos para biocontrole estão a competição, o parasitismo, indução a resistência e antibiose (SILVA et al., 2022). Os compostos voláteis são metabolitos secundários, que podem atuar como biocontroladores, podendo impedir o crescimento de um parasita, promovendo o crescimento de vegetais, desta forma muitos organismos são testados de maneira a desvendar alguma aplicabilidade biocontroladora que eles possam desempenhar, como alguns *Trichoderma* do Clado *Harzianum* (Maketon et al., 2008; Chaverri et al., 2015).

O *T. MTS29* além de ser o primeiro isolado descrito no Brasil, é o primeiro descrito na restinga, o que sugere uma estratégia de vida eficiente para este isolado, devido aos componentes bióticos e abióticos que formam este ecossistema. Deste modo decidimos testá-lo na presença de *A. welwitschiae* e *M. pernicioso*, utilizando uma estratégia de antagonismo direto. Os fitopatógenos *A. welwitschiae* e *M. pernicioso* tiveram seu crescimento micelial inibido em 13,75%, e 19,6% respectivamente quando comparados ao controle (Figura 3).

Os resultados obtidos *in vitro* indicam que a nova espécie inibe o crescimento dos fitopatógenos (Figura 3), porém o crescimento do *T. miltoni* sp. nov. foi influenciado pelo *Aspergillus* (Figura 4). O *Trichoderma* teve o seu crescimento micelial inibido pelo *Aspergillus* observado de uma maneira mais significativa a partir do 4º dia, no qual a inibição foi de 8,8%, entretanto no dia seguinte esse valor de inibição praticamente dobrou, onde o crescimento da colônia reduziu em 17,7% quando comparado ao controle (Figura 4). O maior valor de inibição do agente de biocontrole na presença do *M. pernicioso* foi irrisório, chegando a 1,2% quando comparado ao controle (Figura 4).

A partir desses dados é possível notar que o *A. welwitschiae* foi capaz de inibir o *T. MTS29*, ainda foi observado na placa a formação de um halo de inibição, concluindo dessa forma que o *Trichoderma* não seria indicado como um bom agente de biocontrole no combate ao fungo causador da podridão vermelha do sisal (Figura 5-A). Contudo quando presente no mesmo espaço que o *M. pernicioso* na disputa por nutrientes, o *T. miltoni* conseguiu inibir sem ter seu crescimento micelial afetado, uma possibilidade é que o *T. MTS29* conseguiu usar de uma estratégia de micoparasitismo a partir do comportamento das suas hifas diante do fitopatógeno (Figura 5-B), indicando que este isolado possui potencial para inibir o agente causador da vassourade-bruxa (Chaverri et al., 2015).

Os ensaios de compostos voláteis, mostram como os metabolitos secundários produzidos pelo *T. MTS29*, foram capazes de inibir o crescimento micelial dos dois fitopatógenos (figura 6). Diferente do ensaio de antagonismo direto em cultura dupla, nos CVOs o *Aspergillus* teve uma maior taxa de inibição quando comparado com o *Moniliophthora* nos dois meios analisados (Figura 6 A-B). A maior taxa de inibição ocorreu no meio de cultura BDA, que é mais barato que o meio MEA, sendo um ponto positivo pois, pode baratear os custos na montagem de experimentos.

Outro aspecto importante é a possibilidade de estudos futuros em mecanismos indiretos, de modo a avaliar o potencial do *T. miltoni* sp. nov. como agente de biocontrole. Tendo em vista que esse isolado nos testes *in vitro* demonstrou capacidade inibitória contra os fitopatógenos.

## 6. CONCLUSÃO

Foi realizada a revisão do Clado *Chlorosporum* a partir da análise polifásica acrescida de biogeografia e ASAP, onde constatamos a existência de pelo menos 24 novas espécies. A espécie recém-descoberta *T. miltoni* sp. nov. apresentou potencial inibitório no crescimento micelial dos fitopatógenos *in vitro*, no antagonismo direto os resultados foram melhores contra o *M. perniciosa* e nos ensaios de CVOs os resultados foram melhores contra o *A. Welwitschiae*.

## 7. REFERÊNCIAS

ABD-AZIZ, SURAINI et al. Effect of agitation and aeration rates on chitinase production using *Trichoderma virens* UKM1 in 2-l stirred tank reactor. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 150, n. 2, p. 193-204, 2008.

ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de Interesse: Aplicações Biotecnológicas. **UNINGÁ Review**, v. 21, n.1, p.55-59, 2015.

ALFANO, G. et al. Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. **Phytopathology**, v. 97, n. 4, p. 429-437, 2007.

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

ALWADAI, A. S. et al. The Isolation and Characterization of Antagonist *Trichoderma* spp. from the Soil of Abha, Saudi Arabia. **Molecules**, v.27, n.8, p.2525, 2022. doi: 10.3390/molecules27082525.

AMANA, S. U. ANTAGONISME *Trichoderma viride* TERHADAP *Aspergillus* spp. KONTAMINAN BIJI KACANG TANAH (*Arachis hypogea* L.) SECARA IN VITRO. 2017.

ASPLUND, J.; WARDLE, D.A. How lichens impact on terrestrial community and ecosystem properties. **Biological Reviews**, v.92, p.1720–1738, 2017.

AZEVEDO, J. L. Fungos – Genética e melhoramento de fungos na biotecnologia. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. v.1, p.1215, 1997.

BALINT, M. et al. Millions of reads, thousands of taxa: microbial community structure and associations analyzed via marker genes. **FEMS Microbiol Rev**, v.40, p. 686–700, 2016.

BENOLIEL B, et al. A novel promising *Trichoderma harzianum* strain for the production of a cellulolytic complex using sugarcane bagasse in natura. **SpringerPlus**, v.2, p.656, 2013. doi: 10.1186/2193-1801-2656.

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

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. **Canadian journal of botany**, v. 69, n. 11, p. 2357-2372, 1991. <sup>a</sup>

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section Pachybasium. **Canadian journal of botany**, v. 69, n. 11, p. 2373-2417, 1991. <sup>b</sup>

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section Longibrachiatum. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, n. 11, p. 2418-2420, 1991.

BISSETT, J.; GAMS, W.; JAKLITSCH, W.; SAMUELS, G. J. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. **IMA fungus**, v. 6, n. 2, p. 263-295, 2015.

BŁASZCZYK, L. et al. Species diversity of *Trichoderma* in Poland. **Journal of Applied Genetics**, v. 52, p. 233-243, 2011.

BŁASZCZYK, L. et al. *Trichoderma* species occurring on wood with decay symptoms in mountain forests in Central Europe: genetic and enzymatic characterization. **Journal of Applied Genetics**, v. 57, p. 397–407, 2016.

BREWER, M. T., LARKIN, R. P., Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.24, p. 939-950, 2005.

CAI, F.; DRUZHININA, I. S. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. **Fungal Diversity**, v. 107, p. 1-69, 2021.

CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. **Centraalbureau voor Schimmelcultures**, p.1-35, 2003.

CHAVERRI, P. et al. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. **Mycologia**, v.107, p.558-590, 2015.

CHEN, KAI; ZHUANG, WEN-YING. Discovery from a large-scaled survey of *Trichoderma* in soil of China. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 9090, 2017.

CHIRINO-VALE, I et al. Potential of the beneficial fungus *Trichoderma* to enhance ecosystem-service provision in the biofuel grass *Miscanthus x giganteus* in agriculture. **Scientific Reports**, v.6, p.25109, 2016.

DE OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; GARBOGGINI, F. F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. 2006.

DREYFUSS, M. M.; CHAPELA I. H. Potential of Fungi in the Discovery of Novel, Low-Molecular Weight Pharmaceuticals. **Discovery of Novel Natural Products with Therapeutic Potential**, p.49–80, 1994.

DRUZHININA, I.S. et al. A complete annotation of the chromosomes of the cellulase producer *Trichoderma reesei* provides insights in gene clusters, their

expression and reveals genes required for fitness. **Biotechnology for Biofuels**, v.9, n.1, p.1-16, 2016.

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

DRUZHININA, I.S.; KOPCHINSKIY, A.G.; KUBICEK, E.M.; KUBICEK, C.P. A complete annotation of the chromosomes of the cellulase producer *Trichoderma reesei* provides insights in gene clusters, their expression and reveals genes required for fitness. **Biotechnol Biofuels**, v.9, p.75, 2016.

DRUZHININA, I.S.; KUBICEK, C.P. Chapter two—familiar stranger: ecological genomics of the model saprotroph and industrial enzyme producer *Trichoderma reesei* breaks the stereotypes. **Advances in applied microbiology**, v.95, p.69–1, 2016.

DRUZHININA, I.S. et al. *Trichoderma* : genomics of opportunistic success. **Nat Rev Microbiol**, v.9, n.10, p.749–759, 2011.

DUARTE, E. A. A. et al. **Putting the Mess in Order: Aspergillus welwitschiae (and Not A. niger) Is the Etiological Agent of Sisal Bole Rot Disease in Brazil**. *Frontiers in Microbiology*, v.9, p.1227, 2018.

EVANS, H. C. **Pod rot of cacao caused by Moniliophthora (Monilia) roreri**. Commonwealth Mycological Institute. *Phytopathological Papers*, n.24, p. 44, 1981.

FERREIRA, P. A.; LOPES, E.; FREITAS, L. G. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. **Revista Trópica–Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 2, n. 3, p. 15-21, 2008.

FERREIRA FILHO, J. A. et al. Carbohydrate-active enzymes in *Trichoderma harzianum*: a bioinformatic analysis bioprospecting for key enzymes for the biofuels industry. **BMC Genomics**, v.18, p. 779, 2017.

FILIZOLA, P. R. B. et al. Biodiversity and phylogeny of novel *Trichoderma* isolates from mangrove sediments and potential of biocontrol against *Fusarium* strains. **Microbial Cell Factories**, v.18, p.89, 2019.

HEBERT, P.D.N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings R Soc Lond B Biol Sci** v.270, p.313–321, 2003.

HUBKA, V.; KOLARIK, M.  $\beta$ -tubulin paralogue tubC is frequently misidentified as the benA gene in *Aspergillus* section Nigri taxonomy: Primer specificity testing and taxonomic consequences. **Persoonia**, v.29, p.1–10, 2012.

JAKLITSCH, W. M. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. **Studies in mycology**, v. 63, p. 1-91, 2009.

JAKLITSCH, W. M. European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores. **Fungal diversity**, v. 48, n. 1, p. 1-250, 2011.

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

JOSHI, A. et al. Recent advances in metabolic engineering of microorganisms for advancing lignocellulose-derived biofuels. **Bioengineered**, v.13, n.4, p.8135-8163, 2022.

KATOH, KAZUTAKA; ASIMENOS, George; TOH, Hiroyuki. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. In: **Bioinformatics for DNA sequence analysis**. Humana Press, p.39-64, 2009.

KATOH, K; ROZEWICKI, J; YAMADA, K. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v.20, p.1160-1166, 2019.

Kubicek, CP. Et al. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, p. 310-319, april, 2003.

LI, C. et al. Duckweed (*Lemna minor*) is a novel natural inducer of cellulase production in *Trichoderma reesei*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 127, n. 4, p. 486-491, 2019.

LIU, Y. et al. Bacterial diversity among the fruit bodies of ectomycorrhizal and saprophytic fungi and their corresponding hyphosphere soils. **Scientific reports**, v.8, n.1, p.1-10, 2018.

LU, B. et al. *Hypocrea/Trichoderma* species with pachybasium-like conidiophores: teleomorphs for *T. minutisporum* and *T. polysporum* and their newly discovered relatives. **Mycologia**, v.96, n.2, p.310-342, 2004.

LÜCKING R et al. Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding?. **Ima Fungus**, v.11, n.1, p.1-32, 2020.

LÜCKING R. et al. Schoch CL. Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding?. **Ima Fungus**, v.11, n.1, p.1-32, 2020.

MAGALHÃES, V. C. et al. Burkholderia isolates from a sand dune leaf litter display biocontrol activity against the bole rot disease of *Agave sisalana*. **Biological Control**, v.112, p.41-48, 2017.

MARRASCHI, R. et al. A Protocol for selection of *Trichoderma* spp. to protect grapevine pruning wounds against *Lasiodiplodia theobromae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 213-221, 2019.

NAHER, L. et al. *Trichoderma* spp.: a biocontrol agent for sustainable management of plant diseases. **Pak. J. Bot**, v. 46, n.4, p.1489-1493, 2014.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; GARBOGGINI, F. F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. 2006.

OSZUST, K.; PYLAK, M.; FRAC, M. *Trichoderma*-Based Biopreparation with Prebiotics Supplementation for the Naturalization of Raspberry Plant Rhizosphere. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n.12, p.6356, 2022.

PELZER, G. Q. et al. Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. **Tropical plant pathology**, v.36, n.2. 2011.

PERAZZOLLI, M. et al. Downy mildew resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 in susceptible grapevines partially mimics transcriptional changes of resistant genotypes. **BMC Genomics**, v.13, n.1, p.660, 2012.

PUILLANDRE, N.; BROUILLET, S.; ACHAZ, G. ASAP: assemble species by automatic partitioning. **Molecular Ecology Resources**, v.21, p.609-620, 2020.

RODRIGUEZ, R.J. et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v.182, p.314-330. 2009.

ROHRICH, C. R. et al. Front line defenders of the ecological niche! Screening the structural diversity of peptaibiotics from saprotrophic and fungicolous *Trichoderma/Hypocrea* species. **Fungal Diversity**, v.69, n.1, p.117-146, 2014.

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

SCHOCH, C., L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

SEXTON, C., A.; HOWLETT, B.; J. Parallels in Fungal Pathogenesis on Plant and Animal Hosts. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 12, p. 1941-1949, 2006.

SILVA, L. et al. *Trichoderma*: Suas Interações E Uma Abordagem Metodológica Aplicada Ao Estudo De Compostos Orgânicos Voláteis Para O Mofo-Branco E

Promoção De Crescimento De Plantas. Revisão Anual de Patologia em Plantas, v. 28, n. 7, p. 163-183, 2022.

SINGH, A. et al. An improved inoculation technique for sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 24, p. 65-68, 2002.

TAMURA, KOICHIRO et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TAMURA, K; STECHER, G; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v.38, p.30223027, 2021.

TAYALA, Y. et al. Effectiveness Test of *Trichoderma harzianum* on The Development of Anthracnose Disease (*Colletotrichum musae*) of Ambon Banana. **Agrologia**, v. 10, n. 2, 2021.

TEDERSOO, L. et al. Highlevel classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. **Fungal diversity**, v. 90, n. 1, p. 135-159, 2018.

VINALE, F. et al. M. Cremenolide, a new antifungal, 10-member lactone from *Trichoderma cremeum* with plant growth promotion activity. **Natural product research**, v.30, p.25752581, 2016.

WHITTAKER, R. H. New concepts of kingdoms of organisms. **Science**, v. 163, n. 3863, p. 150–160, 1969.

YEDIDIA, I. et al. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. **Appl. Environ. Microbiol**, v.69, p.7343-7353, 2003.

YUAN, ZHI-LIN.; CHEN, YI-CUN.; YANG, Y. Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*):

estimation and characterization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.25, n.2, p.295 ,2009.

ZHANG, Y.; ZHUANG, W. Y. *Trichoderma brevicrassum* strain TC967 with capacities of diminishing cucumber disease caused by *Rhizoctonia solani* and promoting plant growth. **Biological Control** v.142, p.104151, 2020.

ZHU, Z.X.; XU, H-X.; ZHUANG, W. Y.; LI, Y. Two New Green-Spored species of *Trichoderma* (Sordariomycetes, Ascomycota) and their phylogenetic positions. **Mycokeys**, v. 26, p. 61-75. 2017.

ZHU, Z.X.; ZHUANG, W. Y. T. *Trichoderma* (Hypocrea) Species with green ascospores from China. **Persoonia**, v. 34, p. 113-129. 2015.