



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS GRADUAÇÃO  
PROGRAMA MULTINSTITUCIONAL DE PÓS  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**Descrição e caracterização de novas espécies amazônicas de *Trichoderma* com aplicações na agricultura e biotecnologia**

**Thiago Fernandes Sousa**

**MANAUS  
2025**

**THIAGO FERNANDES SOUSA**

**Descrição e caracterização de novas espécies amazônicas de *Trichoderma* com aplicações na agricultura e biotecnologia**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de PósGraduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (PPGBIOTEC- UFAM), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

**Orientador:** Gilvan Ferreira da Silva

**MANAUS  
2025**

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

---

- S725d      Sousa, Thiago Fernandes  
              Descrição e caracterização de novas espécies amazônicas de  
              Trichoderma com aplicações na agricultura e biotecnologia / Thiago  
              Fernandes Sousa. - 2025.  
              101 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): Gilvan Ferreira da Silva.  
              Tese (doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de  
              Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, 2025.
1. Biodiversidade amazônica. 2. Novas espécies de Trichoderma. 3.  
              Mineração genômica. 4. Controle biológico. I. Silva, Gilvan Ferreira da. II.  
              Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em  
              Biotecnologia. III. Título
-

## **THIAGO FERNANDES SOUSA**

### **Descrição e caracterização de novas espécies amazônicas de *Trichoderma* com aplicações na agricultura e biotecnologia**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de PósGraduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (PPGBIOTEC- UFAM), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

**Aprovada em: 10/03/2025**

#### **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof.(a) Dr.(a) Gilvan Ferreira da Silva (Presidente)**  
**Embrapa Amazônia Ocidental**

---

**Prof.(a) Dr.(a) Marisa Vieira de Queiroz (Membro)**  
**Universidade Federal de Viçosa (UFV)**

---

**Prof.(a) Dr.(a) Rogério Eiji Hanada (Membro)**  
**Instituto de Pesquisa Nacional da Amazônia (INPA)**

---

**Prof.(a) Dr.(a) Larissa Kirsch Barbosa (Membro)**  
**Universidade do Estado do Amazonas (UEA)**

---

**Dr.(a) Kamila Tomoko Yuyama (Membro)**  
**Embrapa Amazônia Ocidental**

**MANAUS**  
**2025**

## AGRADECIMENTOS

A conclusão desta tese foi possível graças ao apoio e incentivo de muitas pessoas, a quem registro aqui minha profunda gratidão.

Agradeço, primeiramente, aos meus orientadores, Dr. Gilvan Ferreira da Silva (Embrapa) e Dr. Thiago Monteiro Araújo dos Santos (Northeastern University), pela orientação dedicada, pela confiança no meu trabalho e pelas valiosas contribuições ao longo de toda esta jornada.

Sou grato à CAPES pelo apoio financeiro por meio da concessão da bolsa de estudos, essencial para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, José Ribamar dos Santos Sousa e Erlania Oliveira Fernandes, pela base sólida de amor, educação e incentivo, e à minha irmã, Samay Fernandes Sousa, e aos meus sobrinhos, Hugo Raphael e Erick Danilo, pelo carinho e apoio incondicionais.

Aos amigos que me acompanharam nos momentos mais importantes desta caminhada: Izabel Correa Bandeira, Romulo Paixão e Ingrid Jarline, obrigado pela amizade, pela escuta atenta e pelas palavras de incentivo nos momentos desafiadores.

A minha querida amiga de longa data, Iully Ferreira Rolim, com quem me reencontrei recentemente, merece um agradecimento especial. Sua amizade e apoio têm sido fundamentais durante essa jornada, deixando a vida mais divertida e leve.

Durante o doutorado sanduíche na Northeastern University, tive a felicidade de contar com a amizade e apoio de pessoas incríveis: Bakar Abbasi, Liana Anable, Luiza Santos e Arezou D. Obrigado por tornarem essa experiência ainda mais especial e enriquecedora.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

## RESUMO

O gênero *Trichoderma* é amplamente reconhecido por seu papel crucial na agricultura moderna, devido à sua capacidade de promover o crescimento de plantas e controlar doenças de forma sustentável e ecológica. Com mais de 500 espécies válidas descritas, o crescente número de sequenciamentos genômicos tem revelado um vasto repertório de enzimas e metabólitos com grande potencial biotecnológico. Na presente tese, diferentes abordagens taxonômicas, funcionais e genômicas foram aplicadas para a caracterização de linhagens de *Trichoderma* isoladas de ambientes amazônicos, resultando na descrição de novas espécies e na identificação de compostos bioativos relevantes. No primeiro estudo, foi isolada e caracterizada uma nova espécie, *Trichoderma agriamazonicum*, a partir de *Scleronema micranthum* (Malvaceae). A identificação baseou-se em análises morfológicas e filogenéticas, sendo corroborada por estudos funcionais que demonstraram a capacidade do fungo de inibir o crescimento de diversos fitopatógenos por micoparasitismo e produção de compostos voláteis (VOCs). Ensaio *in vivo* em frutos de *Capsicum chinense* mostraram o controle eficaz da podridão causada por *Colletotrichum scovillei*. As análises químicas e genômicas revelaram a produção de metabólitos inéditos e a presença de numerosos clusters biossintéticos, evidenciando o potencial biotecnológico da nova espécie. No segundo estudo, foram caracterizadas 43 linhagens de *Trichoderma* isoladas de sedimentos de rios amazônicos. A análise filogenética baseada no gene *tefl-α* identificou 15 espécies, incluindo a descrição de cinco novas espécies e o primeiro registro de duas espécies no Brasil. Ensaio de antagonismo *in vitro* demonstraram o potencial de várias linhagens como agentes de biocontrole, resultado que foi validado por testes *in vivo* em sementes de feijão-caupi. A prospecção genômica dessas linhagens revelou uma diversidade de clusters biossintéticos associados à produção de metabólitos antifúngicos, antibacterianos e citotóxicos. Os resultados obtidos destacam a riqueza da biodiversidade de *Trichoderma* na Amazônia e reforçam o potencial dessas novas espécies como fontes de biocontrole e de compostos bioativos, contribuindo para o desenvolvimento de alternativas sustentáveis para a agricultura e para futuras aplicações biotecnológicas.

**Palavras-chaves:** novas espécies, Controle de fitopatógenos, genômica comparativa, Diversidade microbiana da Amazônia

## ABSTRACT

The genus *Trichoderma* is widely recognized for its crucial role in modern agriculture due to its ability to promote plant growth and control diseases in a sustainable and ecological manner. With more than 500 valid species described, the growing number of genomic sequences has revealed a vast repertoire of enzymes and metabolites with great biotechnological potential. In this thesis, different taxonomic, functional, and genomic approaches were applied to characterize *Trichoderma* strains isolated from Amazonian environments, resulting in the description of new species and the identification of relevant bioactive compounds. In the first study, a new species, *Trichoderma agriamazonicum*, was isolated and characterized from *Scleronema micranthum* (Malvaceae). The identification was based on morphological and phylogenetic analyses, which were corroborated by functional studies demonstrating the fungus's ability to inhibit the growth of various phytopathogens through mycoparasitism and the production of volatile organic compounds (VOCs). In vivo assays on *Capsicum chinense* fruits showed effective control of rot caused by *Colletotrichum scovillei*. Chemical and genomic analyses revealed the production of novel metabolites and the presence of numerous biosynthetic clusters, highlighting the biotechnological potential of the new species. In the second study, 43 *Trichoderma* strains isolated from Amazonian river sediments were characterized. Phylogenetic analysis based on the *tefl- $\alpha$*  gene identified 15 species, including the description of five new species and the first report of two species in Brazil. In vitro antagonism assays demonstrated the potential of several strains as biocontrol agents, a result validated by in vivo tests on cowpea seeds. Genome mining of these strains revealed a diversity of biosynthetic clusters associated with the production of antifungal, antibacterial, and cytotoxic metabolites. The results obtained highlight the richness of *Trichoderma* biodiversity in the Amazon and reinforce the potential of these new species as sources of biocontrol agents and bioactive compounds, contributing to the development of sustainable agricultural alternatives and future biotechnological applications.

**Keywords:** New species, phytopathogen control, comparative genomics, Amazonian microbial diversity

## SUMÁRIO

2	REVISÃO DA LITERATURA.....	9
2.1	Avanços e desafios na taxonomia de <i>Trichoderma</i> .....	9
2.2	Aplicações de <i>Trichoderma</i> na agricultura e biotecnologia .....	11
2.3	Metabolismo secundário em <i>Trichoderma</i> : uma perspectiva genômica .....	16
2.4	Peptaibols: Uma classe de metabólitos amplamente produzida por espécies de <i>Trichoderma</i> . 17	
2.5	Compostos orgânicos voláteis de <i>Trichoderma</i> .....	18
2.6	Antracnose em <i>Capsicum chinense</i> .....	20
3	OBJETIVOS .....	21
3.1	Geral.....	21
3.2	Específicos .....	21
	CAPÍTULO I.....	22
	Resumo.....	24
	Abstract .....	25
	Introdução .....	26
	Material e métodos.....	27
	Resultados .....	33
	Conclusão.....	51
	Referências.....	52
	CAPÍTULO II .....	58
	Resumo.....	58
	Abstract .....	59
	Introdução .....	60
	Material e métodos.....	61
	Resultados .....	70
	Discussão .....	92
	Conclusão.....	95
	Referências.....	97
	CONCLUSÃO .....	101
	REFERÊNCIAS.....	102



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Avanços e desafios na taxonomia de *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* engloba uma ampla variedade de fungos filamentosos ubíquos, encontrados em diversos nichos ecológicos, como solos, madeira em decomposição e tecidos vegetais. Ecologicamente, esses organismos desempenham um papel essencial como saprófitas, promovendo a degradação de polissacarídeos vegetais e a ciclagem de nutrientes (PFORDT et al., 2025). Do ponto de vista econômico, *Trichoderma* é de grande relevância, devido à sua capacidade de produzir uma vasta gama de metabólitos secundários e enzimas, além de ser amplamente utilizado como agente de biocontrole na agricultura (KASHYAP et al., 2017). Contudo, é importante notar que algumas espécies dentro deste gênero podem atuar como patógenos oportunistas em seres humanos e causar doenças em cogumelos cultivados (AN et al., 2022).

A taxonomia precisa de *Trichoderma* é essencial para uma compreensão profunda da diversidade e das relações evolutivas dentro do gênero. Essa precisão é ainda mais crucial devido ao seu papel fundamental na agricultura, no controle biológico e na biotecnologia, áreas nas quais diferentes espécies e até mesmo linhagens podem apresentar eficácia variável contra patógenos específicos (VINALE et al., 2006; CUNHA et al., 2025). A adaptabilidade e a capacidade de evolução rápida de *Trichoderma*, impulsionadas pela sua grande plasticidade genética, ressaltam a natureza dinâmica de sua taxonomia, o que exige constantes atualizações e refinamentos na classificação do gênero.

As classificações iniciais de *Trichoderma* baseavam-se amplamente em características morfológicas, com foco no aparato de esporulação assexuada (conidióforo) (CAI et al., 2022). Historicamente, a definição do gênero e a identificação das espécies revelaram-se tarefas complexas. Em 1939, Bisby propôs uma visão controversa, reduzindo a maioria das espécies de *Trichoderma* a uma única espécie, *T. viride*, com base em semelhanças morfológicas percebidas. Esse sistema permaneceu em vigor até 1969 (DRUZHININA et al., 2005). Em 1969, Rifai revisou o gênero, reconhecendo nove espécies agregadas com base na morfologia e nos ciclos de vida das espécies de *Hypocrea* (o teleomorfo de *Trichoderma*) (DRUZHININA et al., 2006). Posteriormente, entre 1984 e 1992, Bissett realizou uma nova investigação taxonômica de

*Trichoderma*, considerando as espécies agregadas de Rifai como seções e reconhecendo espécies biológicas dentro delas (BISSETT et al., 1991).

A história da taxonomia de *Trichoderma* é marcada por revisões e debates significativos, evidenciando os desafios inerentes em confiar apenas na morfologia para a classificação de fungos. A redução a uma única espécie (*T. viride*) por um longo período demonstra as limitações das ferramentas e do entendimento disponíveis na época. A identificação de *Hypocrea* como o teleomorfo (estágio sexual) de *Trichoderma* representou uma tentativa inicial de incorporar informações mais abrangentes sobre o ciclo de vida na taxonomia. No entanto, a natureza predominantemente assexuada de muitas linhagens de biocontrole limitou sua aplicação generalizada na taxonomia de *Trichoderma* (SAMUELS et al., 2006).

Apesar desses esforços, os métodos morfológicos apresentavam várias limitações. As características morfológicas podem ser variáveis e sobrepostas, dificultando a distinção entre espécies. A homoplasia, ou a evolução convergente de características semelhantes, tornou a identificação precisa ainda mais desafiadora. Além disso, em relação às características da parte vegetativa, o micélio de diferentes espécies de *Trichoderma* pode ser indistinguível. Estima-se que aproximadamente 50% das espécies de *Trichoderma* depositadas em coleções de cultura com nomes obtidos apenas por análise morfológica estejam incorretas (DRUZHININA et al., 2005).

A década de 1990 testemunhou uma mudança de paradigma na sistemática fúngica, com a incorporação da análise de sequências de DNA, incluindo o gênero *Trichoderma*. Os primeiros trabalhos moleculares envolveram técnicas como RFLP (Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição) e RAPD (DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso). Os caracteres baseados em DNA forneceram um grande número de traços (pares de bases divergentes) adequados para análise filogenética (BRUNS et al., 1991).

Várias regiões genéticas se tornaram marcadores moleculares chave para a identificação e filogenia de *Trichoderma*. As regiões do Espaçador Transcrito Interno (ITS) do DNA ribossomal foram amplamente utilizadas devido à facilidade de amplificação (ESPOSITO et al., 1998). Os genes do Fator de Elongação da Tradução 1-alfa (*tef1- $\alpha$* ) e da Subunidade II da RNA Polimerase (*rpb2*) ofereceram maior resolução para análises filogenéticas e identificação de espécies. A análise de sequências multigênicas, particularmente usando ITS, *rpb2* e *tef1*, tornou-se o padrão para identificação precisa. Outros loci, como a calmodulina (*cal*) e a endoquitinase (*ech42*), também foram explorados (KULLNIG-GRADINGER et al., 2002).

Atualmente, a identificação precisa de espécies de *Trichoderma* depende fundamentalmente da análise molecular, com um protocolo estabelecido que requer a sequenciação de três regiões de DNA (ITS, *tef1* e *rpb2*). A identificação é considerada válida quando a sequência ITS apresenta uma similaridade de pelo menos 76% com sequências de referência, e os genes *tef1* e *rpb2* demonstram alta concordância com padrões estabelecidos para cada espécie. Embora existam ferramentas online e bancos de dados para auxiliar nesse processo, a identificação definitiva exige validação biológica, considerando as características morfológicas e de crescimento, além de conhecimento especializado em taxonomia fúngica, visto que cerca de 40% das espécies ainda apresentam desafios para uma identificação inequívoca (LEI e CAI, 2021).

## 2.2 Aplicações de *Trichoderma* na agricultura e biotecnologia

*Trichoderma* demonstra eficácia no controle de uma ampla gama de patógenos fúngicos, incluindo gêneros de grande importância econômica como *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Botrytis* e *Verticillium*. Além disso, algumas espécies de *Trichoderma* são eficazes contra patógenos bacterianos, como *Ralstonia solanacearum*, *Acidovorax avenae*, *Erwinia carotovora* e *Xanthomonas campestris*, e apresentam atividade nematicida contra nematoides parasitas de plantas, como *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus* (MIAMOTO et al., 2017; GUO et al., 2021; TYŚKIEWICZ et al., 2022).

Os mecanismos de ação de *Trichoderma* como agente de biocontrole são diversos e incluem micoparasitismo, antibiose, competição e indução de resistência sistêmica (ISR) (Woo et al., 2023). O micoparasitismo envolve o ataque direto ao patógeno fúngico, onde *Trichoderma* enrola suas hifas ao redor do hospedeiro, penetra-o e degrada sua parede celular através da secreção de enzimas como quitinases e glucanases (MUKHERJEE et al., 2022). A antibiose se manifesta pela produção de metabólitos secundários, como peptaibóis, gliotoxina e viridina, que inibem o crescimento de patógenos (BAILEY et al., 2008). A competição por nutrientes e espaço na rizosfera também é um fator importante, onde *Trichoderma*, com seu rápido crescimento micelial e adaptabilidade ambiental, limita os recursos disponíveis para os patógenos (SIVAN et al., 1989; SEGARRA et al., 2010).

*Trichoderma* também promove o crescimento de diversas culturas, como arroz, tomate, pepino, banana, repolho, melão e amendoim, através do aumento da germinação de sementes e do

vigor das plântulas. Observa-se um aumento no comprimento da raiz e do broto, no peso fresco e seco, e na biomassa total das plantas tratadas (SUBRAMANIAM et al., 2022). Além disso, *Trichoderma* melhora a absorção de nutrientes, especialmente fósforo e ferro, e aumenta a eficiência fotossintética e o teor de clorofila nas plantas (SABA et al., 2012). Os mecanismos pelos quais *Trichoderma* promove o crescimento das plantas incluem a produção de fitormônios, como o ácido indolacético (IAA), giberelinas e citocininas, e o aumento da solubilização de nutrientes essenciais, tornando-os mais acessíveis às plantas (KHAN et al., 2023).

Além disso, espécies desse gênero contribuem para a decomposição da matéria orgânica, liberando nutrientes essenciais no solo (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2016). Possui potencial para biorremediação de contaminantes do solo, incluindo metais pesados e poluentes orgânicos, e pode melhorar a estrutura do solo e a retenção de água (ZAFRA et al., 2015; RACIĆ et al., 2023). Os mecanismos de ação incluem a secreção de enzimas que quebram compostos orgânicos complexos e processos metabólicos que podem degradar ou imobilizar poluentes (DACCÒ et al., 2020).

Na biotecnologia, o gênero é um produtor eficiente de CAZymes (Enzimas ativas de carboidratos) como celulasas e hemicelulasas, particularmente *T. reesei*, que são cruciais para a produção de biocombustíveis a partir da biomassa vegetal (PETERSON et al., 2012). Produz também amilases (por exemplo, *T. harzianum*) para processamento de alimentos e outras aplicações industriais, lipases com potencial nas indústrias de biodiesel e laticínios e pectinases para clarificação de sucos de frutas e processamento têxtil (MOHAMED et al., 2011; CORADI et al., 2013). Os processos e tecnologias envolvidos incluem o cultivo de estirpes específicas de *Trichoderma* em biorreatores sob condições otimizadas e a engenharia metabólica para aumentar a produção de enzimas (SEIBOTH et al., 2012).

*Trichoderma* é reconhecido como um eficiente degradador de biomassa lignocelulósica. A quebra eficiente da biomassa vegetal é alcançada pela ação sinérgica de diferentes classes de CAZymes, incluindo GHs, CEs, PLs e Aas (Tabela 1; Tabela 2). A produção de CAZymes específicas é frequentemente induzida pela presença de componentes da biomassa vegetal, como celulose, hemicelulose e pectina (HÄKKINEN et al., 2012). As swolleninas, proteínas semelhantes a expansinas, desempenham um papel na disrupção das fibras de celulose. A produção de CAZymes é regulada em nível transcricional, e comparações com outros fungos, como *T.*

*reesei*, fornecem contexto para o potencial de *Trichoderma harzianum* na produção de biocombustíveis e outras aplicações biotecnológicas (EIBINGER et al., 2016).

A ação coordenada de múltiplas classes de CAZymes evidencia a complexidade e a eficiência da estratégia de degradação de biomassa de *Trichoderma*, permitindo-lhe acessar uma ampla gama de nutrientes derivados de plantas. Diferentes componentes da biomassa vegetal (celulose, hemicelulose, lignina) requerem diferentes tipos de enzimas para a sua decomposição. A ação sinérgica sugere que *Trichoderma* secreta um conjunto de enzimas que trabalham em conjunto. A indução de CAZymes específicas pela presença de substratos demonstra um mecanismo de resposta altamente adaptável, onde *Trichoderma* produz as enzimas necessárias apenas quando a fonte de alimento correspondente está disponível, economizando energia (HORTA et al., 2018).

As CAZymes desempenham um papel crucial no micoparasitismo de *Trichoderma*, que envolve a degradação das paredes celulares fúngicas. Quitinasas específicas (GH18, GH20) e glucanases (GH16, GH17, GH55, GH64, GH81) estão envolvidas na degradação das paredes celulares fúngicas. A produção de enzimas que degradam a parede celular (CWDEs) é essencial durante o micoparasitismo. As quitina desacetilases (CDAs) também desempenham um papel no micoparasitismo. Além disso, as CAZymes de *Trichoderma* podem induzir respostas de defesa em plantas (MAMPs, DAMPs), e também estão envolvidas no controle de doenças de nematoides. *Trichoderma* demonstra atividade antagônica contra vários patógenos fúngicos, incluindo *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Botrytis*, *Verticillium*, *Alternaria* e *Colletotrichum*. A ação sinérgica de múltiplos mecanismos contribui para o biocontrole eficaz (CHEN et al., 2023).

A indução específica de certas CAZymes, como AGN13.1 e AGN13.2, após a exposição às paredes celulares de patógenos, indica uma estratégia de ataque enzimático direcionada empregada por *Trichoderma*. *Trichoderma* não secreta enzimas aleatoriamente; ele detecta a presença de um patógeno específico e produz enzimas adaptadas para degradar sua parede celular. A capacidade das CAZymes de *Trichoderma* de atuarem como elicitores da imunidade vegetal sugere um papel duplo no biocontrole: atacando diretamente o patógeno e fortalecendo indiretamente as defesas da planta (XU et al., 2020). Ao quebrar as paredes celulares dos patógenos, *Trichoderma* não apenas mata o patógeno, mas também libera fragmentos que alertam a planta para o perigo (WANG et al., 2023). O envolvimento das CAZymes no controle de doenças

de nematoides expande o espectro de biocontrole de *Trichoderma* além de patógenos fúngicos, tornando-o uma ferramenta versátil na agricultura. Os nematoides possuem cutículas que contêm componentes semelhantes à quitina. As quitinases produzidas por *Trichoderma* podem degradar essas cutículas, levando ao controle de nematoides (DE OLIVEIRA et al., 2023).

Os papéis no ciclo de nutrientes, na promoção do crescimento e na resistência induzida estão todos ligados à capacidade de *Trichoderma* de modificar os carboidratos no solo e no ambiente das plantas através da atividade das CAZymes. A integração das CAZymes de *Trichoderma* em práticas agrícolas sustentáveis oferece uma alternativa promissora aos pesticidas e fertilizantes químicos, contribuindo para a proteção ambiental e a segurança alimentar. A existência de produtos comerciais à base de *Trichoderma* indica a tradução bem-sucedida da pesquisa em aplicações práticas na agricultura, embora os desafios mencionados na consistência e regulamentação ainda precisem ser abordados. A disponibilidade de produtos comerciais mostra que o setor agrícola reconhece o valor de *Trichoderma*. No entanto, os desafios mencionados destacam áreas para futuras pesquisas e desenvolvimento.

Tabela 1: Principais classes de CAZymes e suas funções

CAZyme	Função Primária
Glicosídeo Hidrolases (GHs)	Hidrólise de ligações glicosídicas em carboidratos complexos (celulose, hemicelulose, quitina, glucanos)
Glicosiltransferases (GTs)	Catalisam a transferência de monossacarídeos para formar dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos; envolvidas na formação da parede celular
Liasas de Polissacarídeos (PLs)	Clivam polissacarídeos contendo ácido urônico por $\beta$ -eliminação; degradam pectina e alginato
Esterases de Carboidratos (CEs)	Removem grupos acetil e outros grupos éster de carboidratos, aumentando a acessibilidade para outras enzimas; atuam na desacetilação do xilano
Atividades Auxiliares (AAs)	Enzimas redox que atuam em conjunto com enzimas hidrolíticas para degradar polissacarídeos recalcitrantes como celulose e quitina; algumas famílias envolvidas na degradação da lignina

Tabela 2: Exemplos de CAZymes Específicas de *Trichoderma* e suas aplicações biotecnológicas

CAZyme	Família CAZy	Espécie de <i>Trichoderma</i>	Substrato Principal	Aplicação Industrial Primária
Celulase (Endoglucanase, Celobio-hidrolase, $\beta$ -Glicosidase)	GH7, GH91, GH3	<i>T. reesei</i> , <i>T. harzianum</i> , <i>T. longibrachiatum</i>	Celulose	Produção de bioetanol, indústria têxtil, indústria de papel e celulose, indústria alimentícia, rações animais
Xilanase	GH10, GH11	<i>T. reesei</i> , <i>T. longibrachiatum</i> , <i>T. harzianum</i>	Xilano (hemicelulose)	Indústria de papel e celulose (biobranqueamento), indústria alimentícia (melhoramento da panificação, clarificação de sucos), rações animais
Quitinaase	GH18	<i>T. harzianum</i> , <i>T. atroviride</i>	Quitina (paredes celulares fúngicas, exoesqueletos de insetos)	Biocontrole de patógenos fúngicos, produção de quitooligossacarídeos
$\beta$ -Glicosidase	GH3, GH1	<i>T. reesei</i> , <i>T. asperellum</i> , <i>T. harzianum</i>	Celobiose, glicosídeos	Produção de biocombustíveis (hidrólise completa da celulose), intensificação do sabor em alimentos
$\alpha$ -L-arabinofuranosidas e	GH54, GH62	<i>T. koningii</i> , <i>T. reesei</i>	Arabinoxilano, arabinose	Indústria de alimentos (clarificação de sucos, melhoramento da panificação), produção de bioetanol
Acetil xilana esterase	CE1	<i>T. reesei</i>	Xilano acetilado	Indústria de papel e celulose (melhoria da polpação), indústria de biocombustíveis (pré-tratamento da biomassa)

Swollenin	CBM_1	<i>T. reesei</i>	Celulose	Bioengenharia de enzimas, potencializador da hidrólise da celulose
-----------	-------	------------------	----------	--

### 2.3 Metabolismo secundário em *Trichoderma*: uma perspectiva genômica

Os metabólitos secundários são compostos orgânicos produzidos por fungos que não estão diretamente envolvidos no seu crescimento, desenvolvimento ou reprodução primários, mas que desempenham papéis ecológicos cruciais. Em *Trichoderma*, esses metabólitos estão envolvidos em interações com outros organismos, incluindo plantas e outros fungos, e na adaptação a diversos ambientes (MUKHERJEE et al., 2012). A análise genômica revelou uma abundância e diversidade significativas de agrupamentos de genes biossintéticos de metabólitos secundários (BGCs) nos genomas de várias espécies de *Trichoderma*. No genoma de *T. harzianum* M10 v1.0, por exemplo, foram previstos mais de 50 BGCs (AL-SALIHI et al., 2023).

Uma comparação entre espécies micoparasitas (*T. virens*, *T. atroviride*) e espécies saprofitas (*T. reesei*) revelou um enriquecimento de genes relacionados ao metabolismo secundário nas espécies micoparasitas. *T. virens* e *T. atroviride*, por exemplo, possuem um maior número de sintases de policetídeos (PKSs) e sintetases de peptídeos não ribossômicos (NRPSs) em comparação com *T. reesei*. As classes de metabólitos secundários comuns em *Trichoderma* incluem peptaibóis, policetídeos, terpenoides e pironas (ZEILINGER et al., 2016). Muitos agrupamentos de genes biossintéticos permanecem 'silenciosos' ou crípticos, com os compostos que produzem não sendo identificados em condições laboratoriais padrão (HOSKISSON et al., 2020).

A análise genômica tem revelado o imenso potencial de *Trichoderma* para produzir uma vasta gama de metabólitos secundários, muito além do que era previamente conhecido por métodos bioquímicos tradicionais. O enriquecimento desses genes em espécies micoparasitas sugere um papel crucial nas suas interações com outros fungos e potencialmente nas suas atividades de biocontrole. O desafio agora reside em ativar e caracterizar os produtos dos numerosos agrupamentos de genes crípticos (SCHALAMUN et al., 2022).



A mineração genômica desempenha um papel fundamental na identificação e caracterização da organização dos genes biossintéticos em agrupamentos nos genomas de *Trichoderma*. Nos fungos, os genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários são frequentemente localizados próximos uns dos outros nos cromossomos, formando os BGCs. Um BGC típico inclui enzimas centrais, como as PKSs, NRPSs e terpeno sintases, bem como enzimas de modificação, como citocromo P450s e metiltransferases. Exemplos de BGCs caracterizados em *Trichoderma* incluem aqueles responsáveis pela produção de peptaibóis, gliotoxina e tricotecenos (GUTIÉRREZ et al., 2021; HUA et al., 2021; CASTRO et al., 2023).

Ferramentas bioinformáticas, como o antiSMASH, são utilizadas para prever e analisar os BGCs nos genomas de *Trichoderma*. A organização agrupada dos genes biossintéticos em *Trichoderma* simplifica o processo de identificação e manipulação das vias responsáveis pela produção de metabólitos secundários. A mineração genômica, juntamente com ferramentas bioinformáticas, permite aos investigadores prever as capacidades metabólicas potenciais de diferentes espécies e estirpes de *Trichoderma*, orientando os esforços direcionados para a descoberta de metabólitos (BLIN et al., 2025).

Um exemplo notável é o *Tricholignan A*, identificado em *T. harzianum* T-22, que demonstrou capacidade de facilitar a assimilação redutiva de ferro em plantas (SHENOUDA et al., 2021). Já em *T. virens*, a expressão heteróloga de um agrupamento de genes permitiu elucidar a via biossintética do trichóxido (HAN et al., 2023). Além desses compostos, análises genômicas previram a presença de diversos outros metabólitos de interesse em *T. harzianum* M10 v1.0, incluindo enterobactina, gramicidina, lovastatina, HC-toxina, tirocidina, equisetina, eritronolida, estrobilurina, asperfuranona, citrinina, protoiludeno, germacreno e epi-isozizaeno, ampliando o potencial biotecnológico deste gênero (AL-SALIHI et al., 2023).

#### **2.4 Peptaibols: Uma classe de metabólitos amplamente produzida por espécies de *Trichoderma***

Os peptaibols são peptídeos não ribossomais curtos (5-20 resíduos), caracterizados por uma elevada proporção de  $\alpha$ -aminoisobutírico (Aib), um aminoácido não proteico que confere rigidez e induz conformação helicoidal ( $\alpha$ -hélice) (Degenkolb et al., 2008). Sua estrutura geral inclui um grupo acil na extremidade N-terminal (como acetil) e um álcool aminado no C-terminal (ex.: fenilalaninol), aumentando a anfipaticidade e a capacidade de interagir com membranas biológicas (KUBICEK et al., 2011). Exemplos clássicos incluem a alamicina (19 resíduos) e a

trichokonina, que formam poros transmembrana em células-alvo, perturbando a homeostase iônica (MUKHERJEE et al., 2013).

A síntese de peptaibols é mediada por sintetases não ribossomais (NRPS), enzimas modulares codificadas por clusters gênicos específicos (ex.: genes *tex* em *T. virens*) (MUKHERJEE et al., 2012). Cada módulo da NRPS incorpora um aminoácido específico, permitindo variações na sequência peptídica. A diversidade de peptaibols entre espécies de *Trichoderma* (ex.: *T. harzianum*, *T. asperellum*) está ligada à evolução desses clusters, que podem sofrer duplicações ou recombinações (NEUHOF et al., 2007).

Os peptaibols desempenham múltiplos papéis ecológicos: (1) Atividade antimicrobiana, rompendo membranas de fungos e bactérias via formação de canais iônicos (LÓPEZ-MONDÉJAR et al., 2019); (2) Modulação de respostas vegetais, induzindo resistência sistêmica (ISR) e promovendo crescimento radicular em condições de estresse (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2015); (3) Sinalização intraespecífica, regulando esporulação e desenvolvimento micelial (HERMOSA et al., 2014). Estudos sugerem que essas moléculas também medeiam interações com microrganismos do solo, influenciando a composição da rizosfera (SOOD et al., 2020).

Na agricultura, peptaibols são explorados em biofungicidas para controle de doenças como a podridão radicular (HOWELL, 2003). Sua capacidade de estimular o crescimento vegetal e tolerância a estresses abióticos amplia seu potencial biotecnológico (BROTMAN et al., 2013). Na medicina, investiga-se seu uso como agentes antitumorais e antivirais, embora desafios como baixa solubilidade limitem aplicações diretas (REBUFFAT et al., 2021).

## **2.5 Compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma***

Os compostos orgânicos voláteis (VOCs) produzidos por espécies do gênero *Trichoderma* são reconhecidos por seu papel crucial no controle biológico de fitopatógenos e na promoção do crescimento vegetal. Esses metabólitos, que incluem terpenos, cetonas e piranas, atuam como mediadores químicos em interações ecológicas, inibindo diretamente fungos patogênicos como *Fusarium* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum* (MORÁN-DIEZ et al., 2021). Além disso, os VOCs modulam respostas fisiológicas em plantas, como a indução de genes de defesa e a síntese de fitoalexinas, consolidando *Trichoderma* como um agente multifuncional na agricultura sustentável (GARNICA-VERGARA et al., 2016). A diversidade estrutural e funcional desses compostos está intrinsecamente ligada à variabilidade genética das linhagens e às condições

ambientais, o que exige estratégias avançadas para otimizar sua produção e aplicação (KOTTBREDE et al., 2019).

Os VOCs de *Trichoderma* atuam por meio de mecanismos diretos e indiretos. Estudos demonstram que compostos como a 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP) suprimem o crescimento micelial de patógenos como *S. sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani* em até 50%, além de alterar a morfologia das hifas, resultando em fragmentação e redução da esporulação (KOTTBREDE et al., 2019; LI et al., 2022). Paralelamente, esses voláteis induzem respostas sistêmicas em plantas, ativando vias de sinalização dependentes de ácido jasmônico (JA) e ácido salicílico (SA), que regulam a expressão de proteínas relacionadas à patogênese (PR) e a síntese de metabólitos de defesa (GARNICA-VERGARA et al., 2016). Em culturas como o tomateiro (*Solanum lycopersicum*), a exposição a VOCs de *T. harzianum* aumentou a biomassa radicular em até 30%, sugerindo um papel adicional na promoção de crescimento sob estresse abiótico (CONTTRERAS-CORNEJO et al., 2015).

A produção de VOCs em *Trichoderma* é altamente influenciada por fatores genéticos e ambientais. A técnica OSMAC (*One Strain Many Compounds*), que varia parâmetros como pH, fontes de carbono e estresses oxidativos, demonstrou aumentar a diversidade química dos voláteis em linhagens como *T. asperellum* e *T. atroviride* (MUKHERJEE et al., 2020). Por exemplo, o uso de meio de cultura Czapek suplementado com quitina induziu a síntese de peptaibóis antifúngicos em *T. amazonicum*, enquanto condições de baixo nitrogênio favoreceram a produção de terpenos voláteis (SILVA et al., 2020). A variabilidade interespecífica também é evidente: linhagens de *T. virens* mostraram maior eficácia contra *Fusarium oxysporum* em comparação a *T. harzianum*, indicando adaptações metabólicas específicas (MORÁN-DIEZ et al., 2021).

A aplicação de VOCs no manejo de doenças tem sido explorada em cultivos como soja (*Glycine max*) e morango (*Fragaria × ananassa*), onde isolados de *Trichoderma* reduziram a incidência de *S. sclerotiorum* em até 60% (LI et al., 2022). No entanto, desafios como a volatilidade dos compostos e a necessidade de formulações estáveis limitam sua escalabilidade. Estratégias como a encapsulação em nanopartículas lipídicas ou a combinação com enzimas hidrolíticas têm sido propostas para superar essas barreiras (KOTTBREDE et al., 2019). Além disso, estudos ecotoxicológicos são urgentes para avaliar o impacto desses voláteis na microbiota do solo e em organismos não-alvo, garantindo a segurança ambiental (MUKHERJEE et al., 2020).

Os compostos orgânicos voláteis (VOCs) produzidos por *Trichoderma* têm sido investigados como alternativas sustentáveis para o controle de patógenos pós-colheita,

como *Colletotrichum gloeosporioides* em frutas tropicais e *Botrytis cinerea* em morangos. Estudos demonstram que VOCs de *T. atroviride* inibiram em até 70% o desenvolvimento de *Penicillium expansum* em maçãs armazenadas, reduzindo a produção de micotoxinas e prolongando a vida útil dos frutos (ZHANG et al., 2021). Em manga (*Mangifera indica*), a exposição a VOCs de *T. harzianum* suprimiu a germinação de esporos de *C. gloeosporioides* em 45%, além de induzir a síntese de fitoalexinas como a mangiferina, que reforçam a resistência do tecido vegetal (SILVA et al., 2022). A aplicação desses voláteis em câmaras de armazenamento, via difusão controlada, mostrou-se promissora, embora desafios como a volatilidade e a estabilidade dos compostos em condições de baixa temperatura ainda limitem sua adoção em larga escala (LIU et al., 2023). Pesquisas recentes propõem a combinação de VOCs com revestimentos comestíveis à base de quitosana, que atuam como matrizes de liberação lenta, prolongando a atividade antifúngica em frutos como pêssego e uva (WANG et al., 2023).

## 2.6 Antracnose em *Capsicum chinense*

*Colletotrichum* é um gênero de fungos ascomicetos da família *Glomerellaceae*, com mais de 300 espécies descritas, conhecidas por causarem antracnose em plantas de importância agrícola, como cereais, frutas e hortaliças (DE SILVA et al., 2019). Esses fungos apresentam uma diversidade de estilos de vida, atuando como patógenos, endófitos ou saprófitos, dependendo da interação com o hospedeiro e das condições ambientais (DEAN et al., 2012). A infecção por *Colletotrichum* ocorre em um ciclo hemibiotrófico, iniciando com uma fase biotrófica assintomática, seguida por necrotrofia, que resulta em lesões características com esporulação (HSIEH et al., 2022).

*Colletotrichum scovillei* pertence ao complexo *C. acutatum* e destaca-se como um dos principais agentes da antracnose em pimentas, especialmente em *Capsicum chinense* (pimenta-de-cheiro) (DE SILVA et al., 2019). Identificado inicialmente na Ásia, sua distribuição expandiu-se para Américas (Brasil, Canadá, EUA) e Europa, causando perdas de até 70% na produtividade devido a lesões em frutos maduros e imaturos (GOLDENHAR; TRACEY, 2023). Estudos filogenéticos multilocus (genes *ITS*, *GAPDH*, *ACT*) confirmaram sua agressividade em condições tropicais e sua adaptação a variedades de pimenta anteriormente consideradas resistentes (HSIEH et al., 2022).

Em *C. chinense*, os sintomas incluem lesões circulares afundadas, com coloração marrom-avermelhada e massas salmões de conídios, evoluindo para necrose total do fruto (PLANTIX,

2023). A infecção pode permanecer latente em frutos imaturos, manifestando-se durante a maturação, com penetração mediada por apressórios melanizados e produção de enzimas pectinolíticas (ex.: pectinases) e efetores como proteínas *CRN* (ZHONG et al., 2024).

O uso excessivo de fungicidas tem levado ao desenvolvimento de resistência em *C. scovillei*, exigindo rotação com produtos de diferentes mecanismos de ação (GOLDENHAR; TRACEY, 2023). Agentes biológicos como *Bacillus velezensis* (linhagem HG-8-2) inibem o crescimento micelial via lipopeptídeos antifúngicos (ZHONG et al., 2024). A edição genética de genes como *CsPOMI* (envolvido na tolerância ao estresse osmótico) surge como estratégia promissora (HSIEH et al., 2022).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Descrever novas espécies de *Trichoderma* e investigar seu potencial biotecnológico para aplicações agrícolas

#### **3.2 Específicos**

- Isolar e caracterizar por métodos morfológicos e moleculares linhagens de *Trichoderma* de diferentes habitats amazônicos
- Realizar a caracterização genômica via análise de vias biossintéticas e enzimas voltadas ao biocontrole de novas espécies de *Trichoderma*
- Avaliar *in vitro* e *in vivo* o controle de patógenos de interesse agrícola
- Realizar o perfil químico de novas espécies de *Trichoderma*

# CAPÍTULO I

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127469>

Microbiological Research 275 (2023) 127469



Contents lists available at ScienceDirect

Microbiological Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/micres](http://www.elsevier.com/locate/micres)



## *Trichoderma agriamazonicum* sp. nov. (Hypocreaceae), a new ally in the control of phytopathogens

Thiago Fernandes Sousa<sup>a,b</sup>, Bruna Nayara Pantoja Vieira Reça<sup>c</sup>, Gleucinei Santos Castro<sup>d</sup>, Ingrid Jarline Santos da Silva<sup>a,b</sup>, Fernanda Fátima Caniato<sup>e</sup>, Moysés Batista de Araújo Júnior<sup>f</sup>, Michel Eduardo Belez Yamagishi<sup>g</sup>, Hector Henrique Ferreira Koolen<sup>d</sup>, Giovana Anceski Bataglion<sup>h</sup>, Rogério Eiji Hanada<sup>l,\*</sup>, Gilvan Ferreira da Silva<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), 69080-900 Manaus, Brazil

<sup>b</sup> Embrapa Amazônia Ocidental, 69010-970 Manaus, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-graduação em Agricultura no Trópico Úmido (ATU), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), 69067-375 Manaus, Brazil

<sup>d</sup> Grupo de Pesquisas em Metabolômica e Espectrometria de Massas, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), 690065-130 Manaus, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Ciências Fundamentais e Desenvolvimento Agrícola, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), 69080-900 Manaus, Brazil

<sup>f</sup> Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), 69080-900 Manaus, Brazil

<sup>g</sup> Embrapa Agricultura Digital, 13083-970 Campinas, Brazil

<sup>h</sup> Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), 69080-900 Manaus, Brazil

<sup>l</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), 69067-375 Manaus, Brazil

### ARTICLE INFO

Keywords:  
Amazon fungi  
Peptaibols  
Post-harvest  
Biocontrol

### ABSTRACT

The genus *Trichoderma* comprises more than 500 valid species and is commonly used in agriculture for the control of plant diseases. In the present study, a *Trichoderma* species isolated from *Scleroderma micranthum* (Malvaceae) has been extensively characterized and the morphological and phylogenetic data support the proposition of a new fungal species herein named *Trichoderma agriamazonicum*. This species inhibited the mycelial growth of all the nine phytopathogens tested both by mycoparasitism and by the production of VOCs, with a highlight for the inhibition of *Corynespora cassicola* and *Colletotrichum* spp. The VOCs produced by *T. agriamazonicum* were able to control *Capsicum chinense* fruit rot caused by *Colletotrichum scovillei* and no symptoms were observed after seven days of phytopathogen inoculation. GC-MS revealed the production of mainly 6-amil- $\alpha$ -pyrone, 1-octen-3-ol and 3-octanone during interaction with *C. scovillei* in *C. chinense* fruit. The HPLC-MS/MS analysis allowed us to annotate trikoningin KBII, hypocreneone C, 5-hydroxy-de-O-methyl-lasiiodiplodin and unprecedented 7-mer peptaibols and lipopeptaibols. Comparative genomic analysis of five related *Trichoderma* species reveals a high number of proteins shared only with *T. koningiopsis*, mainly the enzymes related to oxidative stress. Regarding the CAZyme composition, *T. agriamazonicum* is most closely related to *T. atroviride*. A high protein copy number related to lignin and chitin degradation is observed for all *Trichoderma* spp. analyzed, while the presence of licheninase GH12 was observed only in *T. agriamazonicum*. Genome mining analysis identified 33 biosynthetic gene clusters (BGCs) of which 27 are new or uncharacterized, and the main BGCs are related to the production of polyketides. These results demonstrate the potential of this newly described species for agriculture and biotechnology.

### 1. Introduction

*Trichoderma* species are ubiquitous and commonly found in soil, plants or decaying wood. They have been widely used in agriculture due to their ability to secrete lytic enzymes and produce bioactive secondary

metabolites and volatile organic compounds (VOCs), which can be used in crop growth and protection (Sharma et al., 2019; Sood et al., 2020; Poveda, 2021; Woo et al., 2022). *Trichoderma* spp. also are great producers of peptaibols, membrane-active  $\alpha$ -aminoisobutyric acid rich polypeptides, which have many properties including antimicrobial and

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [rhanada.inpa@gmail.com](mailto:rhanada.inpa@gmail.com) (R.E. Hanada), [gilvan.silva@embrapa.br](mailto:gilvan.silva@embrapa.br) (G.F. da Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127469>

Received 28 March 2023; Received in revised form 23 July 2023; Accepted 1 August 2023

Available online 2 August 2023

0944-5013/© 2023 Published by Elsevier GmbH. This article is made available under the Elsevier license (<http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/>).

***Trichoderma agriamazonicum* sp. nov.** (Hypocreaceae): Um Novo Aliado no Controle de Fitopatógenos

Thiago Fernandes Sousa<sup>1</sup>, Bruna Nayara Pantoja Vieira Reça<sup>2</sup>, Gleucinei Santos Castro<sup>3</sup>, Ingride Jarline Santos da Silva<sup>12</sup>, Fernanda Fátima Caniato<sup>4</sup>, Moysés Batista de Araújo Júnior<sup>5</sup>, Michel Eduardo Beleza Yamagishi<sup>6</sup>, Hector Henrique Ferreira Koolen<sup>3</sup>, Giovana Anceski Bataglioni<sup>7</sup>, Rogério Eiji Hanada<sup>8</sup>, Gilvan Ferreira da Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), 69080-900 Manaus, Brasil

<sup>2</sup> Embrapa Amazônia Ocidental, 69010-970 Manaus, Brasil

<sup>3</sup> Grupo de Pesquisas em Metabolômica e Espectrometria de Massas, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), 690065-130 Manaus, Brasil

<sup>4</sup> Departamento de Ciências Fundamentais e Desenvolvimento Agrícola, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), 69080-900 Manaus, Brasil

<sup>5</sup> Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), 69080-900 Manaus, Brasil

<sup>6</sup> Embrapa Agricultura Digital, 13083-970 Campinas, Brasil

<sup>7</sup> Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), 69080-900 Manaus, Brasil

<sup>8</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), 69067-375 Manaus, Brasil

## Resumo

O gênero *Trichoderma* compreende mais de 500 espécies válidas e é amplamente utilizado na agricultura para o controle de doenças de plantas. No presente estudo, uma espécie de *Trichoderma* isolada de *Scleronema micranthum* (Malvaceae) foi extensivamente caracterizada, e os dados morfológicos e filogenéticos sustentam a proposição de uma nova espécie fúngica, aqui nomeada como *Trichoderma agriamazonicum*. Esta espécie inibiu o crescimento micelial de todos os nove fitopatógenos testados, tanto por micoparasitismo quanto pela produção de compostos voláteis orgânicos (VOCs), com destaque para a inibição de *Corynespora cassiicola* e *Colletotrichum* spp. Os VOCs produzidos por *T. agriamazonicum* foram capazes de controlar a podridão de frutos de *Capsicum chinense* causada por *Colletotrichum scovillei*, e não foram observados sintomas após sete dias da inoculação do fitopatógeno. A análise por GC-MS revelou a produção de, principalmente, 6-amilo- $\alpha$ -pirona, 1-octen-3-ol e 3-octanona durante a interação com *C. scovillei* em frutos de *C. chinense*. A análise de HLPC-MS/MS permitiu a anotação de trikoningin KBII, hypocrenone C, 5-hidroxi-de-O-metil-lasiodiplodina e peptaibóis e lipopeptaibóis inéditos de 7-mer. A análise genômica comparativa de cinco espécies relacionadas de *Trichoderma* revelou um alto número de proteínas compartilhadas apenas com *T. koningiopsis*, principalmente as enzimas relacionadas ao estresse oxidativo. Quanto à composição de CAZyme, *T. agriamazonicum* é mais intimamente relacionado a *T. atroviride*. Observou-se um alto número de cópias de proteínas relacionadas à degradação de lignina e quitina para todas as espécies de *Trichoderma* analisadas, enquanto a presença de licheninase GH12 foi observada apenas em *T. agriamazonicum*. A análise de mineração genômica identificou 33 clusters de genes biossintéticos (BGCs), dos quais 27 são novos ou não caracterizados, sendo os principais BGCs relacionados à produção de policetídeos. Esses resultados demonstram o potencial desta nova espécie descrita para a agricultura e biotecnologia.

**Palavras-chave:** Fungos amazônicos, Peptaibóis, Pós-colheita, Biocontrole



## Abstract

The genus *Trichoderma* comprises more than 500 valid species and is commonly used in agriculture for the control of plant diseases. In the present study, a *Trichoderma* species isolated from *Scleronema micranthum* (Malvaceae) has been extensively characterized and the morphological and phylogenetic data support the proposition of a new fungal species herein named *Trichoderma agriamazonicum*. This species inhibited the mycelial growth of all the nine phytopathogens tested both by mycoparasitism and by the production of VOCs, with a highlight for the inhibition of *Corynespora cassiicola* and *Colletotrichum* spp. The VOCs produced by *T. agriamazonicum* were able to control *Capsicum chinense* fruit rot caused by *Colletotrichum scovillei* and no symptoms were observed after seven days of phytopathogen inoculation. GC-MS revealed the production of mainly 6-amil- $\alpha$ -pyrone, 1-octen-3-ol and 3-octanone during interaction with *C. scovillei* in *C. chinense* fruit. The HLPC-MS/MS analysis allowed us to annotate trikoningin KBII, hypocrenone C, 5-hydroxy-de-O-methylasiodiplodin and unprecedented 7-mer peptaibols and lipopeptaibols. Comparative genomic analysis of five related *Trichoderma* species reveals a high number of proteins shared only with *T. koningiopsis*, mainly the enzymes related to oxidative stress. Regarding the CAZyme composition, *T. agriamazonicum* is most closely related to *T. atroviride*. A high protein copy number related to lignin and chitin degradation is observed for all *Trichoderma* spp. analyzed, while the presence of licheninase GH12 was observed only in *T. agriamazonicum*. Genome mining analysis identified 33 biosynthetic gene clusters (BGCs) of which 27 are new or uncharacterized, and the main BGCs are related to the production of polyketides. These results demonstrate the potential of this newly described species for agriculture and biotechnology.

**Keywords:** Amazon fungi, Peptaibols, Post-harvest, Biocontrol

## Introdução

Espécies de *Trichoderma* são ubíquas e comumente encontradas no solo, em plantas ou madeira em decomposição. Elas têm sido amplamente utilizadas na agricultura devido à sua capacidade de secretar enzimas líticas e produzir metabólitos secundários bioativos e compostos orgânicos voláteis (VOCs), os quais podem ser usados no crescimento e proteção das plantas (SHARMA et al., 2019; SOOD et al., 2020; POVEDA, 2021; WOO et al., 2022). As espécies de *Trichoderma* também são grandes produtoras de peptaibóis, polipeptídeos ricos em ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico com atividade na membrana, que possuem diversas propriedades, incluindo atividades antimicrobiana e antifúngica, e têm sido relatados como terapêuticos antiplasmódicos de próxima geração (MARIK et al., 2019; GAVRYUSHINA et al., 2021; LEE et al., 2021).

O gênero *Trichoderma* foi descrito por Persoon (1794) e muitas revisões de sua taxonomia foram realizadas nas últimas décadas, o que aumentou significativamente o número de espécies no gênero, principalmente devido à incorporação de outros códigos de barras, como a endocitinase ech42, a subunidade beta da RNA polimerase dirigida por DNA rpb2, e os genes do fator de alongação de tradução tef1- $\alpha$  para identificação molecular (KULLNIG-GRADINGER et al., 2002; CHAVERRI et al., 2003; DRUZHININA et al., 2006; JAKLITSCH et al., 2006; CHAVERRI et al., 2015). Recentemente, uma diretriz de identificação molecular de *Trichoderma* foi estabelecida com base em uma abordagem polifásica, preparando assim a taxonomia de *Trichoderma* para a era genômica (CAI; DRUZHININA, 2021). De acordo com o Index Fungorum (2015), mais de 500 espécies válidas foram descritas para o gênero.

Apesar da grande quantidade de espécies descritas até o momento, o número de genomas completos de *Trichoderma* disponíveis em bases de dados públicas ainda é baixo, com apenas 87 genomas sequenciados no Joint Genome Institute JGI ([mycocosm.jgi.doe.gov](http://mycocosm.jgi.doe.gov)). Genomas completos podem permitir a prospecção e obtenção de novos metabólitos e enzimas de interesse biotecnológico (GUPTA et al., 2016; SUN et al., 2019; SHENOUDA; COX, 2021; ZHU et al., 2021). O uso de mineração de genoma para prever moléculas também pode acelerar a descoberta de novos medicamentos por meio da abordagem de descoberta de produtos naturais sintético-bioinformáticos (CHU et al., 2016; CHU et al., 2019; CHU et al., 2020). No futuro próximo, o sequenciamento completo do genoma da espécie tipo permitirá uma comparação global do genoma, com análise de centenas ou milhares de genes, o que ajudará a resolver espécies taxonômicas crípticas e identificação ambígua em *Trichoderma* por meio de análise filogenômica.

Espécies de *Trichoderma* das seções (sensu clado Viride) incluíam espécies de *Trichoderma* dos clados extintos Rufa e Pachybasium A e englobam espécies do agregado *Trichoderma koningii*, como *T. ovalisporum*, *T. caribbaeum*, *T. dorotheae*, *T. dingleyae*, *T. koningiopsis*, *T. petersenii* e *T. taiwanense*, *T. texanum*, *T. rogersonii*, *T. austrokingii* e *T. stilbohypoxyli* (SAMUELS et al., 2006; MONTOYA et al., 2016; CAI et al., 2021). Este clado é caracterizado por pústulas contendo formações agregadas de conidióforos e tem aplicações na agricultura como agente de biocontrole (SAMUELS et al., 2006; JOHN et al., 2010; AYELE et al., 2021; POVEDA, 2021; RUSH et al., 2021).

Neste estudo, isolamos uma nova espécie fúngica de *Trichoderma* de *Scleronema micranthum* (Malvaceae), uma planta nativa da floresta amazônica que é utilizada na silvicultura. Esta nova espécie foi amplamente caracterizada com base em caracteres morfológicos, como o comprimento dos conídios, fialides e clamidósporos, análise de sequências dos locos ITS, *tef-1 $\alpha$*  e *rpb2*, atividade micoparasitária, produção e atividade de compostos orgânicos voláteis (VOCs) contra diferentes fitopatógenos, anotação de metabolitos secundários e análise genômica comparativa.

## **Material e métodos**

### *Origem da linhagem*

A linhagem INPA 2475 examinada foi obtida do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e foi isolada em 2004 como um endófito da madeira de *Scleronema micranthum* em Manaus, estado do Amazonas, Brasil.

### *Caracterização morfológica*

A macromorfologia foi realizada em quatro meios de cultura diferentes: PDA (200 g/L de batata; 20 g/L de dextrose; 15 g/L de agar), MEA (30 g/mL de extrato de malte; 5 g/mL de peptonas; 15 g/L de agar), CMD (50 g/L de fubá de milho; 15 g/L de agar; 20 g/L) e SNA (1 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L de KNO<sub>3</sub>, 0,5 g/L de MgSO<sub>4</sub>, 0,5 g/L de KCl, 0,2 g/L de glicose, 0,2 g/L de sacarose, 20 g/L de agar) sob incubação a 25 °C por 72 h. Para a micromorfologia, a cultura foi preparada em meios PDA, CMD e SNA e incubada a 25 °C por 72 h, e 30 estruturas de conídios,

fialídeos e clamidósporos foram medidas sob microscópio (Zeiss). A microscopia eletrônica de varredura (JSM-IT500HR) foi utilizada para obter as imagens das microestruturas, realizadas no Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos da Universidade do Estado do Amazonas (CMABio). Para isso, a microcultura foi preparada em PDA e incubada a 28 °C por 4 dias, fixada com fixador de Karnovsky e depois desidratada com concentrações crescentes de álcool (30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%) por 15 min cada. A etapa com álcool absoluto foi repetida duas vezes. A microcultura foi seca em secador de ponto crítico (Leica EM CPD300) e então submetida a douramento a ouro (DII-29010SCTR Smart Coater).

#### *Isolamento de DNA e amplificação por PCR*

Para obter a massa micelial do isolado INPA 2475, os micélios foram cultivados no meio PD (20 g/L de batata; 20 g/L de dextrose) por dois dias. O caldo foi filtrado e o DNA isolado utilizando o protocolo CTAB (Doyle, 1987). A quantidade de DNA obtido foi estimada por espectrofotometria (NanoDrop 2000, Thermo Scientific), enquanto a integridade foi verificada via eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v). Cada reação de PCR foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 2,5 µL de buffer 10X Easysaq®, 10 nM dNTP, 1 U de polimerase Easysaq®, 0,5 pM de cada primer, 1 µL de DNA total (50 ng) e água destilada autoclavada para atingir o volume final. As reações de amplificação dos três loci (ITS, *tef1-α* e *rpb2*) foram as seguintes: desnaturação inicial do DNA a 95 °C por 3 min, 35 ciclos com desnaturação a 95 °C por 45 s, etapa de anelamento a 55 °C por 45 s, seguida de extensão a 72 °C por 60 s. A extensão final foi realizada a 72 °C por 5 min. Os produtos de PCR foram resolvidos em gel de agarose 1,5% (p/v) corado com brometo de etídio, documentados por foto usando um sistema de imagem molecular (Loccus Biotecnologic L-Pix. Chemi), e os amplicons foram comparados com o marcador 1 kb plus (Invitrogen, número do catálogo: 10787018). O par de primers EF-1αF (ATGGGTAAGGARGACAAGAC) e EF-1αR (GGARGTACCAGTSATCATGTT) foi utilizado para amplificar a sequência parcial do gene do fator de alongação da tradução (O'Donnell et al., 1998, Carbone e Kohn, 1999), os primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATG) foram utilizados para amplificação do espaçador transcrito interno (White et al., 1990) e os primers fRPB2-5 f (GAYGAYMGWGATCAYTTYGG) e fRPB2-7cr (CCCATRGCTbTGTYYY) foram utilizados para amplificar a sequência parcial da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (Liu et al., 1999).

### *Sequenciamento do genoma*

O genoma completo foi sequenciado usando a plataforma Illumina de 150 pb paired-end. A montagem “de novo” foi realizada usando o montador SPAdes (Prjibelski et al., 2020), e resultou em 36.426.151 pb com cobertura de 103X e 109 scaffolds com N50 de 1.650.868 pb. O genoma montado foi depositado no GenBank sob o número de acesso JARPVV000000000.

### *Análise filogenética*

As sequências de consenso foram obtidas com base no alinhamento das sequências diretas e reversas usando o software DNA baser assembly (<http://www.dnabaser.com/>). As novas sequências obtidas foram depositadas no GenBank sob os números de acesso OQ221157 (ITS), OQ241434 (*tef1- $\alpha$* ) e OQ241435 (*rpb2*). As sequências de ITS foram usadas para identificação dos gêneros conforme as recomendações nas diretrizes de *Trichoderma* (Cai et al., 2021), e a identificação filogenética do isolado INPA 2475 foi realizada por uma triagem inicial de proximidade usando sequências de *tef1- $\alpha$*  de 103 espécies de *Trichoderma* pertencentes ao clado 5, obtidas no banco de dados Trichokey, na seção de taxonomia de *Trichoderma* ([trichokey.com/index.php/trichoderma-taxonomy-2020](http://trichokey.com/index.php/trichoderma-taxonomy-2020)). As sequências de espécies relacionadas de perto foram selecionadas para análise concatenada. O conjunto final de dados resultou em 46 sequências de *Trichoderma* spp. (22 = espécies relacionadas ao clado 5; 23 = espécies pertencentes ao clado 1), em que *Trichoderma undulatum* foi usado como grupo externo.

As sequências de *tef1- $\alpha$*  e *rpb2* foram alinhadas individualmente usando a ferramenta MAFFT no software UGENE (Okonechnikov et al., 2012). Os alinhamentos foram plotados no IQ-TREE 2 (Minh et al., 2020) e uma análise filogenética usando máxima verossimilhança (mL) foi realizada com as sequências concatenadas de *tef1- $\alpha$*  e *rpb2*. A inferência bayesiana (BI) foi realizada via CIPRES ([www.phylo.org](http://www.phylo.org)). A análise de ML incluiu 1000 réplicas (bootstrap) utilizando todos os sites, com o melhor modelo selecionado pelo IQ-TREE. A inferência bayesiana (BI) foi baseada no modelo adotado no PAUP \* 4 e Mrmodeltest2 v2 (Nylander 2004). Todos os sites nos loci foram considerados; a análise foi realizada por dez milhões de gerações, com os primeiros 25% das árvores descartadas e queimadas usando a ferramenta MrBayes v 3.7 disponível no CIPRES (<https://www.phylo.org/>). A probabilidade posterior (PP) e a topologia da árvore foram visualizadas via Figtree v 1.1.2 (Rambaut 2009). A árvore consensual das análises de ML e BI foi gerada manualmente a partir da topologia obtida usando a plataforma iTol

(<https://itol.embl.de/>) na análise BI com os valores de probabilidade posterior, além dos valores de bootstrap gerados pela análise de máxima verossimilhança, usando o pacote de edição CorelDraw 2020.

### *Fitopatógenos usados nos ensaios de cultura dupla e VOC*

Os fitopatógenos usados neste trabalho pertencem à coleção microbiológica do Laboratório de Fitopatologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e ao Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental. As espécies e os códigos da coleção são: *Corynespora cassiicola* INPA 2671, *Colletotrichum scovillei* INPA 2910, *Colletotrichum sp.* INPA 2973, *Rhizoctonia sp.* INPA 2942, *Alternaria sp.* SMPT 22, *Colletotrichum siamense* CPAA Coll 2 N, *Fusarium decemcellulare* CPAA CEB 39N e *Fusarium graminearum* CELO 01. Esses patógenos foram escolhidos devido à sua relevância em doenças de plantas na região amazônica e por suas interações ecológicas com fungos antagonistas, como o *Trichoderma*.

### *Ensaio de cultura dupla*

Os ensaios de cultura dupla foram realizados para avaliar a capacidade do isolado INPA 2475 em inibir o crescimento de fitopatógenos. Os fungos foram cultivados em meios de cultura PDA por 72 horas, a 28 °C, e os ensaios foram conduzidos em triplicata. Para cada experimento, um disco de 5 mm de diâmetro do fungo antagonista foi colocado no centro de uma placa de Petri contendo PDA, enquanto discos de 5 mm dos patógenos foram dispostos a 3 cm de distância, em lados opostos. A placa foi incubada a 28 °C por 72 horas, e o diâmetro da zona de inibição foi medido. O teste foi realizado em triplicata, e os resultados foram analisados para determinar a eficácia do isolado INPA 2475 como agente de biocontrole.

### *Análise de Voláteis Orgânicos (VOC)*

A produção de voláteis orgânicos (VOCs) foi analisada usando o método de câmara de cultivo fechada, conforme descrito por Kai et al. (2009). O isolado INPA 2475 foi cultivado em frascos de vidro de 250 mL contendo 50 mL de meio PDA, e os fitopatógenos foram cultivados

em frascos separados. O cultivo foi realizado por 72 horas a 28 °C, e os voláteis foram coletados utilizando um sistema de absorção em tubo de adsorvente de carvão ativado. Após a coleta, os VOCs foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) para identificar os compostos voláteis emitidos pelo fungo antagonista. A análise foi realizada em triplicata para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

#### *Eficácia dos VOCs do INPA 2475 no controle da antracnose em *Capsicum chinense* Jaq. causada por *Colletotrichum scovillei**

Frascos de vidro borossilicato (200 mL) contendo 50 mL de meio PDA foram inoculados com discos de micélio do isolado INPA 2475 e incubados por 2 dias a 28 °C. Após este período, frutos de pimenta foram imersos em solução concentrada de esporos de *C. scovillei* (10<sup>8</sup> esporos/mL), envoltos em gaze e fixados na tampa do frasco, que foi selado com parafilme. O frasco foi incubado a 28 °C e avaliado após 7 dias. No controle, seguiu-se o mesmo procedimento, exceto pela inoculação de *Trichoderma* INPA 2475. O experimento foi conduzido em triplicata.

#### *Análise estatística*

Os dados dos nove fitopatógenos foram testados quanto à normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk,  $P \geq 0,05$ ) usando o pacote *stats* v4.1.3 do R (R CORE TEAM, 2022) e homogeneidade de variâncias (teste de Levene,  $P \geq 0,05$ ) com o pacote *car* v3.0–12. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) para comparações pareadas entre os fitopatógenos, utilizando o pacote *agricolae* v1.3–5 (MENDIBURU, 2021).

#### *Análise genômica comparativa*

A análise de genes ortólogos foi realizada comparando o genoma do INPA 2475 com quatro espécies filogeneticamente próximas. As sequências foram submetidas à predição de proteínas pelo pipeline ASAP (BRANDES et al., 2016), e os dados FASTA gerados foram plotados no Orthovenn2 (orthovenn2.bioinfotoolkits.net). O genoma do INPA 2475 também foi analisado na

plataforma fungiSMASH (<https://fungismash.secondarymetabolites.org/>) para identificação de clusters gênicos de biossíntese. As sequências proteicas de *T. agriamazonicum* e quatro espécies relacionadas (*T. viride*, *T. atroviride*, *T. koningiopsis* e *T. koningii*) foram submetidas ao servidor dbCAN2 (<https://bcbl.unl.edu/dbCAN2/blast.php>) para anotação de famílias CAZy usando a ferramenta HMMER. Um *heatmap* das principais enzimas de degradação de parede celular foi gerado com o pacote R *pheatmap* v1.0.12 (<https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>).

### *Identificação de VOCs por GC-MS*

Frascos Kitassato (500 mL) foram utilizados para quatro tratamentos: 1) amostra de pimenta (*Capsicum chinense*); 2) pimenta inoculada com *C. scovillei*; 3) meio PDA (25 mL) com INPA 2475; 4) meio PDA com INPA 2475 + pimenta inoculada. Os frascos foram selados e mantidos a 28 °C por 7 dias. No sétimo dia, a fibra SPME (DVB/CAR/PDMS, 50/30 µm, Supelco) foi exposta aos VOCs por 60 min a 45 °C e analisada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (GC-MS Shimadzu QP2010 plus). A desorção ocorreu a 270 °C por 300 s. A separação cromatográfica foi realizada em coluna Rtx-5 (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm) com hélio como gás de arraste (1 mL/min). Programa de temperatura: 50 °C inicial, aumento de 5 °C/min até 300 °C, mantido por 10 min. Os compostos foram identificados pela biblioteca NIST e índices de retenção (RI) calculados com alcanos lineares (C7–C30) conforme equação de Van Den Dool–Kratz (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963).

### *Análise por HPLC/MS-MS*

A separação foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC Thermo-Ultimate 3000) com coluna C18 Kinetex Coreshell (100 × 4,6 mm, 2,6 µm) a 50 °C. Foram injetados 5 µL da amostra, com fase móvel de água (A) e acetonitrila (B), ambas com 0,1% de ácido fórmico, em gradiente: 0–2 min (10% B), 2–12 min (10–95% B), 12–15 min (95% B), 15–16 min (10% B), 16–19 min (10% B). O HPLC foi acoplado a espectrômetro de massas Orbitrap ID-X™ (ionização por eletronebulização, +3500 V, 263 °C). A aquisição de massas ocorreu no intervalo  $m/z$  100–1500 (resolução 70K em  $m/z$  200). A análise MS/MS foi realizada com resolução 17,5K, janela de isolamento de  $m/z$  3,0.

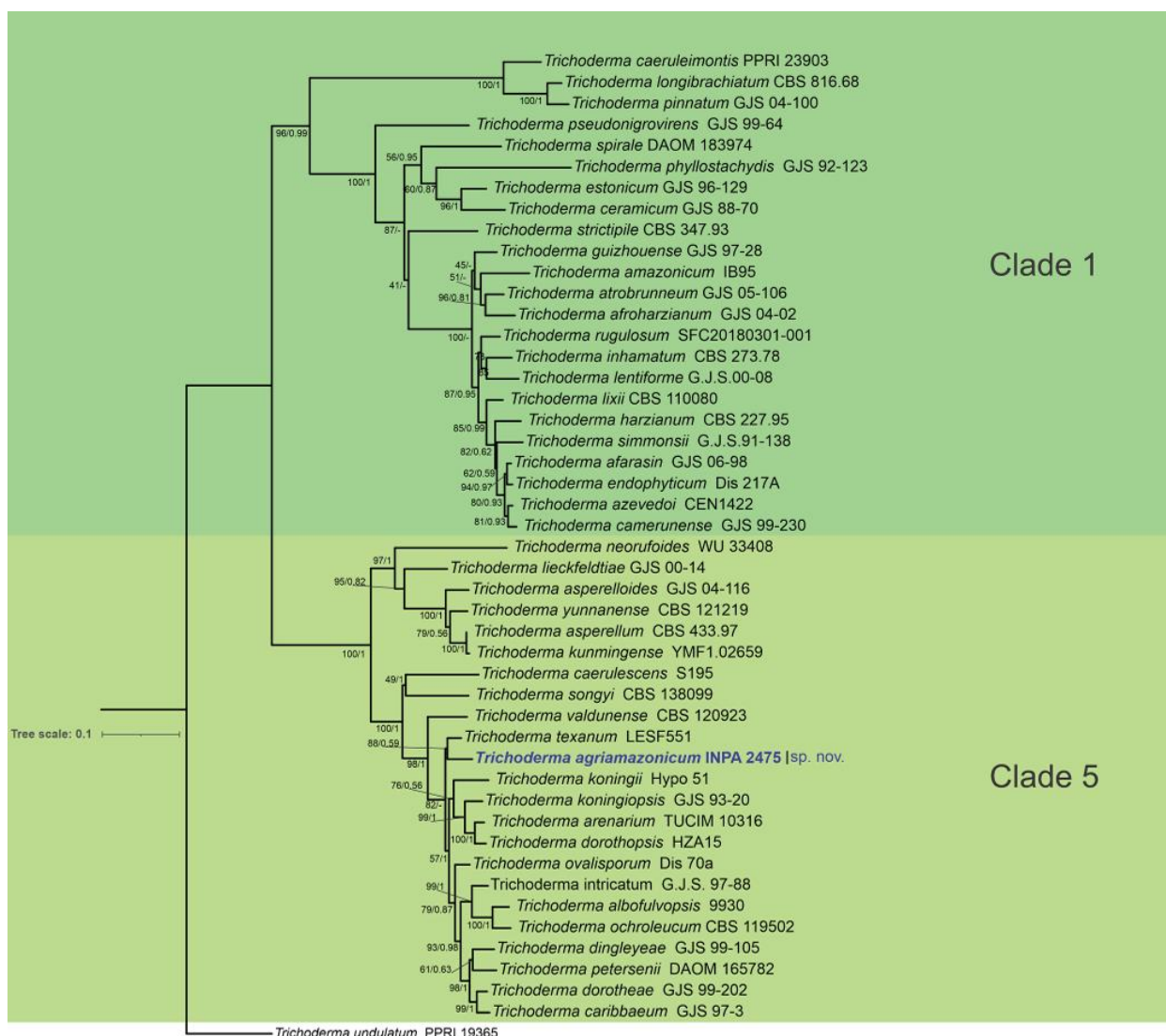


## Resultados

### *Análise Filogenética*

A filogenia baseada em 103 sequências do gene \*tefl- $\alpha$ \* de espécies de *Trichoderma* pertencentes ao clado 5 revelou uma posição inequívoca do isolado INPA 2475, com suporte de bootstrap elevado, indicando tratar-se de uma nova espécie e apresentando proximidade filogenética com *T. ovalisporum* (Fig. S1, dados suplementares). A análise concatenada das sequências de *tefl- $\alpha$*  e *rpb2* das espécies mais próximas utilizou um alinhamento de 1166 caracteres, incluindo gaps (*tefl- $\alpha$* : 607; *rpb2*: 559). O modelo evolutivo mais adequado para a análise Bayesiana (BI), determinado pelo PAUP\* 4, foi HKY+I+G para \*tefl- $\alpha$ \* e SYM+G para *rpb2*. Na análise de Máxima Verossimilhança (mL), os modelos selecionados foram HKY+F+I+G4 para *tefl- $\alpha$*  e TNe+G4 para *rpb2*. A análise concatenada demonstrou a formação de um clado-irmão com *T. texanum*, sustentando a proposição de um novo táxon (Fig. 1).

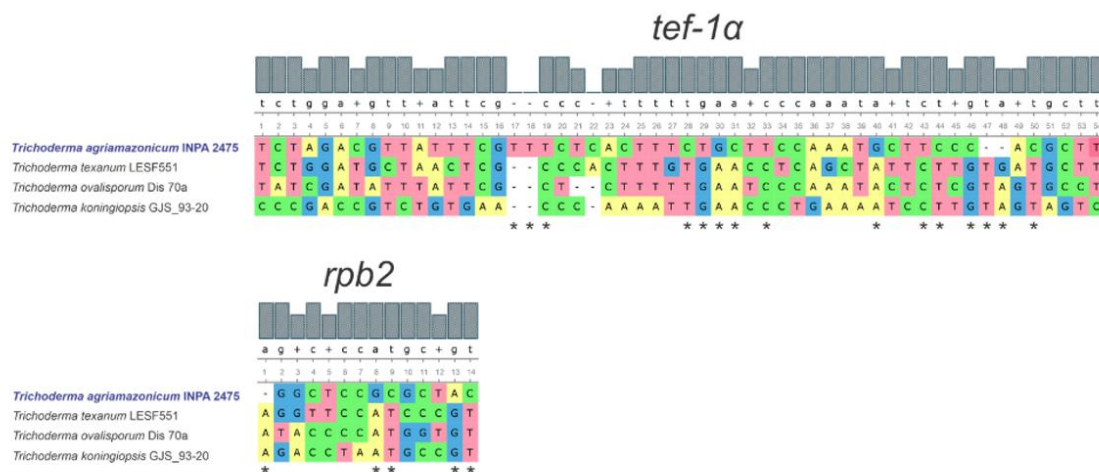
A filogenia com loci não concatenados reforçou a hipótese de nova espécie, evidenciando agrupamentos distintos nas filogramas (Figs. S1 e S2, dados suplementares). Esses resultados, combinados com características morfológicas e metabólicas únicas do isolado INPA 2475, corroboram sua delimitação como uma espécie ainda não descrita dentro do gênero *Trichoderma*.



**Figura 1.** Filograma gerado pela análise concatenada das sequências de *tefl- $\alpha$*  e *rpb2* de *Trichoderma agriamazonicum* e espécies próximas do clado 5, com *Trichoderma* do clado 1. Os números nas ramificações indicam o suporte estatístico (máxima verossimilhança/mL e probabilidades posteriores Bayesianas/PP). A nova espécie (*Trichoderma agriamazonicum*) está destacada em azul escuro. *Trichoderma undulatum* (clado 8) foi utilizado como *outgroup*. A análise revelou a posição filogenética distinta do isolado INPA 2475, formando um clado-irmão com *T. texanum* (clado 5), corroborando sua proposição como novo táxon.

Ao investigar as diferenças nucleotídicas entre o isolado INPA 2475 e as espécies próximas *T. texanum* e *T. ovalisporum*, foram identificadas 39 posições distintas em relação a *T. texanum* (*tefl- $\alpha$* : 31; *rpb2*: 8) e 37 posições distintas em relação a *T. ovalisporum* (*tefl- $\alpha$* : 28; *rpb2*: 9). Quando comparado a *T. koningiopsis*, as diferenças aumentaram para 52 posições nucleotídicas (*tefl- $\alpha$* : 42; *rpb2*: 10). Além disso, o isolado INPA 2475 de *T.*

*agriamazonicum* apresentou polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em 20 posições (*tef1-α*: 15; *rpb2*: 5) em relação a *T. ovalisporum*, *T. texanum* e *T. koningiopsis* (Fig. 2). Esses dados moleculares, combinados com características morfológicas únicas, sustentam a proposta do isolado INPA 2475 como uma nova espécie fúngica, denominada *Trichoderma agriamazonicum*.



**Figura 2.** Polimorfismo identificado nos genes *tef1-α* e *rpb2* em *Trichoderma agriamazonicum* sp. nov. e espécies estreitamente relacionadas; o asterisco indica o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) presente apenas em *T. agriamazonicum*.

### Taxonomia

*Trichoderma agriamazonicum* T.F. Sousa & G.F. Silva, sp. nov.

**Tipificação:** Mycobank: MB 848125

**Tipo:** —BRASIL. Amazonas, no tecido de *Scleronema micranthum*, 2004, tipo: INPA 2475. O tipo está depositado no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia sob o código de coleção: INPA 2475. As sequências desta linhagem foram depositadas no GenBank com os números de acesso: ITS = OQ221157, *tef1-α* = OQ241434, *rpb2* = OQ241435.

### Macromorfologia:

Colônias a 25 °C e crescendo por 72 h em meio PDA apresentam um micélio branco de aparência algodoadosa, com baixa produção de conídios e conidióforos, e um micélio esparso no centro; não foi observada produção de pigmentos ou exsudatos; raio da colônia após 72 h em PDA: 55,4 – 56,3 mm (Fig. 3A).

Colônias a 25 °C e crescendo por 72 h em meio CMD apresentam um micélio branco a hialino esparso, com baixa produção de pústulas na zona de contato das hifas, baixa produção de

conídios e conidióforos; não foram observados pigmentos ou exsudatos em meio CMD; raio da colônia após 72 h em CMD: 43,8–44 mm.

Colônias a 25 °C e crescendo por 72 h em meio MEA apresentam um micélio branco de aparência algodonosa, com micélio esparso na borda e baixa produção de conídios e conidióforos; não foram observados pigmentos ou exsudatos em meio MEA; raio da colônia após 72 h em MEA: 48,1–48,8 mm.

Colônias a 25 °C e crescendo por 72 h em meio SNA apresentam um micélio branco esparso, com abundante produção de pústulas, conídios e conidióforos, formando um anel concêntrico; não foi observada produção de pigmentos ou exsudatos; raio da colônia após 72 h em SNA: 25,4–25,8 mm (Fig. 3A).

#### **Micromorfologia em PDA:**

Conidióforos apresentam paredes lisas, contendo 2–3 fialides lageniformes, medindo 5,27–8,9 µm (M=7,16 µm) × 1,9–3,3 µm (M=2,27 µm) (Fig. 3B, C, F), com conídios globosos de cor verde-amarelada, medindo 2,96–4,10 µm (M=3,47 µm) × 2,82–3,64 µm (M=3,21 µm) (Fig. 3G). Presença de clamidósporos terminais com 4–5,37 µm (M=4,99 µm) × 4,36–4,92 µm (M=4,65 µm) (Fig. 3D, E) e clamidósporos intercalares com 5,94–6,3 µm (M=6,1 µm) × 3,2–3,82 µm (M=3,5 µm) (Fig. 3H).

#### **Micromorfologia em SNA:**

Conidióforos apresentam paredes lisas, contendo 2–3 fialides lageniformes, medindo 5,1–8,6 µm (M=7,12 µm) × 1,7–3,2 µm (M=2,19 µm), com conídios globosos de cor verde-amarelada, medindo 2,97–3,98 µm (M=3,46 µm) × 2,67–3,47 µm (M=3,13 µm). Presença de clamidósporos terminais com 5,44–9,04 µm (M=6,93 µm) × 5,32–8,38 µm (M=6,74 µm) e clamidósporos intercalares com 7–8,8 µm (M=7,64 µm) × 3,8–4,72 µm (M=4,73 µm).

#### **Micromorfologia em CMD:**

Conidióforos apresentam paredes lisas, contendo 2–3 fialides lageniformes, medindo 5,09–

9,16  $\mu\text{m}$  (M=7,11  $\mu\text{m}$ )  $\times$  2,11–4,05  $\mu\text{m}$  (M=3,12  $\mu\text{m}$ ), com conídios globosos de cor verde-amarelada, medindo 3,07–4,05  $\mu\text{m}$  (M=3,44  $\mu\text{m}$ )  $\times$  2,93–4,19  $\mu\text{m}$  (M=3,60  $\mu\text{m}$ ). Presença de clamidósporos terminais com 6,82–9,38  $\mu\text{m}$  (M=8,23  $\mu\text{m}$ )  $\times$  4,89–7,26  $\mu\text{m}$  (M=5,79  $\mu\text{m}$ ).

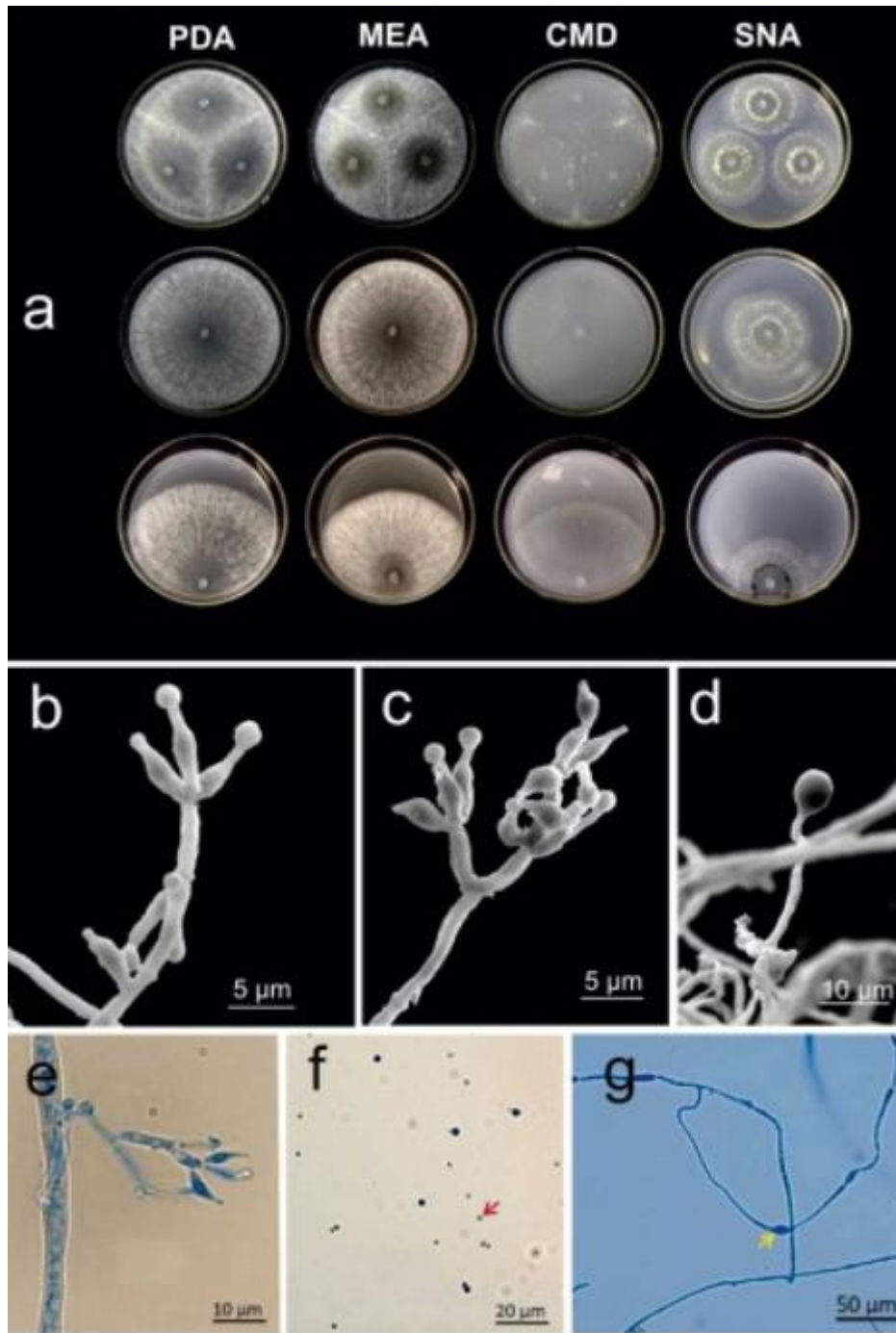
**Estágio sexual:** Não observado.

**Distribuição:** Brasil, estado do Amazonas.

**Etimologia:** Refere-se ao potencial para o controle de fitopatógenos de interesse agrícola e à localização onde o tipo foi isolado.

**Notas:**

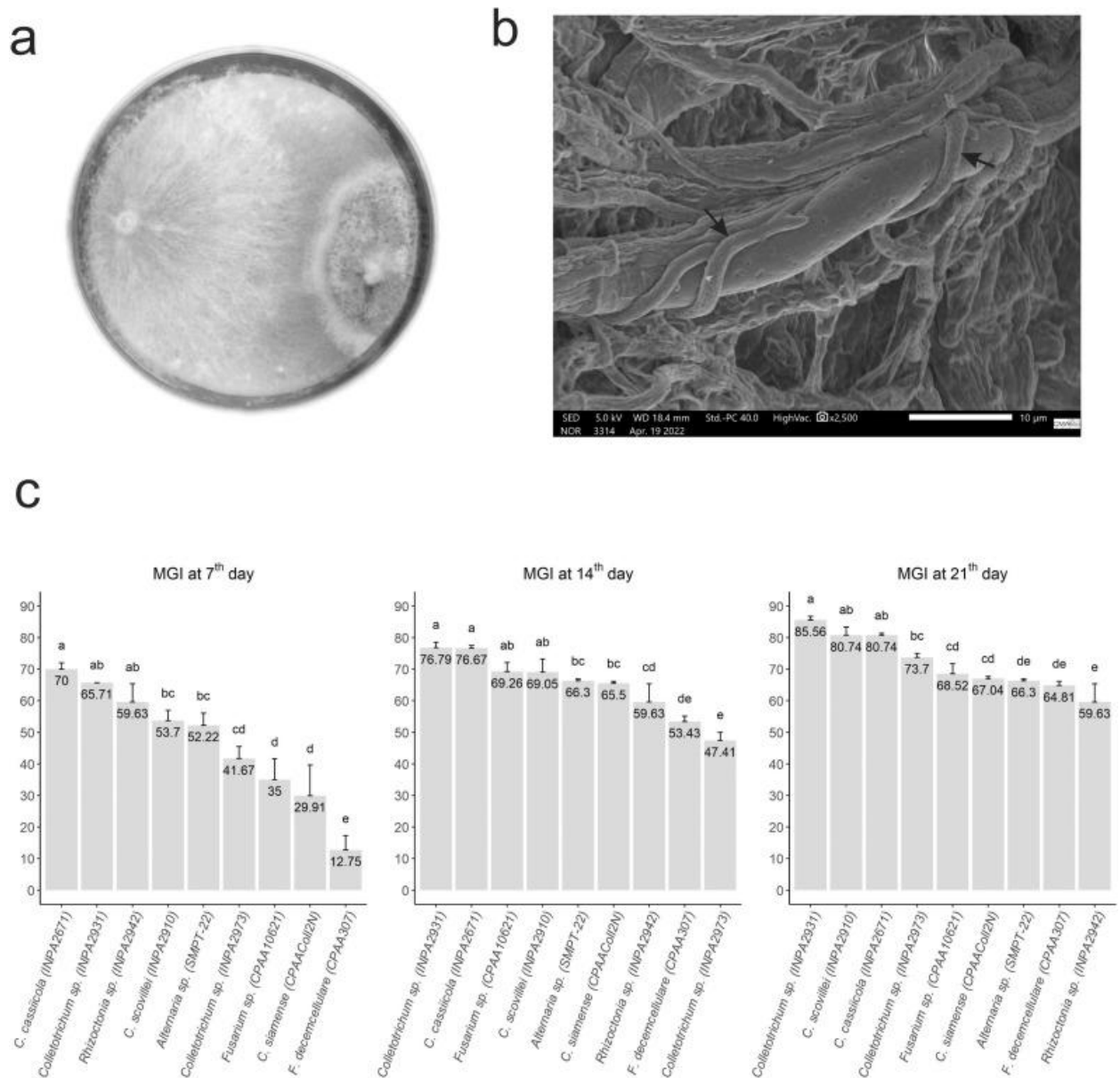
*Trichoderma agriamazonicum* difere de *Trichoderma texanum* pela ausência do pigmento amarelo no micélio nos meios PDA, MEA e SNA, baixa formação de pústulas após 72 h em PDA, cor dos conídios, menor tamanho das fialides e presença de clamidósporos terminais. Difere de *Trichoderma ovalisporum* pela baixa produção de pústulas, conídios e conidióforos.



**Figura 3.** a Morfologia da colônia de *Trichoderma agriamazonicum* sp. nov. nos meios PDA, MEA, CMD e SNA. b, c, e Conidióforos. d Clamidósporo. f Conídios verde-amarelados (seta vermelha) e clamidósporos de cor azul-cotton. g Clamidósporo intercalares (seta amarela).

*Inibição do Crescimento Micelial de Fitopatógenos*

Para avaliar sua capacidade de biocontrole de fitopatógenos, *T. agriamazonicum* foi testado por meio de um ensaio de cultura dual. A inibição do crescimento micelial (MGI) > 50% foi observada para todos os fitopatógenos no final do 21º dia. O maior percentual de ICM foi observado para *Corynespora cassiicola* INPA 2671 (80,74%) (Fig. 4C, Fig. S3). Em contraste, o menor percentual foi observado para *Rhizoctonia* sp. INPA 2942 (59,63%). De modo geral, as espécies de *Colletotrichum* apresentaram MGI > 67,04% (Fig. 4C). Para *Fusarium decemcellulare* CPAA307 e *Fusarium* sp. CPAA 10621, foi observada apenas 12,75% e 35% de MGI, respectivamente, no 7º dia; no entanto, no 14º dia, a MGI aumentou para 53,43% e 69,26% (Fig. 4C). O fitopatógeno *Alternaria* sp. SMPT22 apresentou uma MGI de 66,66%. A interação entre *Colletotrichum siamense* CPAA Coll 2 N e *T. agriamazonicum* foi melhor caracterizada usando microscopia eletrônica de varredura (MEV), e o status de micoparasitismo foi confirmado. Na zona de contato do ensaio de cultura dual, as hifas de *T. agriamazonicum* comprimem as hifas de *C. siamense* (Fig. 4AB).



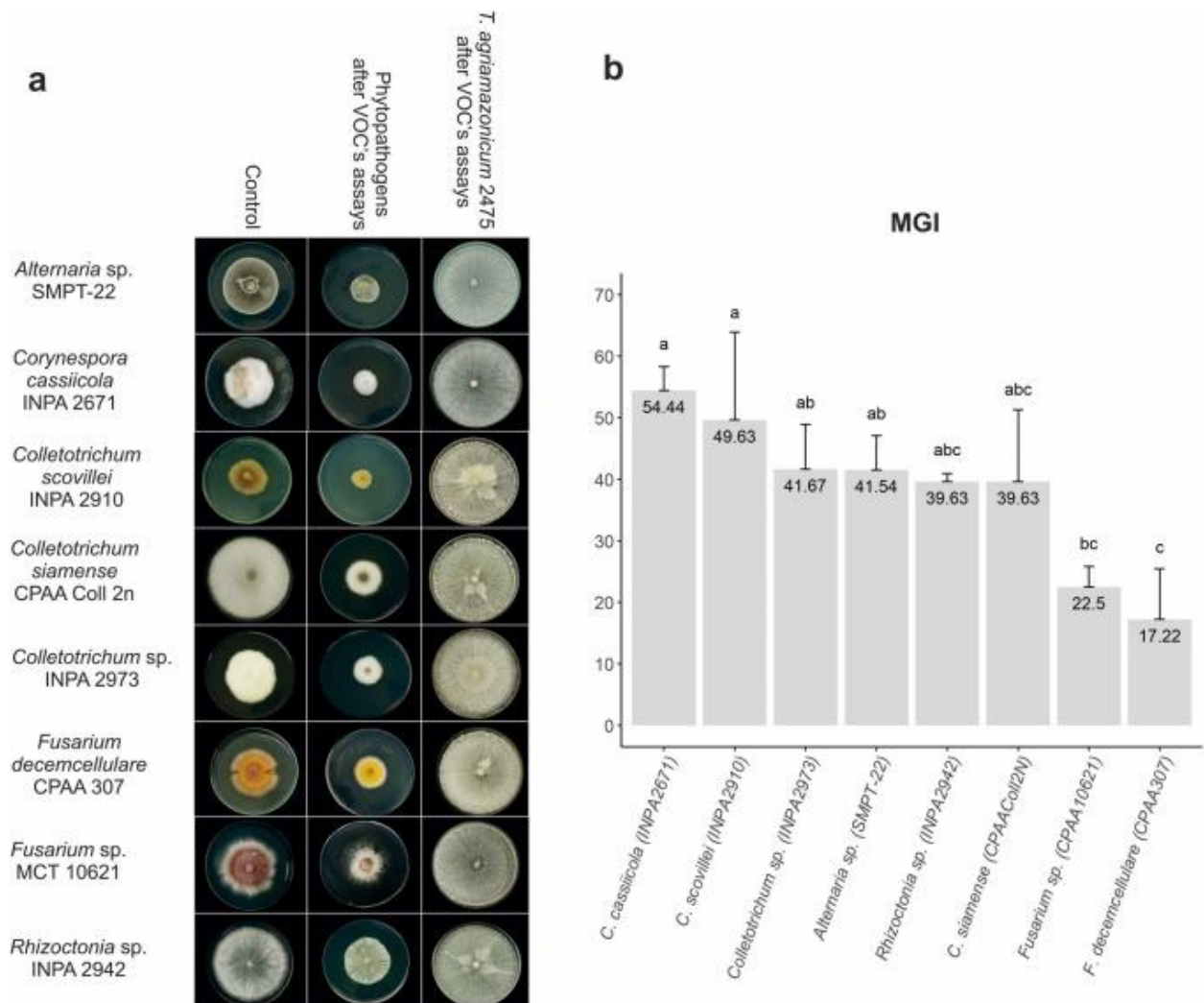
**Figura 4. a.** Placa de cultura pareada de *T. agriamazonicum* e *Colletotrichum siamense* CPAA Coll 2 N; **b.** Microscopia eletrônica de varredura da zona de contato entre *T. agriamazonicum* e *C. siamense*. Setas pretas mostram *T. agriamazonicum* comprimindo as hifas de *C. siamense*; **c.** Inibição do crescimento micelial (MGI) de *T. agriamazonicum* INPA 2475 contra nove fitopatógenos aos 7, 14 e 21 dias de inibição.

#### Efeito dos Compostos Orgânicos Voláteis (VOCs) no Crescimento Micelial de Fitopatógenos

O crescimento de todos os fitopatógenos foi afetado pelos VOCs de *T. agriamazonicum*. A principal inibição foi observada para *Corynespora cassicola* INPA 2671 (54%), enquanto uma inibição menor foi observada em *Fusarium* spp. (17% e 26%) (Fig. 5AB). *Colletotrichum* spp.,



*Alternaria* sp. SMPT22 e *Rhizoctonia* sp. INPA 2942 apresentaram >40% de MGI. Entre as espécies de *Colletotrichum*, *C. scovillei* INPA 2910, que causa podridão de frutos em *Capsicum chinense*, teve a maior inibição (50%) (Fig. 5AB).



**Figura 5. a** Efeito dos compostos orgânicos voláteis (VOCs) sobre o crescimento micelial dos fitopatógenos após sete dias. **b** Percentual de inibição do crescimento micelial (MGI).

#### *Efeito dos VOCs no controle da podridão de frutos causada por Colletotrichum scovillei*

Com base nos resultados da inibição do crescimento micelial pelos compostos orgânicos voláteis (VOCs) de *T. agriamazonicum*, foi realizado um ensaio in vivo utilizando frutos de *Capsicum chinense* para avaliar os efeitos dos VOCs no controle da podridão de frutos causada por *C. scovillei* INPA 2910. No 7º dia após a inoculação do fitopatógeno, não foram observados

sintomas no tratamento com *T. agriamazonicum*, enquanto o controle (não inoculado com INPA 2475) apresentou, nesse mesmo período, frutos completamente apodrecidos com abundante esporulação na superfície (Fig. 6).



**Figura 6.** Efeito dos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma agriamazonicum* na podridão de frutos de *Capsicum chinense* causada por *Colletotrichum scovillei* INPA 2910 após sete dias.

#### *Caracterização dos VOCs utilizando GC-MS*

Para identificar os compostos orgânicos voláteis (VOCs) produzidos por *Trichoderma agriamazonicum* no controle da podridão de frutos causada por *Colletotrichum scovillei* em *Capsicum chinense*, foi realizada uma análise por GC/MS-MS. Os VOCs produzidos por *T. agriamazonicum* durante a interação com *C. chinense* e *C. scovillei* foram 3-octanona, 2-octen-1-ol,  $\alpha$ -copaeno e ácido benzilacético. Os demais VOCs identificados em *T. agriamazonicum* estão listados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Compostos orgânicos voláteis identificados por GC/MS-MS em *Trichoderma agriamazonicum* INPA 2475 cultivado em PDA e durante a interação no fruto de *Capsicum chinense* inoculado com *Colletotrichum scovillei* INPA 2910. T + Cc+P = *Trichoderma agriamazonicum* INPA 2475 + *Capsicum chinense* e *Colletotrichum scovillei*.

Compostos	RT	Fórmula	<i>Trichoderma agriamazonicum</i>	Interação: T + Cc + P
1-Octen-3-ol	10.5	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub>	-	+
3-Octanone	10.8	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub>	+	+
2-Octen-1-ol	13.6	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub>	+	+
6-Amyl- $\alpha$ -pyrone	24.8	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	+	-
Furan-2-pentil	10.9	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O	+	-
$\alpha$ -Terpinene	11.8	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	+	-
1-Octanol	13.7	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O	+	-
2-Heptyfuran	17.5	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O	+	-
$\alpha$ - Copaene	24.5	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	+	+
Benzeneacetil acid	19.0	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	+	+

#### Análise por HPLC-MS/MS

A investigação dos metabólitos secundários foi realizada manualmente através da análise de massa exata, considerando o erro de massa de 5 ppm; o perfil de fragmentação e anotações específicas em bancos de dados também foram utilizados (Fig. S5, Tabela S1). O processo de dereplicação química foi conduzido utilizando Dereplicator+ e METABOLOMICS-SNETS-V2 no site do Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS).

A interpretação manual dos espectros resultou na identificação de dois compostos com m/z 754,5 e 1350,8. As moléculas anotadas no GNPS foram hypocrenona C, 5-hidroxi-de-O-metilasiodiplodina e trikoningina KBII. O espectro MS/MS do íon m/z 153,0 corroborou a anotação da hypocrenona C pela presença de sinais de perda de ácido fórmico, etileno, H<sub>2</sub> e CO (Ding et al., 2015). Já o espectro MS/MS do íon m/z 295,1 apresentou um maior número de picos, a partir dos quais foram observadas perdas de H<sub>2</sub>O, CO e estruturas mais complexas (Yang et al., 2000).

O espectro MS do íon  $m/z$  1052,7  $[M+H]^+$ , supostamente oriundo do lipopeptaibol trikoningina KBII (Oc-Iva-Gly-Val-Aib-Gly-Gly-Val-Aib-Gly-Ile-Leuol), mostrou sinais de íons acílio resultantes da fragmentação sequencial da cadeia peptídica, iniciando-se a partir do aminoálcool leucinol da porção C-terminal (Fig. S8). O íon  $m/z$  382,2 abrangeu a porção N-terminal do peptídeo, relacionado a um fragmento acetilado Iva-Gly-Val com um grupo octanoílo (Auvin-Guette et al., 1993).

Um pequeno lipopeptaibol, composto por sete resíduos de aminoácidos ainda não descrito na literatura, pôde ser anotado a partir do espectro MS do íon  $m/z$  754,5  $[M+H]^+$ . A interpretação do padrão de fragmentação dessa substância permitiu propor a sequência Oc-Vxx-Gly-Vxx-Aib-Gly-Lxx-Lxxol (onde Vxx pode ser valina ou isovalina, Lxx pode ser leucina ou isoleucina, e Lxxol representa leucinol ou isoleucinol) (Fig. S9). Além do lipopeptaibol, também foram detectadas duas novas sequências de peptaibóis de 7 resíduos em  $m/z$  684,4 e 698,4 (Fig. S6–S7). Na fragmentação do  $m/z$  698,4, a porção C-terminal mostrou perda de 174,10 u, indicando os aminoácidos Gly-Lxxol. Outras perdas de massa incluíram  $m/z$  129,04 (Glu),  $m/z$  113,09 (Leu),  $m/z$  85,05 (Aib), e o íon N-terminal em  $m/z$  197,1 representando Ac-Pro-Gly. O íon  $m/z$  684,4 apresentou as mesmas perdas de massa, exceto pelo íon C-terminal 169,1, que corresponde a Gly-Vxxol. Os peptaibóis de 7 resíduos anotados (Ac-Pro-Gly-Glu-Leu-Aib-Gly-Lxxol e Ac-Pro-Gly-Glu-Leu-Aib-Gly-Vxxol) são inéditos na literatura e constituem novas sequências peptídicas putativas (Fig. S6–S7).

Adicionalmente, o espectro MS do íon  $m/z$  1350,8  $[M+H]^+$  apresentou picos característicos de perda de aminoálcool leucinol ou isoleucinol, além de sete sinais correspondentes ao resíduo Aib-Gly-Gly-Vxx-Aib-Gly-Lxx-Lxxol para o fragmento  $m/z$  680,4 (Fig. S10). Informações adicionais do espectro MS do aduto  $[M+2H]^+$  permitiram inferir que a porção N-terminal é composta por Oc-Vxx-Gly-Vxx-Aib-Gly-Gly-Vxx, formando um lipopeptaibol de 15 resíduos (Oc-Vxx-Gly-Vxx-Aib-Gly-Gly-Vxx-Aib-Gly-Gly-Vxx-Aib-Gly-Lxx-Lxxol), cuja sequência também é inédita na literatura. Os dados de fragmentação e erro de massa em ppm estão disponíveis na Tabela S1.

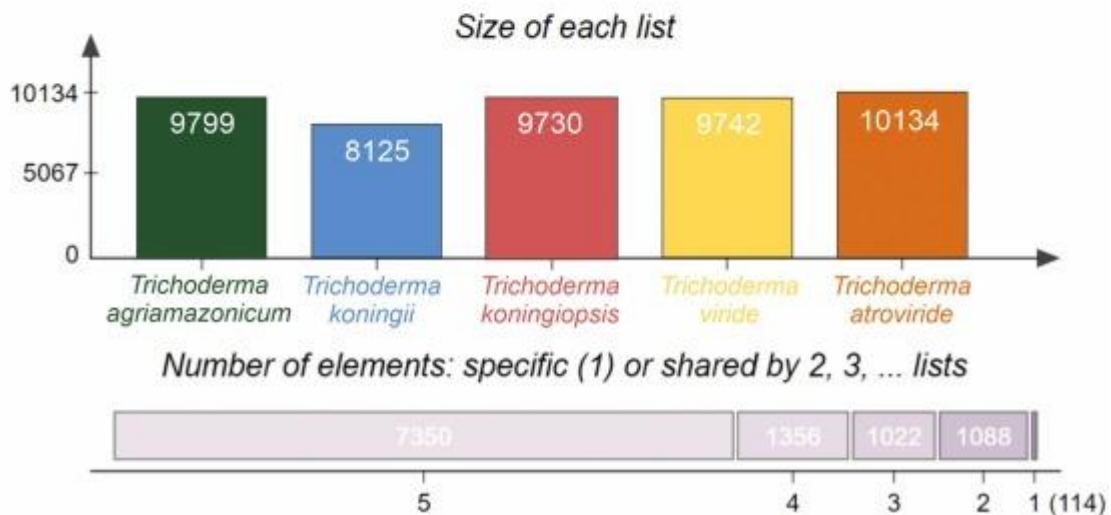
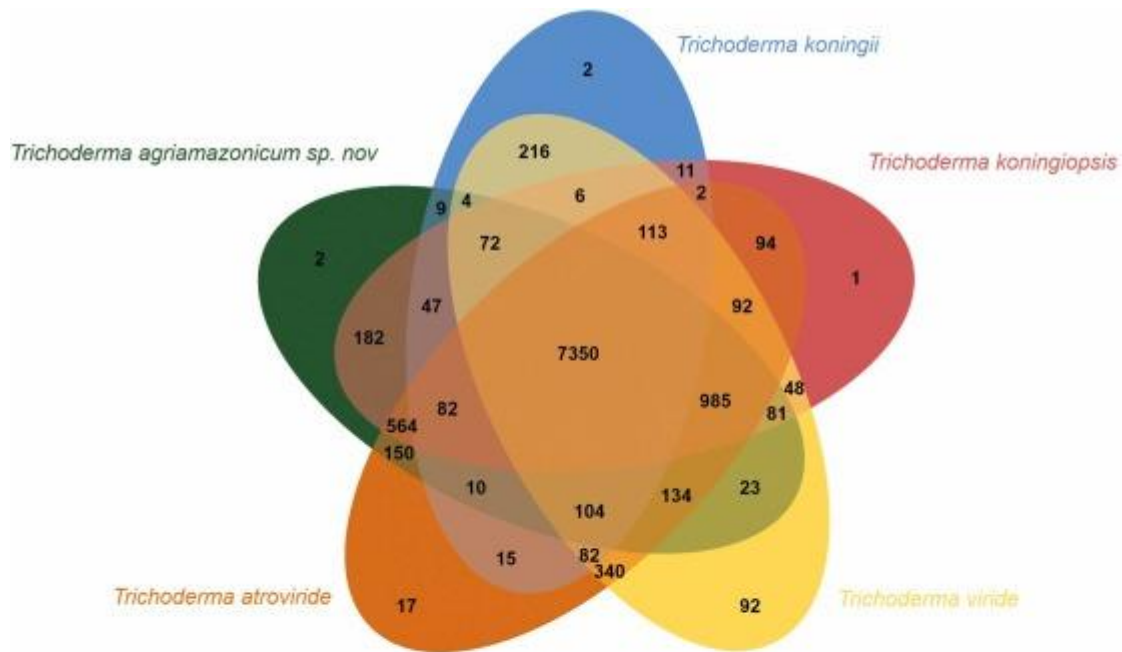
#### *Análise genômica comparativa utilizando análise de proteínas ortólogas*

A análise com o OrthoVenn de *T. agriamazonicum* resultou em 10.173 proteínas preditas e 9799 clusters, dos quais 7350 são compartilhados entre *T. viride*, *T. atroviride*, *T. koningiopsis* e *T. koningii*, que são as espécies mais próximas que possuem sequências genômicas disponíveis.

*T. koningiopsis* foi a espécie que mais compartilhou proteínas ortólogas (9363) com *T. agriamazonicum*. Apenas dois clusters são únicos de *T. agriamazonicum*; no entanto, estes são proteínas hipotéticas. 182 clusters ortólogos são compartilhados apenas entre *T. agriamazonicum* e *T. koningiopsis*, 150 entre *T. atroviride*, 23 entre *T. viride* e 9 entre *T. koningii*.

Dos 182 clusters compartilhados entre *T. koningiopsis* e *T. agriamazonicum*, de acordo com a função molecular, 46% estão relacionados à atividade de oxidoreductase (GO:0016491), 12% são previstos para atividade de transferase (GO:0016740), 12% para ligação a íons (GO:0043167), 9% para atividade de hidrolase (GO:0016787), 3% para ligação a nucleotídeos (GO:0000166), 3% para ligação a nucleosídeos (GO:0001882); 3% possuem função desconhecida (GO:0003674), 3% estão relacionados à atividade de mono-oxigenase (GO:0004497), 3% à atividade de transportador (GO:0005215) e 3% a outros ligantes (GO:0005488).

De acordo com os processos biológicos, 20% possuem função desconhecida (GO:0008150), 18% participam de processos metabólicos (GO:0008152), 14% estão relacionados a processos metabólicos celulares (GO:0044237), 9% a processos metabólicos de compostos nitrogenados (GO:0006807), 7% a processos metabólicos primários (GO:0044238), 6% a processos celulares (GO:0009987), 6% a processos metabólicos de macromoléculas (GO:0043170), 5% a processos metabólicos de ácidos orgânicos (GO:006082), 5% a processos de transporte (GO:006810) e 5% a processos de estabelecimento de localização (GO:0051234) (Fig. 7).

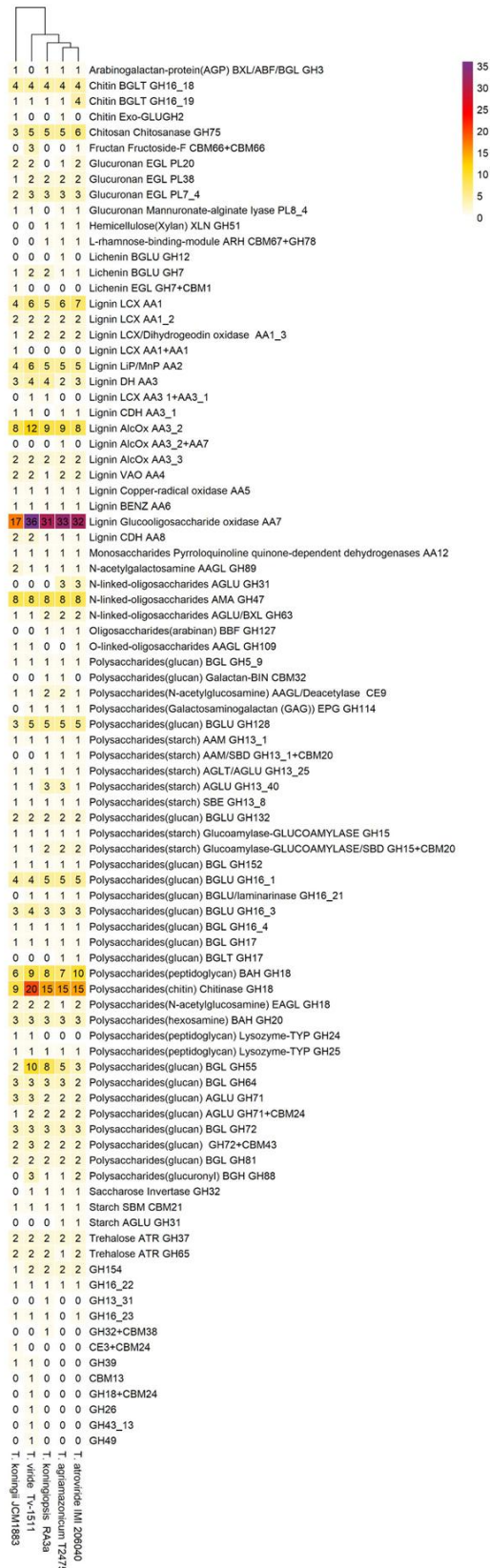


**Figura 7. a.** Diagrama de Venn de *Trichoderma agriamazonicum* INPA 2475 e espécies relacionadas; **b.** Número de clusters de proteínas; **c.** Número de elementos: específicos (1) e proteínas compartilhadas por 2, 3, 4 e 5 espécies no diagrama de Venn.

#### CAZymes de *Trichoderma agriamazonicum* INPA 2475

Com base no genoma de *T. agriamazonicum*, os CAZymes foram preditos, classificados e comparados com outras espécies relacionadas de *Trichoderma* (Fig. 8). No total, 198 CAZymes foram preditos em *T. agriamazonicum*, enquanto *T. viride* possui 223, *T. atroviride* 203, *T. koningiopsis* 181 e *T. koningii* 151. No dendrograma baseado na composição de CAZymes, *T. agriamazonicum* apresenta grande semelhança com *T. atroviride*. A licheninase CAZyme (lichenin

BGLU GH12) foi predita apenas em *T. agriamazonicum*. A licheninase é responsável pela hidrólise da lichenina presente em várias espécies de líquenes e cliva as ligações (1→4)-β-D-glucosídicas em β-D-glucanos contendo ligações (1→3)- e (1→4)-. A maioria das enzimas encontradas estava relacionada à degradação de lignina e quitina, com um número elevado de cópias de genes que codificam as enzimas lignina glucooligosacarídeo oxidase AA7 e quitinase GH18 (Fig. 8).



**Figura 8.** Composição de CAZymes nas espécies relacionadas a *Trichoderma ajramazonicum*.



## Potencial de clusters gênicos biossintéticos

*Trichoderma agriamazonicum* possui 33 clusters gênicos biossintéticos (BGC), dos quais 14 são para produção de poliquetídeos (PKS), 3 para sintetases de peptídeos não ribossômicos (NRPS), 8 para sintetases de peptídeos não ribossômicos semelhantes (NRPS-like), 6 para terpenos e 2 híbridos (PKS-NRPS). Apenas 2 BGCs apresentam 100% de similaridade com vias já caracterizadas, como a produção do sideróforo NRPS dimetilcoprogênio e do T1-PKS naphtopirona. Outros 4 BGCs apresentam < 40% de similaridade com BGCs para a produção de triptoquialanina, ácido fusárico, squalestatina S1 e neurosporina A. Em contraste, 27 BGCs não apresentam qualquer similaridade com BGCs já caracterizados no repositório MIBiG, mostrando assim o potencial biossintético inexplorado de *T. agriamazonicum*. Além disso, *T. agriamazonicum* apresenta um número maior de PKS quando comparado às outras cinco espécies de *Trichoderma* estreitamente relacionadas, cujas sequências genômicas estão disponíveis em bancos de dados públicos (Fig. S3).

## Discussão

Neste estudo, adicionamos um novo membro ao gênero *Trichoderma*, denominado aqui como *Trichoderma agriamazonicum*. Esta nova espécie foi isolada como um endófito de uma planta nativa da Amazônia, *Scleronema micranthum*, e, até onde sabemos, este é o primeiro estudo a relatar um fungo associado a essa espécie. A posição filogenética de *T. agriamazonicum* usando dados de sequência do gene *tefl- $\alpha$*  revela uma posição não ambígua e mostra proximidade com *T. ovalisporum*, enquanto os dados de *rpb2* mostram *T. texanum* como um clado irmão. O baixo número de SNPs no gene *rpb2* em comparação com o *tefl- $\alpha$*  (Figura 2) reduz o poder de resolução filogenética para esse clado, diminuindo, conseqüentemente, o suporte de PP e bootstrap, como observado na Figura 1. No entanto, as comparações morfológicas entre espécies relacionadas nas análises de *tefl- $\alpha$* , *rpb2* e concatenadas confirmam o status de *T. agriamazonicum* como uma nova espécie fúngica, que possui conídios e comprimento de fialides maiores e produção reduzida de conídios.

*T. agriamazonicum* apresenta inibição significativa do crescimento micelial em todos os fitopatógenos testados, e essa atividade pode ser relacionada à atividade micoparasitária, confirmada em *Colletotrichum siamense* pela constrição das estruturas hifais. A atividade micoparasitária do gênero *Trichoderma* é um traço ancestral e é um processo complexo que envolve enzimas, sinalização e produção de metabolitos (MUKHERJEE et al., 2022;

ATANASOVA et al., 2018; TAMANDEGANI et al., 2020). Os traços de micoparasitismo também foram associados à supressão de doenças de plantas (MUKHERJEE et al., 2022).

Além da atividade micoparasitária, *T. agriamazonicum* também inibiu o crescimento micelial de fitopatógenos por meio da produção de compostos voláteis (Figura 5AB, Tabela 1), nos quais compostos foram identificados com atividade antifúngica e fungistática previamente relatada (SALWAN et al., 2019). O 6-amilo- $\alpha$ -pirona, uma lactona com aroma característico de coco, foi caracterizado como um dos principais constituintes voláteis produzidos por várias espécies de *Trichoderma*, e possui propriedades antifúngicas (KALYANI et al., 2000). Da mesma forma, voláteis como 1-octen-3-ol e 3-octanona, exibem efeitos fungistáticos e fungicidas (NEMČOVIČ et al., 2008). A produção de VOCs por *Trichoderma* está associada a vários processos biológicos, como germinação de conídios, sinalização e defesa (SALWAN et al., 2019).

Na inibição do crescimento micelial por VOCs e micoparasitismo, *T. agriamazonicum* demonstrou potencial para controlar *Colletotrichum* spp. Selecionamos *C. scovillei*, isolado de podridão de fruta de *Capsicum chinense*, para ensaios de controle pós-colheita devido à grande inibição pelos VOCs de *T. agriamazonicum*, e os resultados mostram que esta nova espécie tem potencial para ser utilizada pós-colheita. Este trabalho relata pela primeira vez os VOCs para controle da podridão de antracnose em *Capsicum chinense* causada por *C. scovillei*.

O uso de compostos orgânicos voláteis produzidos por espécies de *Trichoderma* já foi relatado para *Carica papaya* no controle da podridão de frutos causada por *Colletotrichum gleosporioides* (VALENZUELA et al., 2015), para *Citrus sinensis* no controle do bolor verde causado por *Penicillium digitatum* (FERREIRA et al., 2020), para *Musa acuminata* no controle da podridão de coroa causada por *Colletotrichum musae* (SANGEETHA et al., 2009), no controle de podridão de frutos em *Cucumis melo* causada por *Fusarium incarnatum* (INTANA et al., 2021), para antracnose em *Capsicum frutescens* causada por *Colletotrichum gleosporioides* (RUANGWONG et al., 2021). Além disso, VOCs podem ser aplicados na promoção de crescimento de plantas (LEE et al., 2016; YOU et al., 2022).

Relatamos que *T. agriamazonicum* é um produtor de peptaibols e lipopeptaibols 7-mer não convencionais (S5-S10). O lipopeptaibol trikoningin KBII anotado em *T. agriamazonicum* tem atividade antibiótica contra *Staphylococcus aureus*, conforme relatado por Auvin-Guette (1993). Os lipopeptaibols com m/z 754,5 e m/z 1350,8 não foram encontrados na literatura e esses compostos são estruturalmente semelhantes nas porções C-terminal e N-terminal, mas diferem na quantidade de resíduos de aminoácidos, sugerindo o mecanismo de "module-skipping" pela sintase de peptídeos não ribossômicos (Figura S8-S10). Dois peptaibols 7-mer (m/z 684,3 e m/z

698,4) também não foram encontrados na literatura e parecem não ter a mesma origem biossintética que os lipopeptaibols (Figura S6-S7). A ocorrência de um peptaibol 7-mer é rara em *Trichoderma* e, até o momento, foram relatados apenas trichodecenina I (OANCEA et al., 2008) e trichopolinas I e II (FUJITA et al., 1981).

Outros metabolitos secundários anotados neste trabalho incluem hypocrenona C e 5-hidroxi-de-O-metil-lasiodiplodina. A hypocrenona C foi isolada de uma linhagem marinha do fungo *Hypocrea koningii* PF04 (DING et al., 2015), e 5-hidroxi-de-O-metil-lasiodiplodina foi obtida do fungo endofítico *Lasiodiplodia theobromae* IFO21059 (YANG et al., 2000) e de algumas espécies de *Trichoderma* (ZHANG et al., 2017). Em relação ao seu potencial biológico, 5-hidroxi-de-O-metil-lasiodiplodina apresentou atividade indutora de microtubérculos de batata (YANG et al., 2000), atividade antibiótica (YANG et al., 2006) e atividade citotóxica (BUAYAIRAKSA et al., 2011).

Os clusters de genes biossintéticos de *T. agriamazonicum* são direcionados principalmente para a produção de poliquetídeos; no entanto, a maioria desses clusters representa BGCs não caracterizados. O potencial biossintético de *Trichoderma* tem ganhado atenção recentemente, e análises com diferentes genomas de *Trichoderma* mostram baixos números de BGCs compartilhados entre espécies, indicando o vasto repertório biossintético do gênero (SHENOUDA et al., 2021). Entre as espécies de *Trichoderma* com genomas completos, *T. agriamazonicum* apresenta um número maior de proteínas ortólogas compartilhadas com *T. koningiopsis*, enquanto na composição de CAZymes, *T. agriamazonicum* está mais relacionado com *Trichoderma atroviride* IMI 206040, que são duas linhagens bem conhecidas de biocontrole.

Com o cenário atual de desmatamento na Amazônia e a crise gerada pelas mudanças climáticas, a utilização de práticas agrícolas sustentáveis precisa ser implementada com urgência. A exploração da biodiversidade amazônica para a descoberta de novas espécies de *Trichoderma* pode ajudar não apenas a aumentar a produtividade das principais commodities mundiais, mas também a reduzir o uso de pesticidas, ao mesmo tempo em que mantém a floresta Amazônica em pé.

## Conclusão

Neste artigo, descrevemos uma nova espécie fúngica, *Trichoderma agriamazonicum*, e demonstramos seu potencial biotecnológico no controle de fitopatógenos por meio da atividade de micoparasitismo e da produção de compostos orgânicos voláteis (VOCs). Os VOCs de *T.*

*agriamazonicum* são capazes de controlar a podridão de frutos por antracnose causada por *Colletotrichum scovillei* em *Capsicum chinense*, com três VOCs—6-amilo- $\alpha$ -pirona, 1-octeno-3-ol e 3-octanona—identificados como os principais constituintes responsáveis pelas atividades fungistática e fungicida. A anotação de peptaibóis revela que a nova espécie é uma produtora não convencional de peptaibóis 7-mer e lipopeptaibóis, compostos que ainda não foram descritos na literatura. A análise genômica indicou um vasto repertório de metabolitos devido à presença de clusters de genes biossintéticos (BGCs) não caracterizados. Por fim, a comparação de CAZymes revelou uma licheninase específica (GH12) única de *Trichoderma agriamazonicum*.

## Referências

ATANASOVA, L. et al. **The Gpr1-regulated Sur7 family protein Sfp2 is required for hyphal growth and cell wall stability in the mycoparasite *Trichoderma atroviride*.** *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 15, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30500-y>.

AUVIN-GUETTE, C. et al. **Structural elucidation of trikoningins KA and KB, peptaibols from *Trichoderma koningii*.** *Chemical Science*, n. 2, p. 249–255, 1993. <https://doi.org/10.1039/P19930000249>.

AYELE, T. M. et al. **Isolation, identification and in vitro test for the biocontrol potential of *Trichoderma viride* on *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*.** *Open Agriculture Journal*, v. 15, p. 10–20, 2021. <https://doi.org/10.2174/1874331502115010010>.

BRANDES, N. et al. **ASAP: a machine learning framework for local protein properties.** *Database*, v. 2016, baw133, 2016. <https://doi.org/10.1093/database/baw133>.

BUAYAIRAKSA, M. et al. **Cytotoxic lasiodiplodin derivatives from the fungus *Syncephalastrum racemosum*.** *Archives of Pharmacal Research*, v. 34, p. 2037–2041, 2011. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-1205-x>.

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. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00464-4>.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. **A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes.** *Mycologia*, v. 91, p. 553–556, 1999. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>.

CHAVERRI, P. et al. **Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 27, p. 302–313, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00400-1](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00400-1).

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. <https://doi.org/10.3852/14-147>.

CHU, J. et al. **Discovery of MRSA active antibiotics using primary sequence from the human microbiome.** *Nature Chemical Biology*, v. 12, p. 1004–1006, 2016. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2207>.

CHU, J. et al. **Bioactive synthetic-bioinformatic natural product cyclic peptides inspired by nonribosomal peptide synthetase gene clusters from the human microbiome.** *Journal of the American Chemical Society*, v. 141, p. 15737–15741, 2019. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b07317>.

CHU, J. et al. **Synthetic-bioinformatic natural product antibiotics with diverse modes of action.** *Journal of the American Chemical Society*, v. 142, p. 14158–14168, 2020. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c04376>.

DEPARTMENT OF ENERGY JOINT GENOME INSTITUTE. **Title of Page or Document.** *DOE Joint Genome Institute*. Disponível em: <https://genome.jgi.doe.gov/portal/>. Acesso em: 5 jan. 2023.

DING, L. et al. **New furan and cyclopentenone derivatives from the sponge-associated fungus *Hypocrea Koningii* PF04.** *Marine Drugs*, v. 13, p. 5579–5592, 2015. <https://doi.org/10.3390/md13095579>.

DOYLE, J. J. **Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.** *Phytochemical Bulletin*, v. 19, p. 11–15, 1987.

DRUZHININA, I. S. et al. **The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data.** *Mycoscience*, v. 47, p. 55–64, 2006. <https://doi.org/10.1007/s10267-006-0279-7>.

EBADZADSAHRAI, G. et al. **Inhibition of fungal growth and induction of a novel volatilome in response to *Chromobacterium vaccinii* volatile organic compounds.** *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 1035, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01035>.

FERREIRA, F. V. et al. **Effectiveness of *Trichoderma* strains isolated from the rhizosphere of citrus tree to control *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium digitatum* A21 resistant to pyrimethanil in post-harvest oranges (*Citrus sinensis* L. (Osbeck)).** *Journal of Applied Microbiology*, v. 129, p. 712–727, 2020. <https://doi.org/10.1111/jam.14657>.

FUJITA, T. et al. **New peptide antibiotics, trichopolyns I and II, from *Trichoderma polysporum*.** *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, n. 12, p. 585–587, 1981. <https://doi.org/10.1039/C39810000585>.

FUNGISMASH. **Secondary Metabolites.** Disponível em: <https://fungismash.secondarymetabolites.org>. Acesso em: 5 jan. 2023.

GAVRYUSHINA, I. A. et al. **Peptaibols as potential antifungal and anticancer antibiotics: current and foreseeable development (Review)**. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 57, p. 556–563, 2021. <https://doi.org/10.1134/S0003683821050070>.

GUPTA, V. K. et al. **The post-genomic era of *Trichoderma reesei*: what's next?** *Trends in Biotechnology*, v. 34, p. 970–982, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.06.003>.

INDEX FUNGORUM. **Index fungorum search.** Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/>. Acesso em: 5 jan. 2023.

INTANA, W. et al. ***Trichoderma asperellum* T76-14 released volatile organic compounds against postharvest fruit rot in muskmelons (*Cucumis melo*) Caused by *Fusarium incarnatum***. *Journal of Fungi*, v. 7, n. 1, p. 46, 2021. <https://doi.org/10.3390/jof7010046>.

JAKLITSCH, W. M. et al. ***Hypocrea rufa*/*Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia**. *Studies in Mycology*, v. 56, p. 135–177, 2006. <https://doi.org/10.3114/sim.2006.56.04>.

JOHN, R. P. et al. **Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean**. *Crop Protection*, v. 29, p. 1452–1459, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.08.004>.

KALYANI, A. et al. **Study on the production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone using two methods of fermentation**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, p. 610–612, 2000. <https://doi.org/10.1007/s002530051665>.

KULLNIG-GRADINGER, C. et al. **Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach**. *Mycological Research*, v. 106, p. 757–767, 2002. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006172>.

LEE, S. et al. **Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth**. *Fungal Biology and Biotechnology*, v. 3, n. 1, p. 14, 2016. <https://doi.org/10.1186/s40694-016-0025-7>.

LIU, Y. J. et al. **Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit**. *Molecular Biology and Evolution*, v. 16, p. 1799–1808, 1999. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026092>.

MARIK, T. et al. **Structural diversity and bioactivities of peptaibol compounds from the *Longibrachiatum* Clade of the filamentous fungal Genus *Trichoderma***. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 1434, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01434>.

MINH, B. Q. et al. **IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era**. *Molecular Biology and Evolution*, v. 37, p. 1530–1534, 2020.

MUKHERJEE, P. K. et al. **Mycoparasitism as a mechanism of Trichoderma-mediated suppression of plant diseases.** *Fungal Biology Reviews*, v. 39, p. 15–33, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.11.004>.

NEMČOVIČ, M. et al. **Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in Trichoderma spp.** *FEMS Microbiology Letters*, v. 284, p. 231–236, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01202.x>.

O'DONNELL, K. et al. **Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, p. 2044–2049, 1998. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044>.

OANCEA, S. et al. **Main-chain length control of conformation, membrane activity, and antibiotic properties of lipo-peptaibol sequential analogues.** *Chemistry & Biodiversity*, v. 5, p. 681–692, 2008. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200890065>.

OKONECHNIKOV, K. et al. **Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit.** *Bioinformatics*, v. 28, p. 1166–1167, 2012. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>.

POVEDA, J. **Trichoderma as biocontrol agent against pests: New uses for a mycoparasite.** *Biological Control*, v. 159, p. 104634, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104634>.

PRJIBELSKI, A. et al. **Using SPAdes de novo assembler.** *Current Protocols in Bioinformatics*, v. 70, p. 102, 2020. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>.

RUANGWONG, O. et al. **Biocontrol mechanisms of Trichoderma koningiopsis PSU3-2 against postharvest anthracnose of chili pepper.** *Journal of Fungi*, v. 7, n. 4, p. 276, 2021. <https://doi.org/10.3390/jof7040276>.

RUSH, T. A. et al. **Bioprospecting Trichoderma: A systematic roadmap to screen genomes and natural products for biocontrol applications.** *Frontiers in Fungal Biology*, v. 2, p. 716511, 2021. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2021.716511>.

SALWAN, R. et al. **Bioactive volatile metabolites of Trichoderma: An overview.** In: *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms*. Springer, 2019. p. 87–111. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3_5).

SAMUELS, G. J. et al. **The Trichoderma koningii aggregate species.** *Studies in Mycology*, v. 56, p. 67–133, 2006. <https://doi.org/10.3114/sim.2006.56.03>.

SANGEETHA, G. et al. **Biocontrol with Trichoderma species for the management of postharvest crown rot of banana.** *Phytopathologia Mediterranea*, v. 48, p. 214–225, 2009.

SHARMA, S. et al. **Trichoderma: Biodiversity, ecological significances, and industrial applications**. In: *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi*. Springer, 2019. p. 85–120. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_3).

SHENOUDA, M. L.; COX, R. J. **Molecular methods unravel the biosynthetic potential of Trichoderma species**. *RSC Advances*, v. 11, p. 3622–3635, 2021. <https://doi.org/10.1039/D0RA09627J>.

SOOD, M. et al. **Trichoderma: The “secrets” of a multitaled biocontrol Agent**. *Plants*, v. 9, n. 6, p. 762, 2020. <https://doi.org/10.3390/plants9060762>.

SUN, X. et al. **Genome mining in Trichoderma viride J1-030: discovery and identification of novel sesquiterpene synthase and its products**. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, v. 15, p. 2052–2058, 2019. <https://doi.org/10.3762/bjoc.15.202>.

TAMANDEGANI, P. R. et al. **Changes in peptaibol production of Trichoderma Species during in vitro antagonistic interactions with fungal plant pathogens**. *Biomolecules*, v. 10, n. 5, p. 730, 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10050730>.

TRICHOKEY. **Trichoderma Taxonomy 2020**. Disponível em: <https://trichokey.com/index.php/trichoderma-taxonomy-2020>. Acesso em: 5 jan. 2023.

VALENZUELA, N. L. et al. **Biological control of anthracnose by postharvest application of Trichoderma spp. on maradol papaya fruit**. *Biological Control*, v. 91, p. 88–93, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.08.002>.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. **A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography**. *Journal of Chromatography A*, v. 11, p. 463–471, 1963.

WOO, S. L. et al. **Trichoderma: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture**. *Nature Reviews Microbiology*, v. 20, p. 1–15, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00819-5>.

YANG, Q. et al. **Potato micro-tuber inducing hydroxylasiodiplodins from Lasiodiplodia theobromae**. *Phytochemistry*, v. 54, p. 489–494, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00156-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00156-4).

YANG, R. et al. **Lactones from a brown alga endophytic fungus (No. ZZ36) from the South China Sea and their antimicrobial activities**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 16, p. 4205–4208, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.05.081>.

YOU, J. et al. **Biological control and plant growth promotion by volatile organic compounds of Trichoderma koningiopsis T-51**. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 2, p. 131, 2022. <https://doi.org/10.3390/jof8020131>.



ZHANG, L. et al. **Induction of diverse bioactive secondary metabolites from the mangrove endophytic fungus *Trichoderma* sp. (Strain 307) by co-cultivation with *Acinetobacter johnsonii* (Strain B2).** *Marine Drugs*, v. 15, n. 2, p. 35, 201

## CAPÍTULO II

### **Isolamento e caracterização de *Trichoderma* a partir de sedimentos de rios amazônicos com descrição de cinco novas espécies e novos registros para o Brasil**

Thiago F. Sousa; Raoni Gwinner, Ingrid J. S. da Silva; Gleucinei S. Castro; Gerodes Vasconcelos, Marta Cristina Corsi de Filippi, Cândido Athayde Sobrinho, Michel E. B. Yamagishi; Rogério Eiji Hanada, Aleksander W. Muniz, Hector H. F. Koolen, Gilvan F. da Silva.

#### **Resumo**

*Trichoderma* é um gênero cosmopolita amplamente utilizado na agricultura devido às suas características benéficas que promovem o crescimento das plantas e oferecem proteção ecológica e sustentável para as culturas. Mais de 400 espécies válidas de *Trichoderma* foram descritas, com um número crescente de sequências de genoma completo disponíveis, revelando um vasto repertório de enzimas e metabólitos com potencial biotecnológico. Neste estudo, 43 linhagens de *Trichoderma* provenientes de sedimentos de rios amazônicos foram caracterizadas. A análise filogenética baseada nas sequências de *tefl-a* identificou 15 espécies, com *T. lentiforme* encontrado em todos os locais amostrados. As análises morfológicas e filogenéticas sustentaram a descrição de cinco novas espécies: *T. madeiraense*, *T. labreaense*, *T. tapauaense*, *T. submersum* e *T. juburiaense*, enquanto *T. cyanodichotomus* e *T. awajun* foram registradas pela primeira vez no Brasil. Ensaios de cultura dupla demonstraram uma atividade eficaz de biocontrole, com *T. juburiaense* TM67 mostrando o maior antagonismo contra múltiplos patógenos. Ensaios in vivo confirmaram a redução de patógenos em sementes de feijão-caupi. A mineração de genoma identificou clusters de genes biossintéticos (BGCs) associados à produção de metabólitos secundários, incluindo verticilinas, ilicicolina, chaetoglobosinas, harzianopiridona e brefeldina A, que exibem atividades antifúngicas, antibacterianas e citotóxicas. Este estudo revela novas espécies de *Trichoderma* com notável potencial de biocontrole e produção de metabólitos bioativos, oferecendo candidatos promissores para a agricultura sustentável e biotecnologia.

**Palavras-chave:** Novas espécies de *Trichoderma*, Biodiversidade amazônica, Mineração genômica

## Abstract

*Trichoderma* is a cosmopolitan genus widely used in agriculture due to its beneficial traits that promote plant growth and provide sustainable, eco-friendly crop protection. Over 400 valid *Trichoderma* species have been described, with an increasing number of whole-genome sequences available, revealing a vast repertoire of enzymes and metabolites with biotechnological potential. In this study, 43 *Trichoderma* strains from Amazonian river sediments were characterized. Phylogenetic analysis based on *tefl-α* sequences identified 15 species, with *T. lentiforme* found in all sampled sites. Morphological and phylogenetic analyses supported the description of five novel species: *T. madeiraense*, *T. labreaense*, *T. tapauaense*, *T. submersum*, and *T. juburiaense*, while *T. cyanodichotomus* and *T. awajun* were first recorded in Brazil. Dual-culture assays demonstrated effective biocontrol activity, with *T. juburiaense* TM67 showing the strongest antagonism against multiple pathogens. *In vivo* assays confirmed pathogen reduction in cowpea seeds. Genome mining identified biosynthetic gene clusters (BGCs) associated with secondary metabolite production, including verticillins, illicicolins, chaetoglobosins, harzianopyridone, and brefeldin A, which exhibit antifungal, antibacterial, and cytotoxic activities. This study unveils novel *Trichoderma* species with remarkable biocontrol potential and bioactive metabolite production, offering promising candidates for sustainable agriculture and biotechnology.

**Keywords:** New species of *Trichoderma*, Amazonian biodiversity, Genome mining.

## Introdução

O gênero *Trichoderma* possui uma distribuição cosmopolita, habitando diferentes ambientes, sendo predominantemente encontrado em tecidos vegetais, madeira em decomposição, sedimentos e diferentes tipos de solo (SILVA et al., 2023). Este gênero exibe características fisiológicas interessantes para a biotecnologia e é amplamente utilizado na indústria e na agricultura devido ao seu repertório diversificado de enzimas combinado com alta produção, biossíntese de metabolitos secundários bioativos, caixa de ferramentas genética e atividade micoparasítica (BISCHOF et al., 2014; BACCELLI et al., 2022; WOO et al., 2022).

Muitas espécies de *Trichoderma* foram descritas nos últimos anos, impulsionadas por dados moleculares e análises evolutivas, o que possibilitou a descrição de 400 espécies válidas (WOO et al., 2022). Recentemente, uma diretriz para identificação de *Trichoderma* (ref) propôs que os códigos de barras de DNA ITS, *tefl-α* e *rpb2* podem ser usados para identificação inequívoca e delimitação de espécies, onde foi estabelecido que >70% de similaridade nos dados de sequência ITS confirma o gênero, enquanto identidade nucleotídica <99% em *rpb2* e <97% em *tefl-α* em relação aos isolados tipo sustentam o status de nova espécie quando combinados com análise filogenética e morfológica (CAI e DRUZHININA, 2021). Após a padronização, mais de 54 novas espécies de *Trichoderma* foram descritas (BARRERA et al., 2021; BUSTAMANTE et al., 2021; NUANGMEK et al., 2021; PRAMEELADEVI et al., 2021; RODRÍGUEZ et al., 2021; ZENG et al., 2022; ZHENG et al., 2021; AN et al., 2022; CAO et al., 2022ab; YU et al., 2022; ZHANG et al., 2022; BRITO et al., 2023; SOUSA et al., 2023).

Apesar de *Trichoderma* apresentar muitas espécies e linhagens bem caracterizadas, a busca por esses microrganismos continua a crescer. Novas linhagens potenciais de biocontrole que são capazes de controlar fitopatógenos e melhorar a produção de culturas com impactos econômicos estão dentro do escopo dos estudos de *Trichoderma* (GHAZANFAR et al., 2018; ABDULLAH et al., 2021). O Brasil é o segundo maior produtor de produtos agrícolas e possui uma mega biodiversidade e múltiplos ecossistemas que têm sido pouco explorados do ponto de vista da diversidade microbiana (PYLRO et al., 2014; FAO & OECD, 2015; OLIVEIRA et al., 2019). Estudos com *Trichoderma* na Amazônia resultaram na descoberta de linhagens solubilizadoras de fósforo e promotoras do crescimento vegetal, bem como novas espécies (HOLMES et al., 2004; SAMUELS et al., 2006; LÓPEZ-QUINTERO et al., 2013; BONONI et al., 2020).

Os diferentes ecossistemas da floresta amazônica estão extremamente conectados em uma rede complexa de interações, na qual a grande quantidade de biomassa vegetal é mantida por uma intensa atividade de microrganismos saprófitas, atividade esta potencializada pelo clima quente e

úmido da região. Esses microrganismos reciclam o carbono decompondo as incontáveis camadas de material orgânico no solo, retornando à floresta os nutrientes necessários para sua manutenção (MALHI et al., 2012). O produto da decomposição é lixiviado com o intenso volume de chuvas, depositado nos rios e espalhado pelo bioma com a ajuda dos pulsos de inundação, acumulando-se nos sedimentos (JUNK et al., 2013; JUNK et al., 2015; DE SOUSA-LOBO et al., 2019; MELACK et al., 2021).

Neste estudo, exploramos os sistemas fluviais amazônicos, coletando amostras de sedimentos para isolar e caracterizar linhagens de *Trichoderma*. Um total de 43 isolados foi identificado e analisado por meio de avaliação morfológica, análise filogenética, perfil de CAZyme e avaliação do potencial biossintético. Além disso, sua atividade antagonista contra várias espécies fitopatogênicas foi avaliada usando ensaios de cultivo duplo. Para investigar ainda mais seu potencial de biocontrole, isolados selecionados foram testados in vivo em sementes de feijão-caupi naturalmente infectadas.

## **Material e métodos**

### *Isolamento e Condições de Cultivo*

Os isolados de *Trichoderma* foram obtidos a partir de sedimentos de diferentes rios amazônicos localizados no estado do Amazonas (Brasil). A posição geográfica exata das linhagens, a profundidade do sedimento e o pH da água estão mostrados na Tabela 1. As amostras de sedimento foram recuperadas do fundo dos rios amazônicos com o auxílio de um aparato Van Veen e armazenadas em tubos Falcon (50 mL) a 4°C. As amostras foram secas sob pressão reduzida para obter pellets de sedimento, dos quais uma parte (1,0 g) foi diluída para uma concentração de  $10^3$ . Um volume de 100  $\mu$ L dessa solução foi inoculado em meio de ágar rosa bengala (1,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5,0 g peptonas, 10 g dextrose, 0,35 g rosa bengala) e incubado a 28°C por quatro dias. As colônias com características morfológicas de *Trichoderma* foram selecionadas, purificadas por cultivo monosporico e preservadas em meio de batata dextrose (PD, 200 g de batata, 20 g de dextrose) e glicerol (1:1, v/v).

**Tabela 1.** Características dos isolados de *Trichoderma* a partir de sedimentos de rios amazônicos, incluindo dados geográficos, ambientais e de profundidade.

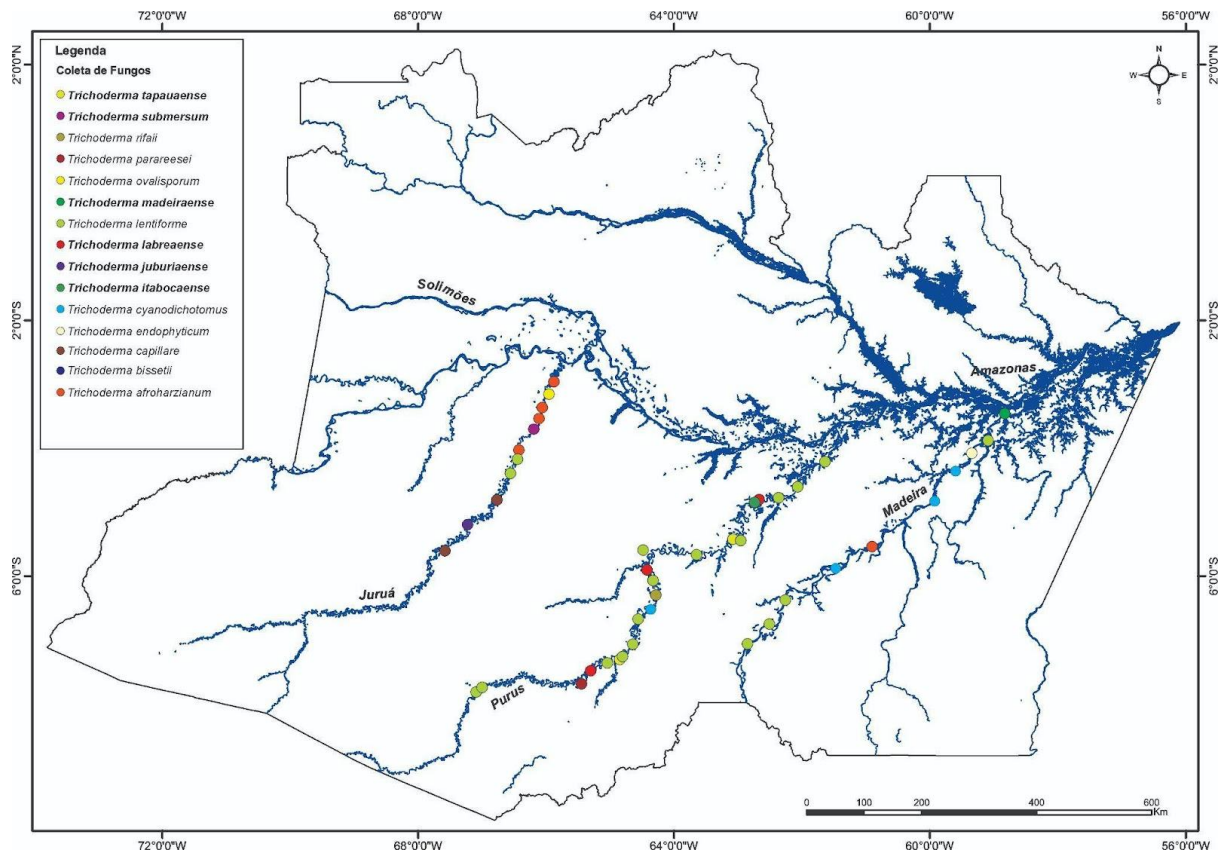
Isolado	Espécie	Localização geográfica	Rio	Município	Profundidade (M)	Temperatura da água (°C)	pH da água
TM2	<i>Trichoderma lentiforme</i>	07°03'12.7 S 62°51'00.9 W	Madeira	Humaitá	4.0	29.0	6.0
TM3	<i>Trichoderma lentiforme</i>	06°44'40.9 S 062°30'35. W	Madeira	Humaitá	3.5	26.0	6.0
TM4	<i>Trichoderma lentiforme</i>	06°21'51.4 S 062°15'31.5 W	Madeira	Humaitá	1.0	31.5	6.0
TM5	<i>Trichoderma cyanodichotomus</i>	06°12'13.0 S 061°50'10.6 W	Madeira	Humaitá	1.5	29.5	6.0
TM6	<i>Trichoderma cyanodichotomus</i>	05°49'22.4 S 061°18'10.5 W	Madeira	Manicoré	0.5	27.0	6.0
TM7	<i>Trichoderma afroharzianum</i>	05°31'56. S 060°54'12.0 W	Madeira	Manicoré	0.4	26.0	6.0
TM8	<i>Trichoderma cyanodichotomus</i>	05°14'40.0 S 060°32'51.5 W	Madeira	Novo Aripuanã	1.0	24.0	6.0
TM11	<i>Trichoderma cyanodichotomus</i>	04°23'11.8 S 059°35'43.1 W	Madeira	Borba	0.70	30.0	6.0
TM12	<i>Trichoderma endophyticum</i>	04°04'11.1 S 059°20'52.0 W	Madeira	Borba	3.0	31.0	6.0
TM13	<i>Trichoderma lentiforme</i>	03°52'24.0 S 059°05'25.4 W	Madeira	Nova Olinda do Norte	1.0	32.5	6.0
<b>TM14*</b>	<b><i>Trichoderma madeiraense</i></b>	<b>03°27'09.9 S 058°49'59.0 W</b>	<b>Madeira</b>	<b>Itacoatiara</b>	<b>1.0</b>	<b>30.5</b>	<b>6.0</b>
TM18	<i>Trichoderma lentiforme</i>	07°48'07.9 S 067°05'39.8 W	Purus	Pauini	1.0	29.0	6.0

TM19	<i>Trichoderma lentiforme</i>	07°44'02.7 S 067°00'07.1 W	Purus	Pauini	0.40	29.0	6.0
TM25	<i>Trichoderma parareesei</i>	07°38'48.3 S 065°28'03.4 W	Purus	Lábrea	1.5	25.0	6.0
<b>TM26*</b>	<b><i>Trichoderma labreaense</i></b>	<b>07°28'22.9 S 065°18'10.1 W</b>	<b>Purus</b>	<b>Lábrea</b>	<b>0.30</b>	<b>25.0</b>	<b>6.0</b>
TM27	<i>Trichoderma lentiforme</i>	07°21'02.2 S 065°02'25.8 W	Purus	Lábrea	1.0	24.0	6.0
TM28	<i>Trichoderma tapauaense</i>	07°17'35.8 S 064°51'02.7 W	Purus	Lábrea	2.0	24.0	6.0
TM29	<i>Trichoderma lentiforme</i>	07°15'09.0 S 064°48'27.1 W	Purus	Lábrea	7.0	25.0	6.0
TM30	<i>Trichoderma lentiforme</i>	07°03'28.8 S 064°38'48.1 W	Purus	Lábrea	5.0	26.0	5.5
TM32	<i>Trichoderma lentiforme</i>	06°39'53.5 S 064°33'36.8 W	Purus	Canutama	6.5	32.0	5.5
TM34	<i>Trichoderma rifaii</i>	06°17'22.0 S 064°17'12.6 W	Purus	Canutama	8.5	25.0	5.5
TM35	<i>Trichoderma lentiforme</i>	06°03'45.3 S 064°19'55.0 W	Purus	Tapauá	4.5	24.0	5.5
TM36	<i>Trichoderma labreaense</i>	05°53'45.6 S 064°25'29.7 W	Purus	Tapauá	4.0	24.0	5.5
TM39	<i>Trichoderma lentiforme</i>	05°35'05.3 S 063°50'50.1 W	Purus	Tapauá	5.5	29.0	5.5
TM40	<i>Trichoderma lentiforme</i>	05°39'32.2 S 063°38'53.9 W	Purus	Tapauá	4.5	27.0	5.5
<b>TM42*</b>	<b><i>Trichoderma tapauaense</i></b>	<b>05°24'56.2 S 063°04'55.1 W</b>	<b>Purus</b>	<b>Tapauá</b>	<b>4.0</b>	<b>29.0</b>	<b>5.5</b>
TM43	<i>Trichoderma lentiforme</i>	05°26'14.9 S 062°57'24.4 W	Purus	Tapauá	5.0	28.0	5.5
<b>TM46</b>	<b><i>Trichoderma labreaense</i></b>	<b>04°47'42.8 S 062°40'18.0 W</b>	<b>Purus</b>	<b>Beruri</b>	<b>6.0</b>	<b>26.0</b>	<b>5.5</b>
TM47	<i>Trichoderma lentiforme</i>	04°46'01.7 S 062°21'53.2 W	Purus	Beruri	5.0	31.0	5.5
TM48	<i>Trichoderma lentiforme</i>	04°35'41.1 S 062°04'00.8 W	Purus	Beruri	7.5	29.0	5.5

TM49	<i>Trichoderma cyanodichotomus</i>	04°24'29.6 S 061°56'16.5 W	Purus	Beruri	10.0	26.0	5.5
TM50	<i>Trichoderma lentiforme</i>	04°12'16.8 S 061°38'30.2 W	Purus	Beruri	6.0	27.0	5.5
TM54	<i>Trichoderma afroharzianum</i>	02°57'14.2 S 065°52'36.9 W	Juruá	Juruá	5.5	27.0	5.5
TM55	<i>Trichoderma ovalisporum</i>	03°08'50.1 S 065°57'29.5 W	Juruá	Juruá	2.0	27.0	5.5
TM56	<i>Trichoderma afroharzianum</i>	03°21'18.6 S 066°03'43.6 W	Juruá	Juruá	6.0	28.0	5.5
TM57	<i>Trichoderma afroharzianum</i>	03°31'38.1 S 066°06'40.8 W	Juruá	Juruá	4.0	28.0	5.5
<b>TM58*</b>	<b><i>Trichoderma submersum</i></b>	<b>03°41'36.4 S 066°11'33.9 W</b>	<b>Juruá</b>	<b>Juruá</b>	<b>3.5</b>	<b>27.0</b>	<b>5.5</b>
TM60	<i>Trichoderma afroharzianum</i>	04°01'10.0 S 066°25'31.9 W	Juruá	Juruá	5.0	26.0	5.5
TM61	<i>Trichoderma lentiforme</i>	04°10'02.1 S 066°26'56.7 W	Juruá	Juruá	6.5	26.0	5.5
TM62	<i>Trichoderma lentiforme</i>	04°23'10.1 S 066°33'27.3 W	Juruá	Carauari	2.0	24.0	5.5
TM64	<i>Trichoderma capillare</i>	04°48'05.9 S 066°46'00.3 W	Juruá	Carauari	4.5	26.0	5.5
<b>TM67*</b>	<b><i>Trichoderma juburiaeense</i></b>	<b>05°11'20.4 S 067°13'41.8 W</b>	<b>Juruá</b>	<b>Carauari</b>	<b>2.0</b>	<b>24.0</b>	<b>5.5</b>
TM70	<i>Trichoderma bissetii</i>	05°36'00.3 S 067°34'57.5 W	Juruá	Carauari	5.0	27.0	5.5
TM71	<i>Trichoderma capillare</i>	05°36'00.8 S 067°34'58.7 W	Juruá	Carauari	3.0	27.0	5.5

---





**Figura 1.** Mapa dos rios do estado do Amazonas - Brasil e distribuição das linhagens de *Trichoderma* obtidas neste estudo ao longo dos rios.

### *Extração de DNA, PCR e Sequenciamento*

As linhagens foram cultivadas em meio de ágar batata dextrose (PDA, 200 g de batata, 20 g de dextrose, 15 g de ágar) por cinco dias a 28 °C para indução maciça de conidiogênese. Uma solução de esporos foi preparada na concentração de  $10^8$  e 100  $\mu$ L dessa solução foi inoculada no meio de PD e incubada a 28°C com agitação orbital (150 rpm) por dois dias. O caldo foi filtrado e a massa micelial obtida foi seca com toalha de papel estéril. O micélio foi então lisado com nitrogênio líquido e a extração de DNA foi realizada utilizando o método de 2% de CTAB (Doyle & Doyle, 1981). A razão de pureza do DNA (260/280 nm) foi determinada pelo Nanodrop (ThermoFisher) e a integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel (agarose 0,8%). O DNA foi diluído a 50 ng/ $\mu$ L para as reações de PCR.

As reações de PCR foram preparadas para três pares de primers nas regiões ITS, 5.8S e ITS2 (primers: ITS1 e ITS4), a sequência parcial do gene *tef1- $\alpha$*  (primers: EF-1 $\alpha$ F e EF-1 $\alpha$ R) e a

sequência parcial do gene *rpb2* (primers: fRPB2-5F e fRPB2-7cR) usando o kit EasyTaq® (Sinapse Biotecnologia) conforme as recomendações do fabricante. As condições de PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, anelamento a temperaturas específicas de cada primer (Tabela 2) por 30 s, extensão a 72 °C por 1 min e extensão final a 72 °C por 5 min.

Para confirmar que as sequências alvo foram amplificadas e para garantir a ausência de amplificação inespecífica, os produtos de PCR foram resolvidos em gel de agarose (Sigma: 100 mg/L) corados com brometo de etídio (0,05 µL/mL) e fotografados sob luz UV utilizando equipamento Molecular Imaging System (Loccus Biotecnologic L-Pix. Chemi), comparando-os com uma régua de 1 kb (Invitrogen). A purificação do PCR foi realizada utilizando exoSAP-IT (ThermoFisher; número do catálogo: 78200.200.UL), conforme as recomendações do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas em volume de 10 µL, contendo 2 µL de água ultrapura, 1,5 µL de tampão BigDye, 0,5 µL de terminador BigDye v3.1 (Thermo Fisher), 1 µL de cada primer e 5 µL dos produtos de PCR purificados. As condições de ciclagem foram 96 °C por 1 min, seguidas de 35 ciclos a 96 °C por 15 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 min. O sequenciamento foi realizado utilizando um analisador genético (3500, Thermo Fisher).

**Tabela 2.** Especificações dos primers e temperaturas de anelamento utilizadas para amplificar fragmentos.

Primer	Sequence	Annealing temperature °C	Reference
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	55	White et al. 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATG		
fRPB2-5F	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	58	Liu et al. 1999
fRPB2-7cR	CCCATRGCTbTGTYYY		

EF-1 $\alpha$ F ATGGGTAAGGARGACAAGAC 57

O'Donnell et al. 1998;  
Carbone and Kohn 1999

EF-1 $\alpha$ R GGARGTACCAGTSATCATGTT

---

### *Análise Filogenética*

As sequências consensuais das regiões parciais de ITS, *tef1- $\alpha$*  e *rpb2* foram obtidas manualmente com base no alinhamento das sequências diretas e reversas, bem como na análise dos eletrogramas. As sequências de *tef1- $\alpha$*  de 45 isolados obtidos neste estudo foram alinhadas com 332 sequências de espécies tipo de *Trichoderma* para identificação preliminar por análise filogenética. Os isolados que apresentaram indicações de novas espécies foram submetidos a uma nova análise utilizando as sequências concatenadas de *tef1- $\alpha$*  e *rpb2*, juntamente com um conjunto de dados contendo espécies relacionadas.

As sequências de cada locus foram alinhadas individualmente utilizando o algoritmo MAFFT pelo software UGENE (Okonechnikov et al. 2012). Os alinhamentos de *tef1- $\alpha$*  e concatenados (*tef1- $\alpha$*  + *rpb2*) foram visualizados na plataforma IQTREE (Trifinopoulos et al. 2016) para a análise de Máxima Verossimilhança (ML), utilizando 1000 réplicas (bootstrap). A análise de Inferência Bayesiana (BI) foi baseada no modelo adotado no PAUP\* 4 e MrModeltest2 v2 (Nylander 2004). Todos os sítios nos loci foram considerados, e a análise foi realizada por dez milhões de gerações, com os 25% primeiros das árvores descartados e queimados utilizando a ferramenta MrBayes v 3.7 disponível no CIPRES (<https://www.phylo.org/>).

O suporte das branches e a topologia das árvores foram visualizados na plataforma iTOL. A árvore consensual das análises ML e BI foi gerada manualmente a partir da topologia gerada pela análise ML, com os valores de bootstrap, mais os valores de probabilidade posterior utilizando o pacote de edição CorelDraw 2020.

### *Caracterização Morfológica*

A caracterização macromorfológica foi realizada em PDA, CMD (2 g de infusão de milho, 20 g de dextrose, 15 g de ágar) e SNA (1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g de KNO<sub>3</sub>, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>, 0,5 g de KCl, 0,2 g de glicose, 0,2 g de sacarose, 15 g de ágar). As linhagens foram incubadas por sete dias

a 28 °C. As microestruturas, como conidióforos, conídios e clamidósporos, foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JSM-IT500HR) no Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos da Universidade Estadual do Amazonas (CMABio). Para isso, a microcultura foi preparada em PDA a 28 °C por 7 dias, fixada com Karnovsky e, em seguida, desidratada em concentrações crescentes de álcool (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%) por 15 min cada. A etapa com álcool absoluto foi repetida duas vezes. A secagem foi realizada em um secador de ponto crítico (Leica EM CPD300) e submetida a revestimento metálico (DII-29010SCTR Smart Coater). A medição do comprimento e largura de 30 conídios, fialídes e clamidósporos foi realizada utilizando um microscópio óptico com uma câmera Carl ZEISS Axio Imager v2.

### *Ensaio de Cultura Dupla*

Discos de micélio (5 mm) dos isolados de *Trichoderma* e dos fitopatógenos foram inoculados em placas de Petri (90 mm) contendo meio de cultura PDA em direções opostas, a 50 mm da borda. Placas contendo apenas os fitopatógenos foram usadas como controle positivo. Os inóculos foram incubados a 28 °C e avaliados após 21 dias. Cada ensaio foi realizado em triplicata. O percentual de inibição do crescimento dos fitopatógenos foi calculado pela fórmula: Inibição % =  $(GC - GT)/(GC) \times 100$ , onde GC representa o diâmetro médio do controle e GT representa o diâmetro médio do tratamento. Os resultados da inibição foram utilizados para a representação gráfica em barras utilizando o pacote ggplot2 no software R. As informações detalhadas sobre os fitopatógenos estão representadas na Tabela S1.

### *Controle de fitopatógenos em sementes de feijão-caupi*

Os isolados de *Trichoderma* foram cultivados em meio Ágar Dextrose de Batata (PDA) por um período de sete dias sob condições controladas. Após esse período, a suspensão de conídios foi preparada a partir das culturas puras do fungo, ajustando a concentração final para  $1 \times 10^7$  conídios mL<sup>-1</sup> de água destilada estéril, sendo a contagem realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Foram utilizadas sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), naturalmente infectadas por fitopatógenos, que foram identificados por análise morfológica. As sementes foram imersas na suspensão de conídios de *Trichoderma* por um período de três minutos, sob agitação com um misturador. Em seguida, o excesso de líquido foi removido com o auxílio de papel filtro

estéril. Para o controle, as sementes foram tratadas apenas com água destilada estéril, seguindo o mesmo procedimento de imersão e remoção do excesso de líquido. As sementes tratadas foram colocadas em placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água destilada estéril.

Cada tratamento consistiu de 100 sementes, distribuídas em 20 placas de Petri, com cinco sementes por placa. O experimento foi mantido em uma câmara de incubação sob fotofase de 12 horas (luz/escuridão) e temperatura controlada de  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por um período de sete dias, de acordo com a metodologia proposta para Teste de Sanidade de Sementes (Brasil, 2009). As avaliações foram realizadas no sétimo dia após a instalação do experimento, considerando o número de incidência de patógenos nas sementes tratadas e não tratadas (controle). A análise foi feita individualmente em cada semente, com o auxílio de microscópio estereoscópico e óptico, para identificar as estruturas fúngicas associadas às sementes. O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 11 tratamentos (isolados), um controle e quatro repetições.

#### *Sequenciamento e montagem do genoma*

O sequenciamento do genoma foi realizado por um serviço terceirizado utilizando a plataforma Illumina NovaSeq 6000, gerando leituras paired-end (150 pb PE) de 150 pares de bases. A qualidade das leituras foi avaliada usando o FastQC v0.11.9 para analisar a distribuição da qualidade dos nucleotídeos, presença de adaptadores e possíveis contaminantes. Leituras de baixa qualidade e sequências de adaptadores foram removidas utilizando o Trimmomatic v0.39, aplicando uma pontuação mínima de qualidade Phred de  $\geq 30$  e um comprimento mínimo de leitura de 50 pb. A montagem do genoma foi realizada utilizando o SPAdes v3.15.3, com parâmetros padrão para dados paired-end. A qualidade da montagem foi avaliada usando o QUAST v5.2.0, considerando estatísticas como o número de contigs, N50 e tamanho total do genoma. A possível contaminação foi avaliada usando o CheckM v1.2.2.

#### *Análise de CAZyme*

O genoma completo foi submetido à predição de proteínas usando o Augustus na plataforma Galaxy (<https://usegalaxy.org.au/>), com *Fusarium graminearum* sendo utilizado como conjunto de treinamento. Posteriormente, as proteínas preditas foram analisadas usando o servidor web dbCAN3 para anotação automatizada de enzimas ativas em carboidratos (<https://ccb.unl.edu/dbCAN2/>). A contagem e classificação das famílias de CAZyme envolvidas

na degradação de biomassa foram realizadas utilizando um script em Python, e um mapa de calor foi gerado com o pacote pheatmap no R. As proteínas classificadas na família GH18 foram analisadas mais detalhadamente para classificação de domínios usando a ferramenta Batch Web CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>). Aqueles classificados nas superfamílias GH18 quitinase-like e ChiA foram selecionados para análise filogenética. Para isso, as sequências de proteínas foram alinhadas utilizando o algoritmo MAFFT, e uma árvore filogenética foi construída utilizando o método UPGMA no MEGA. A árvore final foi editada utilizando a plataforma iTOL e o CorelDRAW.

### *Mineração de Genomas*

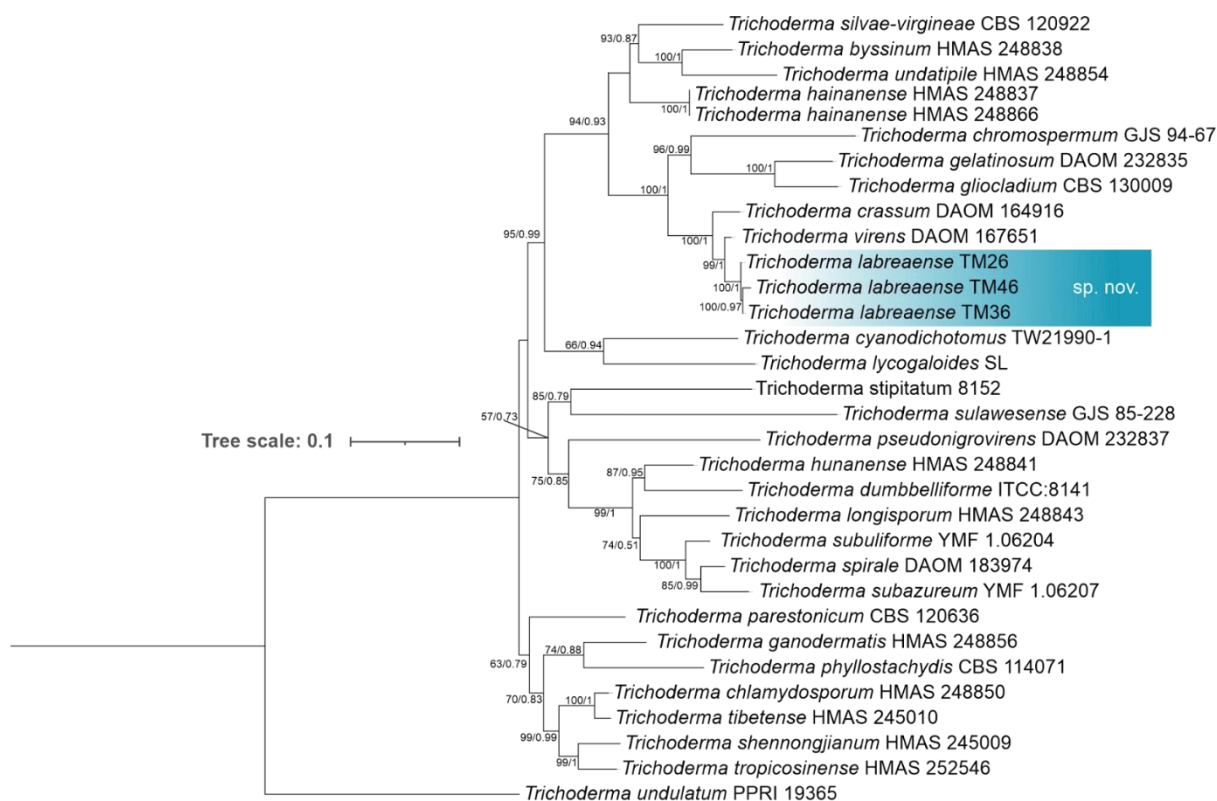
A mineração de genomas para clusters de genes biossintéticos (BGCs) foi realizada utilizando o fungiSMASH (<https://fungismash.secondarymetabolites.org/>) com parâmetros padrão para prever e anotar vias biossintéticas de metabolitos secundários. Os BGCs identificados foram classificados com base na homologia com clusters conhecidos e anotações funcionais. Para a análise de sintenia, as relações entre os clusters biossintéticos foram examinadas utilizando o clinker & clustermap.js (Gilchrist e Chooi, 2021), ferramentas que realizam o alinhamento e visualização das disposições gênicas dentro dos clusters. Essas ferramentas também foram usadas para gerar visualizações comparativas das arquiteturas de BGCs em diferentes genomas, facilitando a identificação de regiões conservadas e variações estruturais. Além disso, essa análise ajudou a confirmar o potencial biossintético dos clusters para a produção de compostos específicos. As figuras geradas foram editadas manualmente utilizando o CorelDraw (2020).

## **Resultados**

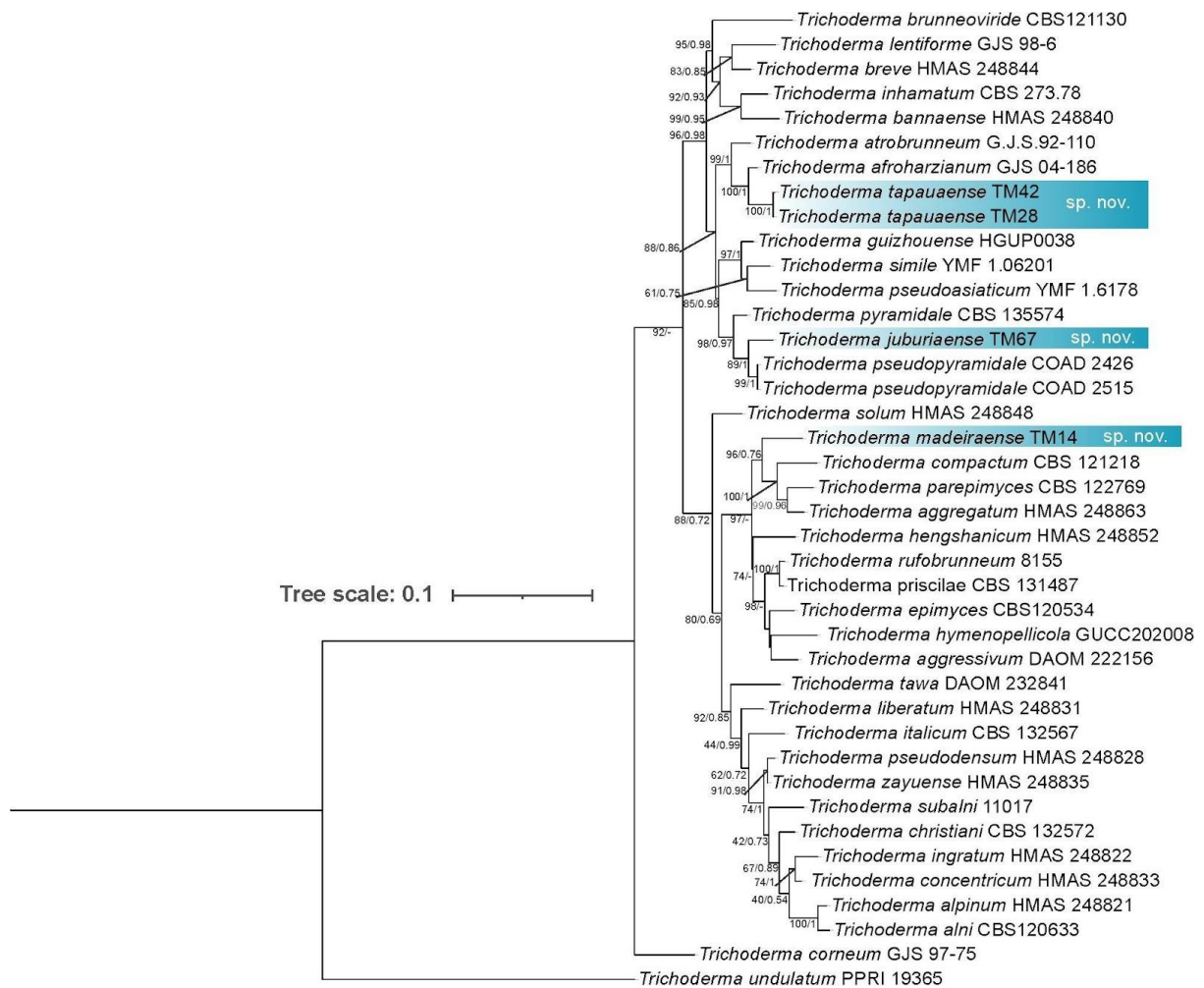
A análise filogenética de 43 isolados utilizando sequências de *tef1- $\alpha$*  revelou que 36 foram atribuídos a oito espécies conhecidas de *Trichoderma*: *T. lentiforme* (19), *T. afroharzianum* (5), *T. rifaii* (1), *T. endophyticum* (1), *T. cyanodichotomus* (5), *T. parareesei* (1), *T. ovalisporum* (1) e *T. harzianum* (2). Além disso, nove isolados se agruparam em cinco clades distintos, indicando a ocorrência de cinco novas espécies com alto suporte de bootstrap e concordância com a delimitação de espécies sp $\exists$ ! (rpb2 99  $\cong$  *tef1- $\alpha$*  97) (Figura SI 1).

A análise concatenada utilizando os loci *tef1- $\alpha$*  e *rpb2* apoia a proposição das novas espécies. Os isolados TM26, TM36 e TM46 estão estreitamente relacionados com *T. virens*, sendo o isolado TM26 selecionado como espécie tipo e apresentando 97% de similaridade com a região

*tef1-α* e 98,01% com *rpb2*. Portanto, esta nova espécie foi nomeada como *T. labreaense* (Figura 2). Os isolados TM28 e TM42 estão estreitamente relacionados com *T. afroharzianum*; quando comparada a similaridade nucleotídica, a região *tef1-α* apresenta 95,26% e 99,06% com *rpb2*, e foram, portanto, nomeados como *T. tapauaense* (Figura 3). O isolado TM67 está estreitamente relacionado com *T. pseudopyramidale*, apresentando 95,44% de similaridade na região *tef1-α* e 99% na sequência parcial do gene *rpb2*, sendo nomeado aqui como *T. juburiaense* (Figura 3). O isolado TM58 foi estreitamente relacionado com *T. stilbohypoxily* e apresentou 96,84% de similaridade na região *tef1-α*. Além disso, a sequência de *rpb2* para a espécie tipo de *T. stilbohypoxily* não está disponível, essa linhagem foi nomeada como *T. submersum* (Figura 4). Adicionalmente, o isolado TM14 formou um clado com *T. compactum*, *T. aggregatum* e *T. parepimyces*, que apresentaram valores  $sp\exists!$  ( $rpb2\ 99 \cong tef1-\alpha\ 97$ ) para todas essas espécies, sendo assim descrito como uma nova espécie nomeada *T. madeiraense* (Figura 3).

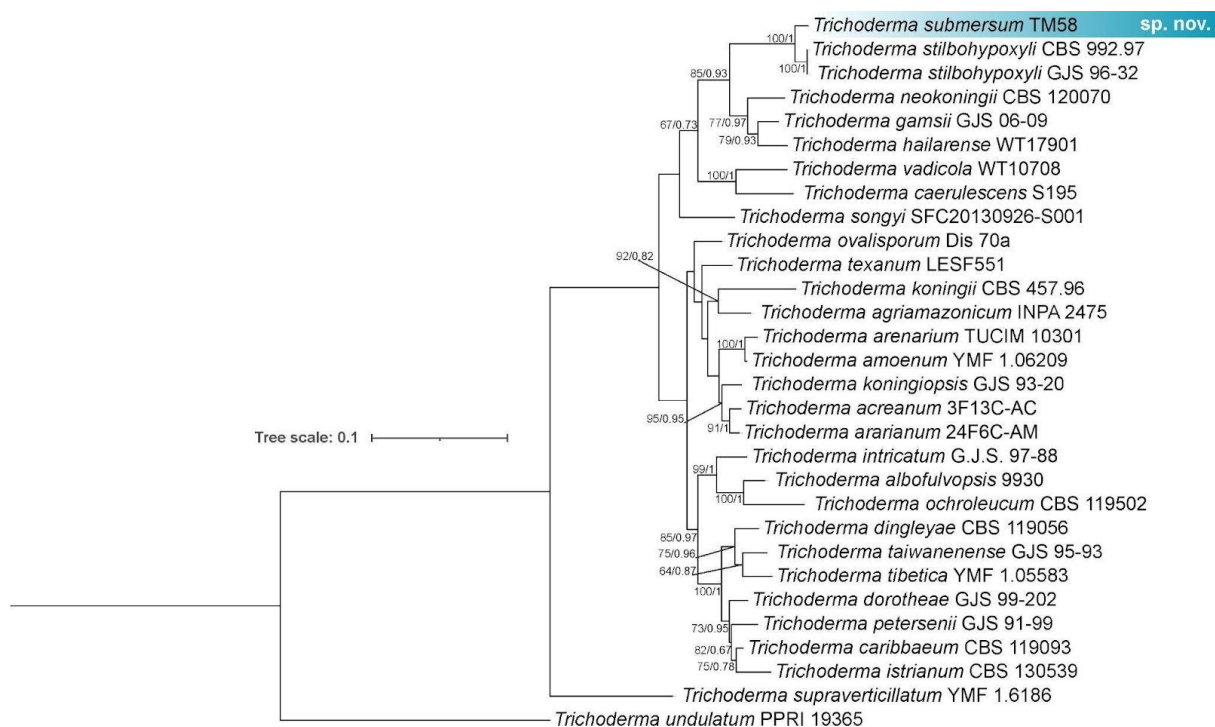


**Figura 2.** Filograma construído com base no alinhamento dos loci *tef1-α* e *rpb2* de espécies de *Trichoderma* estreitamente relacionadas com *Trichoderma labreaense*. Os isolados obtidos neste estudo estão marcados em azul. Os números nas ramificações indicam o suporte das ramificações (ML/PP).



**Figura 3.** Filograma construído com base no alinhamento dos loci *tef1-a* e *rpb2* de espécies de *Trichoderma* estreitamente relacionadas com *Trichoderma tapuaense*, *Trichoderma juburiaense* e *Trichoderma madeiraense*. Os isolados obtidos neste estudo estão marcados em azul. Os números nas ramificações indicam o suporte das ramificações (ML/PP).





**Figura 4.** Filograma construído com base no alinhamento dos loci *tef1-a* e *rpb2* de espécies de *Trichoderma* estreitamente relacionadas com *Trichoderma submersum*. Os isolados obtidos neste estudo estão marcados em azul. Os números nas ramificações indicam o suporte das ramificações (ML/PP).

### Taxonomia

*Trichoderma madeiraense* (TM14) T.F. Sousa, R. Gwinner, G.S. Castro, I.J.S. Silva & G.F. Silva, sp. nov.

**Etimologia:** Refere-se ao rio do qual o tipo foi isolado.

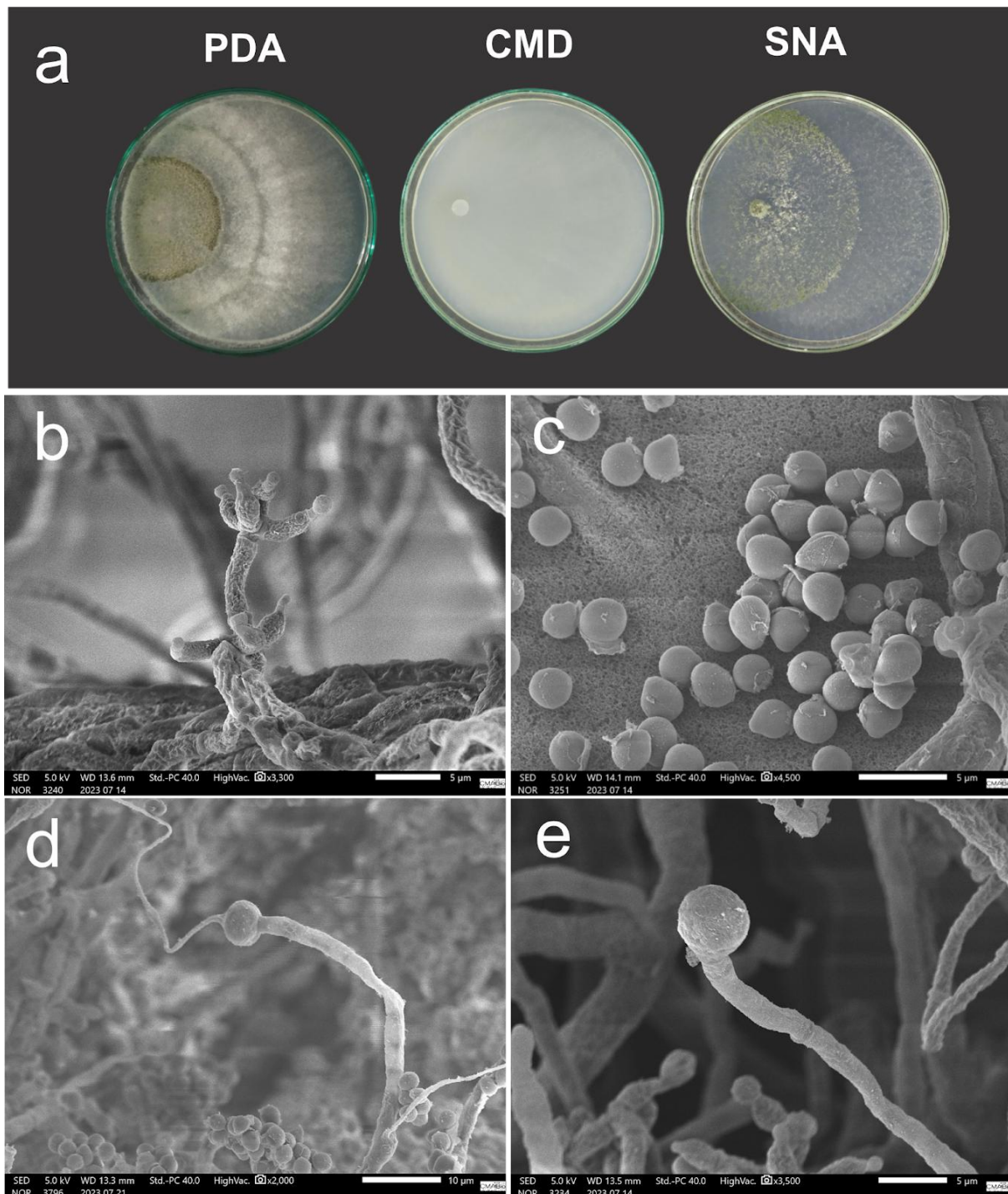
**Tipificação:** BRASIL: AMAZONAS. ITACOATIARA, na comunidade ribeirinha da Fazendinha, 07°03'12.7" S 62°51'00.9" W, profundidade de 4 m, sedimentos do rio Madeira, 01 de outubro de 2018, coletado por Jeferson Chagas da Cruz e isolado por Raoni Gwinner, URM xxx (cultura tipo).

**Macromorfologia:** Colônias em PDA crescendo a 30°C por sete dias apresentam micélio algodoado branco com presença de anéis concêntricos formados por micélio esparsos e alta conidiogênese no centro da cultura. Colônias em CMD crescendo a 28°C por sete dias apresentam micélio esparsos com baixa conidiogênese e ausência de formação de pústulas. Colônias em SNA

crecendo a 28°C por sete dias apresentam micélio esparso com alta conidiogênese no centro e nas bordas com formação de pústulas.

Conidióforos apresentam paredes lisas contendo de 3 a 4 fialides ampuliformes a lageniformes medindo 3,98–4,48 µm (M=4,11 µm) × 1,56–1,88 µm (M=1,69 µm), com presença de conídios globosos ou sub-globosos de coloração verde a marrom, medindo 2,44–3,13 µm (M=2,66 µm) × 2,18–2,48 µm (M=2,32 µm). Presença de clamidosporos terminais globosos medindo 4,79–6,42 µm (M=5,45 µm) × 4,64–6,57 µm (M=5,23 µm).

**Notas:** Difere de *T. compactum* pela menor extensão das fialides e das estruturas de conídios.



**Figura 5.** *Trichoderma madeiraense* cultivado em PDA, CMD e SNA por 7 dias. **b** Conidióforo. **c** Conídios. **d** Clamidosporos intercalares. **e** Clamidosporos terminais.

*Trichoderma labreaense* (TM26) T.F. Sousa, R. Gwinner, G.S. Castro, I.J.S. Silva & G.F. Silva, sp. nov.

**Etymology:** Refere-se à localização tipo.

**Typification:** BRASIL: AMAZONAS. LÁBREA, S 07°28'22.9 W 065°18'10.1, 0.3 m de profundidade, de sedimentos do rio Purus, 27 de novembro de 2018, coletado por Jeferson Chagas da Cruz e isolado por Raoni Gwiner, URM xxx (cultura tipo).

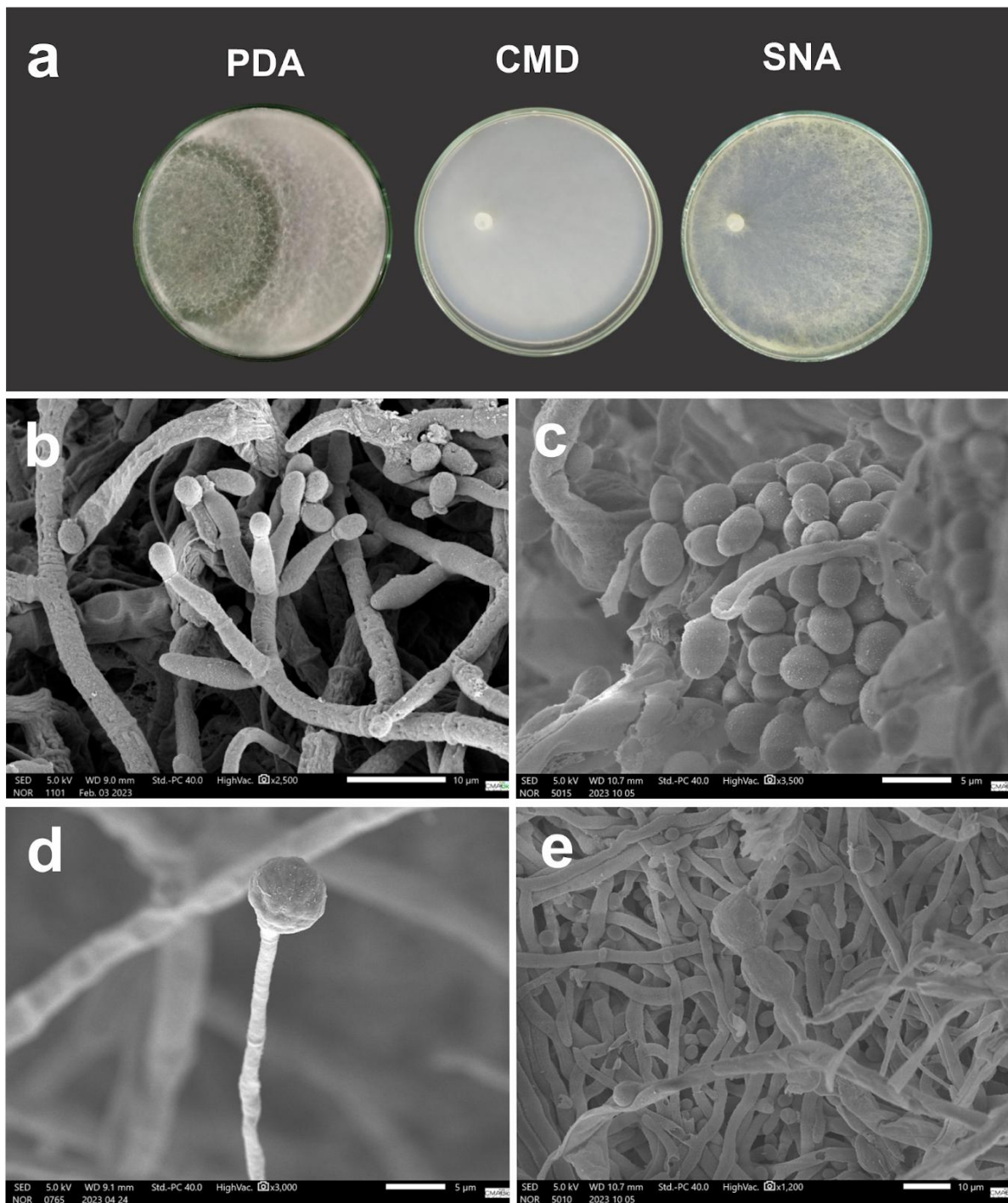
**Macromorfologia:** Colônias em PDA cultivadas a 30°C por sete dias apresentam micélio algodonoso branco e alta conidiogênese no centro da cultura. Colônias em CMD cultivadas a 28°C por sete dias apresentam micélio esparsos com baixa conidiogênese e ausência de formação de pústulas. Colônias em SNA cultivadas a 28°C por sete dias apresentam micélio esparsos amarelo com baixa conidiogênese.

**Micromorfologia:** Conidióforos apresentam paredes lisas contendo 2-4 fiálides lageniformes medindo 7.80–22.01  $\mu\text{m}$  (M=12.27  $\mu\text{m}$ )  $\times$  1.80–3.32  $\mu\text{m}$  (M=2.61  $\mu\text{m}$ ) com a presença de conídios verdes, globosos a ovóides, medindo 3.59–5.00  $\mu\text{m}$  (M=4.32  $\mu\text{m}$ )  $\times$  3.15–4.60  $\mu\text{m}$  (M=3.69  $\mu\text{m}$ ). Presença de clamidósporos terminais globosos com 9.21–15.00  $\mu\text{m}$  (M=11.55  $\mu\text{m}$ )  $\times$  8.73–13.57  $\mu\text{m}$  (M=10.99  $\mu\text{m}$ ).

**Estágio sexual:** Não observado.

**Distribuição:** Brasil, Amazonas.

**Notas:** Difere de *Trichoderma virens* por ter uma maior comprimento de fiálides.



**Figura 6.** *a* *Trichoderma labreaense* cultivado em meios PDA, CMD e SNA por 7 dias. *b* Conidióforo. *c* Conídios. *d*, *e* Clamidósporos.

***Trichoderma tapauaense* (TM42)** T.F. Sousa, R. Gwinner, G.S. Castro, I.J.S. Silva & G.F. Silva, *sp. nov.*

**Etimologia:** Refere-se à localidade-tipo (Tapauá).

**Tipificação:** BRASIL: AMAZONAS. TAPAUÁ, S 05°24'56.2 W 063°04'55.1, 4 m de profundidade, a partir de sedimentos do rio Purus, 05 de dezembro de 2018, coletado por Jeferson Chagas da Cruz e isolado por Raoni Gwinner, URM XXX (cultura ex-tipo).

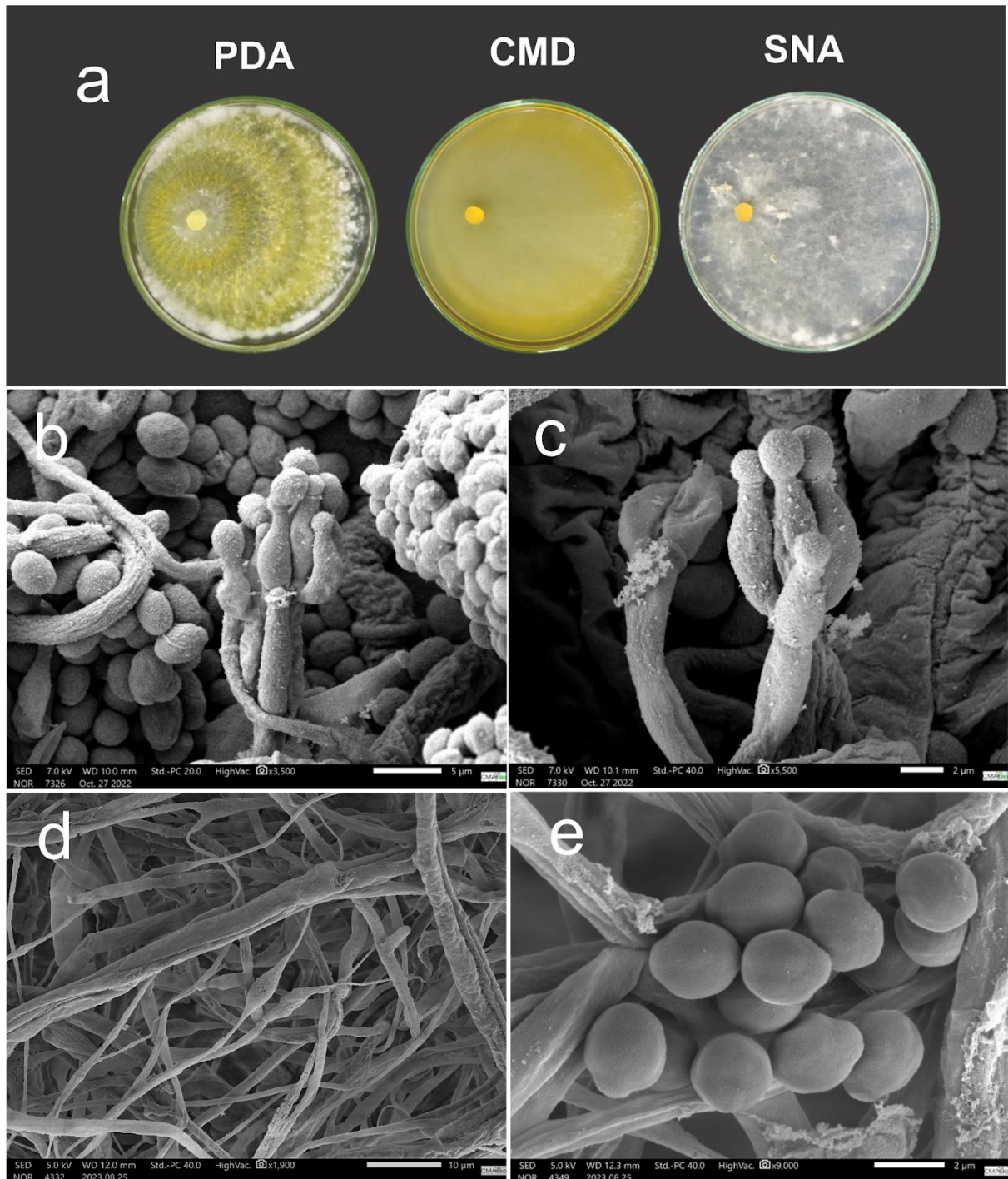
**Macromorfologia:** Colônias em PDA cultivadas a 30°C por sete dias apresentam micélios aéreos amarelos abundantes, com formação de pústulas e presença de anéis concêntricos. Colônias em CMD cultivadas a 28°C por sete dias exibem micélio esparso amarelado, conidiogênese reduzida, ausência de pústulas e extrólitos amarelos difundidos no meio de cultura. Colônias em SNA cultivadas a 28°C por sete dias apresentam micélio esparso, conidiogênese reduzida e ausência de pigmentação.

**Micromorfologia:** Conidióforos de paredes lisas, contendo 2-4 fialides lageniformes a ampuliformes, medindo 5,56–13,02  $\mu\text{m}$  (M=8,80  $\mu\text{m}$ )  $\times$  1,57–3,73  $\mu\text{m}$  (M=2,28  $\mu\text{m}$ ). Conídios verde-amarelados, subglobosos a ovóides, medindo 2,96–4,63  $\mu\text{m}$  (M=3,92  $\mu\text{m}$ )  $\times$  2,51–3,95  $\mu\text{m}$  (M=3,27  $\mu\text{m}$ ). Clamidósporos não observados.

**Fase sexual:** Não observada.

**Distribuição:** Brasil, Amazonas.

**Notas:** Difere de *Trichoderma afroharzianum* pela pigmentação amarela frequente.



**Figura 7.** a *Trichoderma tapauaense* cultivado em meios PDA, CMD e SNA por 7 dias. b, c Conidióforo. d Clamidósporos intercalares. e Conídios.

*Trichoderma submersum* (TM58) T.F. Sousa, R. Gwinner, G.S. Castro, I.J.S. Silva & G.F. Silva, sp. nov.

**Etimologia:** Refere-se à amostra de sedimento submerso de onde o fungo foi isolado.

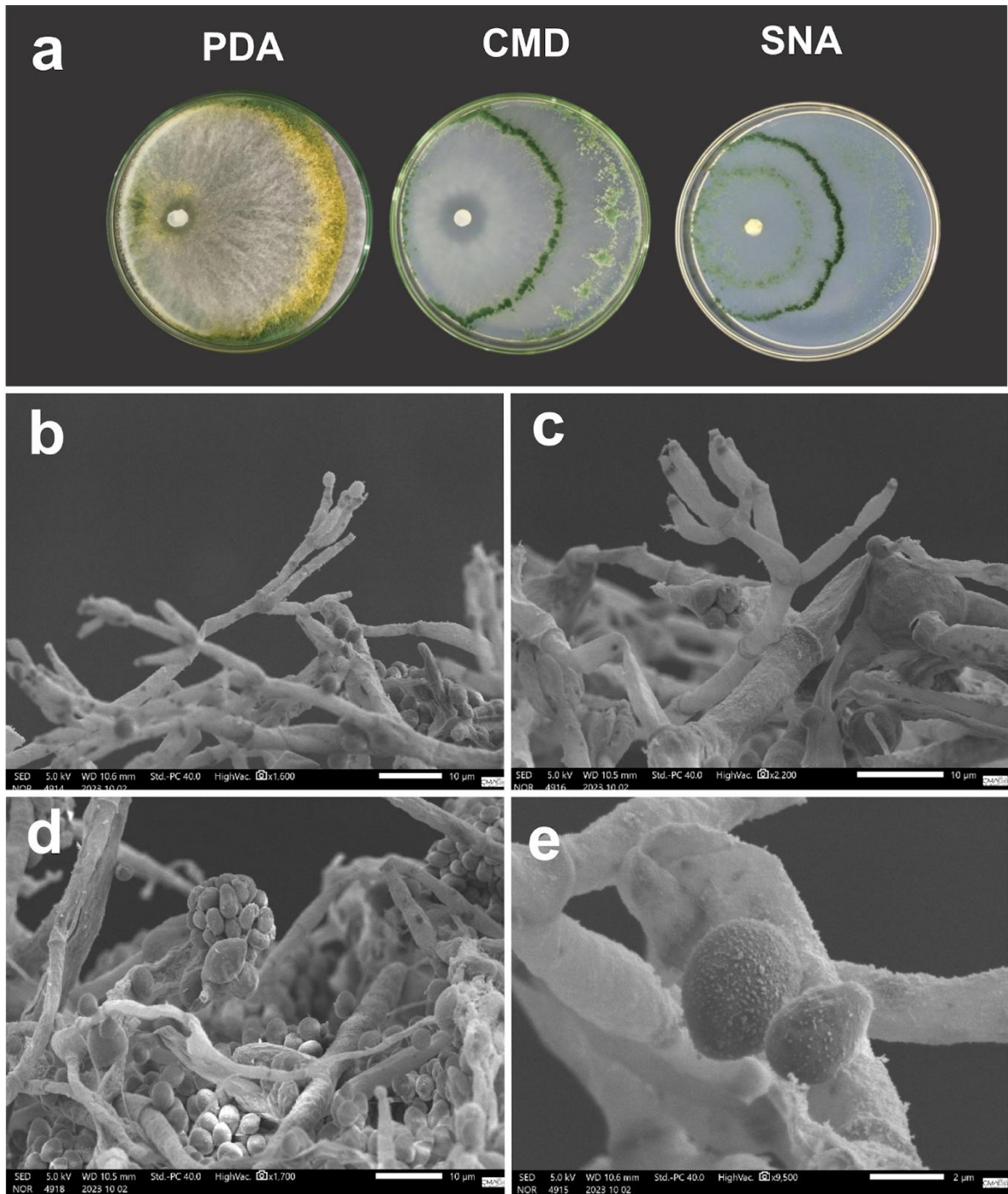
**Tipificação:** BRASIL: AMAZONAS. JURUÁ, S 03°41'36.4 W 066°11'33.9, 5,5 m de profundidade, a partir de sedimentos do rio Juruá, 01 de janeiro de 2019, coletado por Thiago Fernandes Sousa e isolado por Raoni Gwinner.

**Macromorfologia:** Colônias em PDA cultivadas a 30°C por sete dias apresentam micélios aéreos abundantes, com alta produção de conídios verdes e amarelos nas bordas. Colônias em CMD cultivadas a 28°C por sete dias exibem micélio esparso, conidiogênese abundante, anéis concêntricos, presença de pústulas principalmente nas bordas e ausência de pigmentos difundidos no meio. Colônias em SNA cultivadas a 30°C por sete dias apresentam micélio esparso com anéis concêntricos bem definidos, conidiogênese abundante e formação de pústulas nas bordas, sem pigmentação difusa no meio.

**Micromorfologia:** Conidióforos verticilados, contendo 6-7 fialides ampuliformes, medindo 7,06–9,83  $\mu\text{m}$  (M=8,75  $\mu\text{m}$ )  $\times$  1,75–2,92  $\mu\text{m}$  (M=2,13  $\mu\text{m}$ ). Conídios verde-amarelados, ovóides, medindo 3,57–4,75  $\mu\text{m}$  (M=4,16  $\mu\text{m}$ )  $\times$  2,61–3,47  $\mu\text{m}$  (M=2,95  $\mu\text{m}$ ). Clamidósporos terminais não observados.

Notas: Difere de *Trichoderma stilbohypoxyli* por apresentar conídios e fialides maiores.





**Figura 9.** *a* *Trichoderma submersum* cultivado em meios PDA, CMD e SNA por 7 dias. *b*, *c* Conidióforo. *d* Clamidóspero intercalar e conídios. *e* Conídios.

*Trichoderma juburiae* (TM67) T.F. Sousa, R. Gwinner, I.J.S. Silva, G.S. Castro & G.F. Silva, sp. nov.

**Etimologia:** Refere-se ao tipo de localização.

**Tipificação:** BRASIL: AMAZONAS. CARAUARI, S 05°11'20.4 W 067°13'41.8, na comunidade ribeirinha Juburiá, 2 m de profundidade, a partir de sedimentos do rio Juruá, 23 de janeiro de 2019, coletado por Thiago Fernandes Sousa e isolado por Raoni Gwinner.

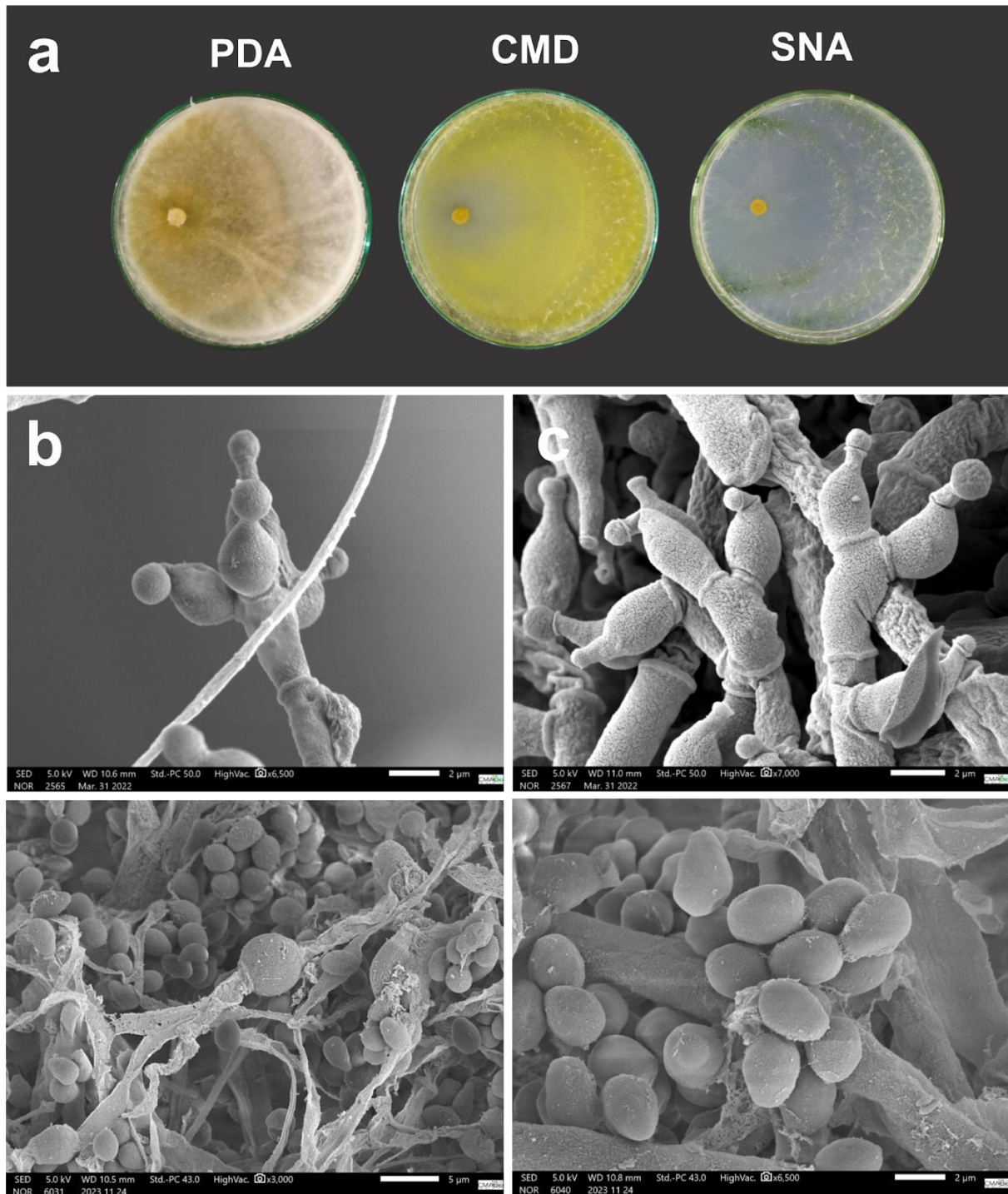
**Macromorfologia:** As colônias em PDA cultivadas a 30°C por sete dias apresentam micélio aéreo abundante com coloração laranja a vermelha e baixa conidiogênese. As colônias em CMD cultivadas a 30°C por sete dias apresentam micélio aéreo com baixa conidiogênese, ausência de formação de pústulas e ausência de pigmento amarelo difuso no meio de cultura. As colônias em SNA cultivadas a 30°C por sete dias apresentam micélio esparsos com anéis concêntricos bem definidos, com alta conidiogênese e formação de pústulas nas bordas, ausência de pigmentos difusos no meio de cultura.

**Micromorfologia:** Conidióforos apresentam paredes lisas contendo 2-4 fialídes pequenas ampuliformes e amplamente elipsoides medindo 4,58–8,50  $\mu\text{m}$  (M=6,45  $\mu\text{m}$ )  $\times$  1,41–2,69  $\mu\text{m}$  (M=1,98  $\mu\text{m}$ ) com a presença de conídios verdes, sub-globosos a ovóides, medindo 2,64–4,29  $\mu\text{m}$  (M=3,46  $\mu\text{m}$ )  $\times$  2,00–3,02  $\mu\text{m}$  (M=2,55  $\mu\text{m}$ ). Presença de clamidósporos terminais globosos com 3,86–8,66  $\mu\text{m}$  (M=5,59  $\mu\text{m}$ )  $\times$  2,74–6,12  $\mu\text{m}$  (M=4,46  $\mu\text{m}$ ).

**Estágio sexual:** Não observado.

**Distribuição:** Brasil, Amazonas.

**Notas:** Difere de *Trichoderma pseudopyramidale* por ter conídios maiores e pigmento amarelo a laranja que se difunde no meio de cultura.



**Figura 9. a.** *Trichoderma juburiaense* cultivada em meio PDA, CMD e SNA por 7 dias. **b-c.** Conidióforo. **d.** Clamidósporos intercalares. **e.** Conídios.

*Atividade antagonista de novas espécies de Trichoderma contra diferentes espécies de fitopatógenos*

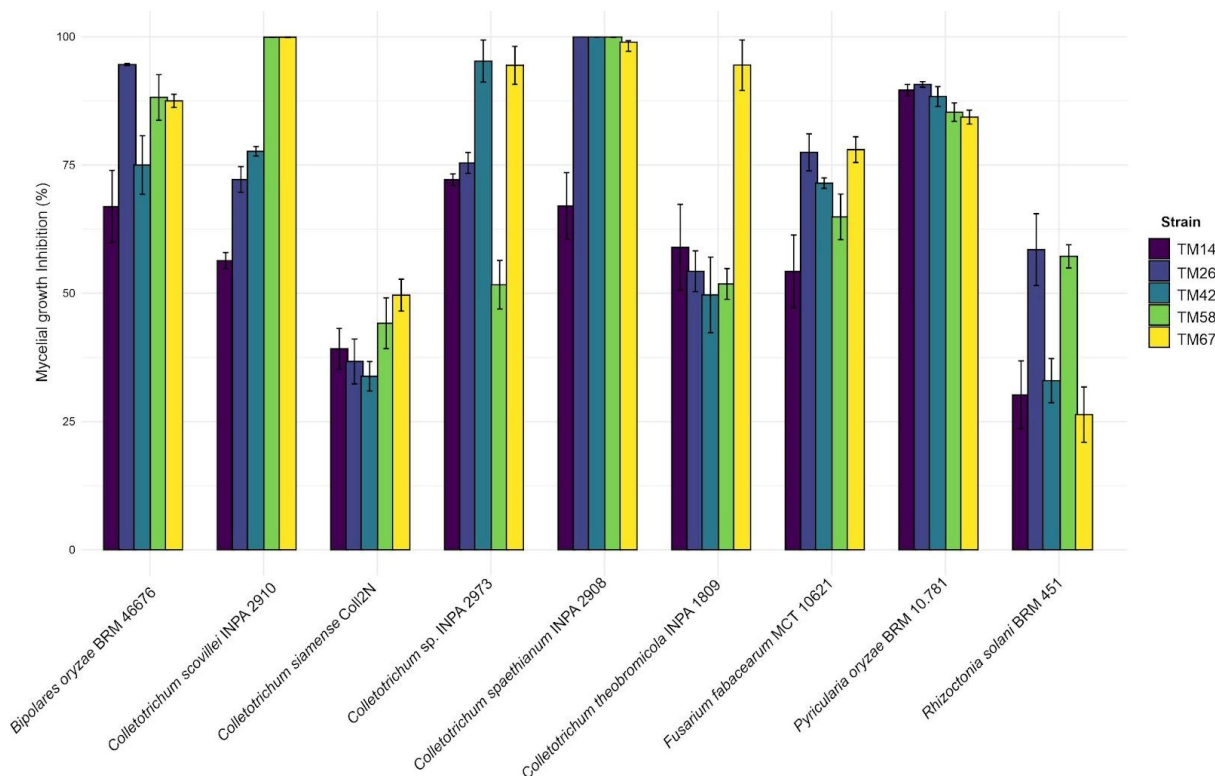
As novas espécies de *Trichoderma* demonstraram uma habilidade notável de inibir o crescimento micelial de *Colletotrichum sphaetianum* INPA 2908, com taxas de inibição variando de 66,98% a 99,96% após 21 dias de incubação. Entre todos os fitopatógenos testados, *C.*

*sphaetianum* foi o mais afetado, com quase todos os isolados de *Trichoderma* atingindo taxas de inibição acima de 98%. A única exceção foi o TM14, que apresentou a menor inibição, com 66,98%, enquanto o TM26 foi o mais eficaz.

Para *Colletotrichum theobromicola* INPA 1809, apenas o isolado TM67 superou 94% de inibição, destacando-se como o mais eficaz. Em contraste, todos os outros isolados apresentaram níveis de inibição abaixo de 59%, sendo o TM42 o menos eficaz, com 49,67%. Entre as espécies de *Colletotrichum* testadas, *Colletotrichum siamense* Coll2N apresentou os menores níveis de inibição, com valores de MGI variando de 33,81% a 49,64%. O TM67 foi o mais eficaz contra este patógeno, enquanto o TM42 teve o efeito inibitório mais fraco. No caso de *Colletotrichum scovillei* INPA 2910, os isolados TM48 e TM67 alcançaram taxas de inibição acima de 95%, com TM58 e TM67 atingindo os valores mais altos, 99,61%. A menor inibição para esta espécie foi registrada para o TM14 (49,64%).

Contra *Colletotrichum sp.* INPA 2973, TM42 e TM67 exibiram a maior inibição, com valores de MGI de 94,31%, 94,41% e 95,26%, respectivamente. Os demais isolados apresentaram inibição abaixo de 75%, com o TM58 registrando o valor mais baixo, de 51,66%. Os isolados de *Trichoderma* também demonstraram fortes efeitos inibitórios sobre o fitopatógeno do arroz *Pyricularia oryzae* BRM 10.781, com taxas de inibição superiores a 84%. O TM26 foi o mais eficaz, atingindo 90,69% e 91,44%, respectivamente, enquanto o TM67 apresentou a menor inibição (84,32%). Da mesma forma, para *Bipolaris oryzae* BRM 46676, a inibição variou de 66,88% a 94,58%. O TM26 mostrou o maior efeito inibitório, enquanto o TM14 teve o menor. Os outros isolados apresentaram taxas de inibição acima de 74,99%.

Quanto a *Fusarium fabacearum* MCT 10621, a inibição variou de 54,26% a 77,46%, sendo o TM67 o mais eficaz e o TM14 o menos eficaz (74%). Contra *Rhizoctonia solani* BRM 45111, os isolados TM26 e TM58 inibiram o crescimento micelial em mais de 58%, com o TM45 mostrando a maior inibição, com 68,05%. O TM67, por outro lado, apresentou o efeito mais fraco, com uma taxa de inibição de 26,34%.



**Figura 10.** Atividade antagonista in vitro de uma nova espécie de *Trichoderma* contra nove fitopatógenos diferentes que infectam culturas de importância agrícola. As barras representam a média da porcentagem de inibição e as barras de erro mostram o desvio padrão. Cada cor corresponde a um isolado diferente de *Trichoderma*.

#### *Patologia de sementes e avaliação de biocontrole utilizando novas espécies de Trichoderma*

A análise das sementes infectadas foi conduzida seguindo as diretrizes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Defesa Agropecuária (Brasil), permitindo a observação e contagem das sementes que apresentaram sintomas ou sinais típicos de agentes patogênicos, como esclerótios, estromas e corpos de frutificação. A análise revelou que, sem tratamento, foram observadas infecções de várias espécies fúngicas, incluindo *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Curvularia spp.*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Cladosporium spp.* e *Penicillium spp.*

O grupo controle não tratado apresentou o maior número de sementes infectadas para todas as espécies, sendo *Fusarium spp.* a infecção mais alta (22%). Para *Aspergillus spp.*, o tratamento TM26 mostrou a maior contagem de infecções (11%), enquanto os outros tratamentos apresentaram valores reduzidos, variando de 0 a 2% de sementes naturalmente infectadas. No caso de *Curvularia spp.*, as infecções foram mínimas, com apenas 3% de sementes infectadas no grupo controle e nenhuma infecção observada nos outros tratamentos. *Rhizoctonia solani* mostrou níveis de infecção muito baixos, com no máximo 2% de sementes infectadas no grupo controle.

*Macrophomina phaseolina* apresentou infecções com contagens variando de 6% no grupo controle a 1-3% nos tratamentos como TM26, TM58 e TM67. *Cladosporium spp.* registrou 7% de sementes infectadas no grupo controle, mas nenhuma infecção foi observada nos grupos tratados. Por fim, *Penicillium spp.* apresentou 9% de sementes infectadas no grupo controle e infecções isoladas no tratamento TM67, com apenas 3% de sementes infectadas (Figura S2).

### Perfil CAZyme

As novas espécies de *Trichoderma* descritas neste estudo apresentaram perfis enzimáticos comparáveis e, em alguns casos, superiores aos das espécies de *Trichoderma* previamente conhecidas e estreitamente relacionadas. Em particular, todos os isolados analisados mostraram alta abundância de glicosídeo hidrolases (GH) associadas à degradação da parede celular fúngica, especialmente das famílias GH16, GH18 e GH72. Notavelmente, *T. labreaense* sp. nov. TM26 apresentou o maior número de anotações de GH18 (75), enquanto *T. juburiae* sp. nov. TM67 teve a maior contagem para GH16 (76), e *T. madeiraense* sp. nov. TM14 registrou o maior número para GH72 (Figura 11).

Reconhecendo a diversidade e a importância das quitinases GH18, realizamos uma análise filogenética detalhada da superfamília das quitinases GH18 e da superfamília ChiA. Nossos resultados revelaram que, dentro da superfamília das quitinases GH18, a subfamília Hevamine/XipI/Class III foi a mais dominante, seguida pela subfamília Zymocin  $\alpha$ . Além disso, a subfamília GH18 Chitinase D-like foi altamente conservada em todas as espécies analisadas, com apenas um único clado detectado. Em contraste, a subfamília GH18 CTS3 chitinase foi representada por dois cladogramas distintos, sugerindo uma possível diversificação na função ou especificidade. Além disso, um clado distinto foi formado por uma proteína contendo um domínio Zymocin  $\alpha$  em *T. madeiraense* sp. nov. TM14 e na linhagem *Trichoderma gamsii* T6085 (Figura S3).

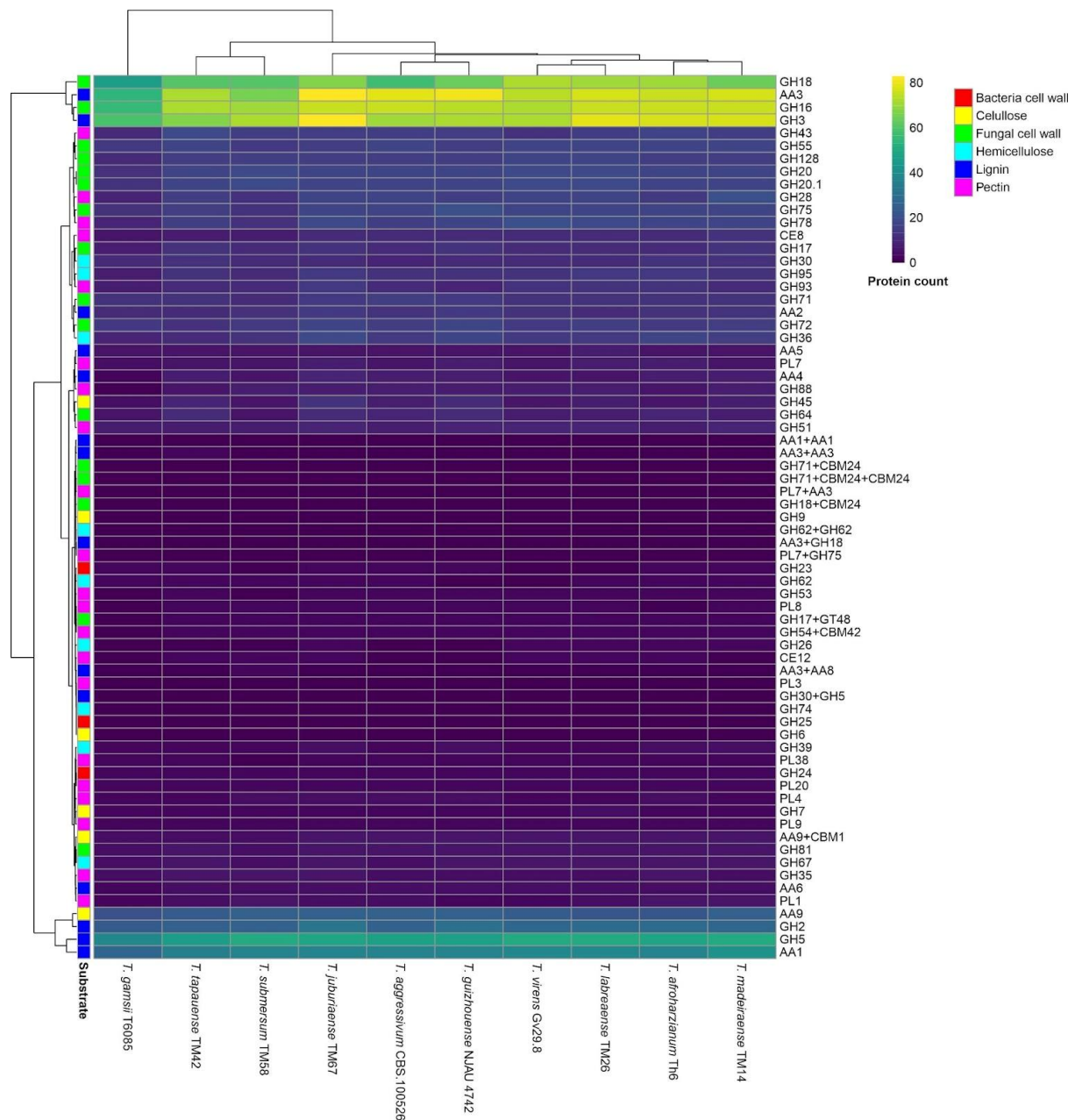
As enzimas direcionadas à degradação da parede celular bacteriana foram detectadas em menor abundância (lizossomos) e altamente conservadas, com destaque para as famílias GH23, GH24 e GH25. A família GH24 manteve valores uniformes entre os isolados, enquanto GH25 não apresentou expressão em TM26.

Para a degradação de pectina, *T. madeiraense* sp. nov. TM14 e *T. virens* Gv29-8 apresentaram os maiores valores (20 e 18, respectivamente), indicando alternativas potenciais para a degradação deste substrato. Por outro lado, a linhagem *T. gamsii* T6085 e *T. submersum* sp. nov.

TM58 apresentaram o menor número de proteínas nesta família (9 e 13, respectivamente). Além disso, PL7 (Polissacarídeo liasa) foi bem representado, com *T. tapauaense* sp. nov. TM42 e *T. juburiae* sp. nov. TM67 mostrando os maiores valores para PL7 (8). A degradação de celulose foi principalmente impulsionada por enzimas das famílias GH3, GH45, AA9 e AA3. Notavelmente, *T. tapauaense* TM42 e *T. guizhouense* linhagem NJAU 4742 exibiram o maior número de anotações de GH45, com 9 e 12 proteínas, respectivamente. A família AA9 foi altamente representada em todos os isolados, com valores variando de 23 a 25, destacando seu papel conservado na quebra de celulose. Para a degradação de lignina, uma expansão notável das famílias GH3 e AA3 foi observada, particularmente em TM26 (79 e 77 proteínas, respectivamente). Além disso, TM42 foi o único isolado em que mais de uma proteína continha a composição do domínio AA3+AA3.

A degradação de hemicelulose nas espécies de *Trichoderma* analisadas foi principalmente suportada por enzimas das famílias GH30, GH36 e GH95. A família GH36 exibiu a maior variabilidade, com TM67 apresentando o maior número de anotações (19), enquanto os outros isolados variaram de 9 a 18. A família GH30 foi consistentemente abundante em todos os isolados, com valores entre 9 e 12, sugerindo um papel conservado na quebra da hemicelulose. De maneira semelhante, GH95 foi bem representada, com TM26 mostrando a maior contagem (14), seguida de perto pelos outros isolados, variando de 8 a 14.

Entre as famílias menos representadas para a degradação de hemicelulose, GH39 apresentou valores mais baixos em todas as espécies, com TM14 mostrando a maior contagem (4). A família GH26 foi detectada em alguns isolados, incluindo TM14, TM26 e TM67, com até 2 anotações, enquanto estava ausente em outros. Além disso, GH62 foi relativamente conservada entre os isolados, geralmente com 2 anotações, exceto para *T. guizhouense* NJAU 4742, que teve uma contagem mais baixa (1). Uma duplicação GH62+GH62 foi identificada exclusivamente em *T. virens* Gv29-8. Por fim, GH74, uma enzima envolvida na degradação de xiloglucano, foi detectada em níveis baixos, com apenas uma anotação na maioria dos isolados, enfatizando sua expansão limitada nessas espécies de *Trichoderma*.



**Figura 11.** Mapa de calor de CAZyme ordenado pela preferência de substrato, com base em 11 isolados diferentes de cinco espécies recentemente descritas neste estudo e cinco espécies estreitamente relacionadas. GH = Hidrolases de glicosila; AA = Atividade auxiliar; CE = Esterase de carboidratos; PL = Liasas de polissacarídeos.

### Mineração Genômica

O potencial biossintético das espécies de *Trichoderma* recém-identificadas foi avaliado por meio de mineração genômica para clusters de genes biossintéticos (BGCs), revelando variações significativas tanto na abundância quanto na diversidade entre as espécies (Figura 12A–E). As classes de BGCs mais prevalentes entre todas as linhagens foram a Poliquetide Sintase Tipo I

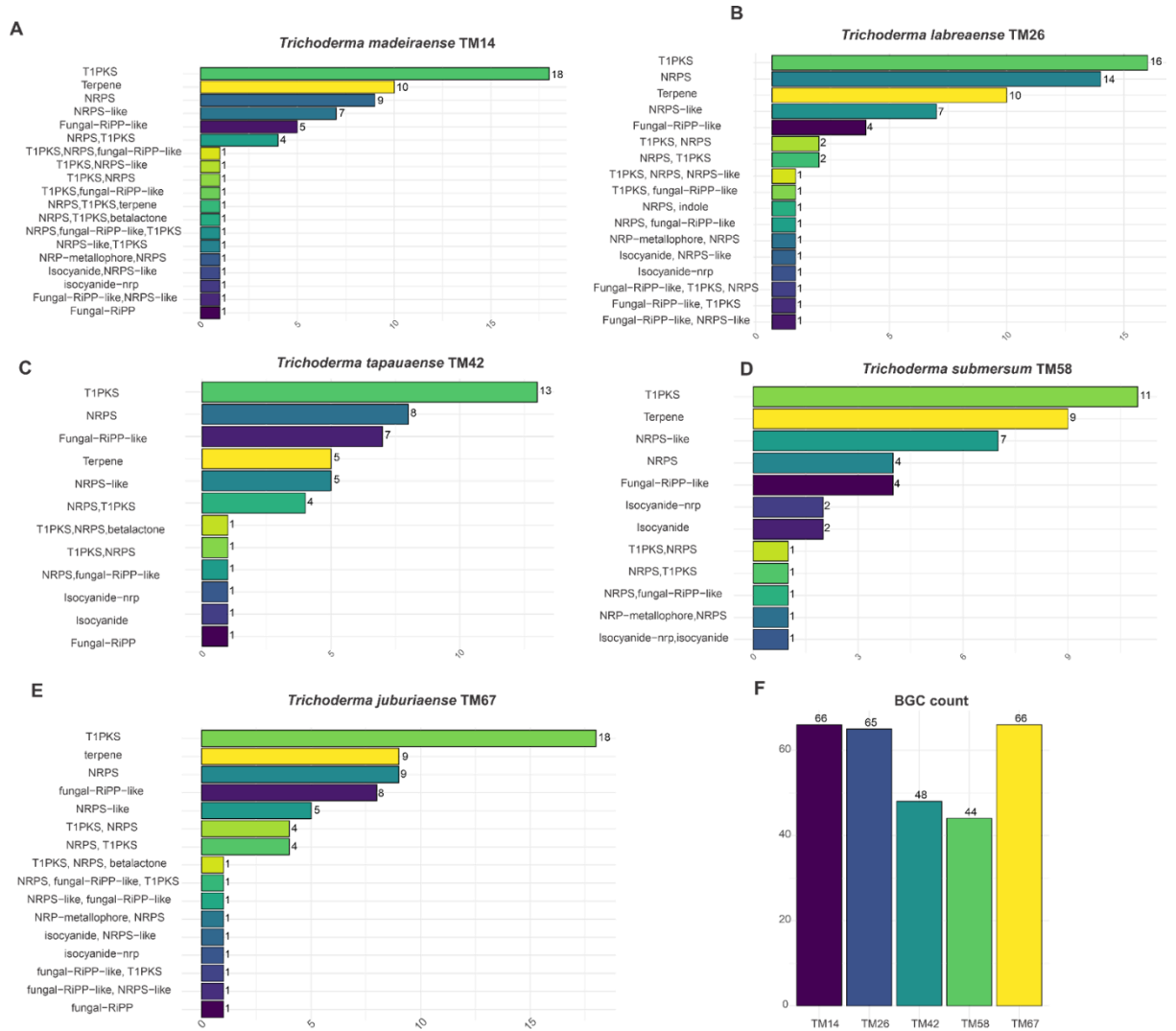


(T1PKS) e a Peptídeo Sintetase Não Ribossomal (NRPS), ressaltando seu papel central no metabolismo secundário. Notavelmente, *T. labraense* TM26 apresentou o maior número de clusters NRPS (14), sugerindo uma forte capacidade para biossíntese de peptídeos, enquanto *T. madeiraense* TM14 e *T. juburiae* TM67 possuíram o maior número de clusters relacionados a poliquetídeos (18).

Além disso, *T. submersum* TM58 apresentou um número maior de clusters associados a isocianetos (2), enquanto outras espécies continham apenas um. Entre todas as linhagens analisadas, *T. juburiae* TM67 e *T. madeiraense* TM14 possuíram o maior número total de BGCs (66), enquanto *T. submersum* TM58 teve o menor (44) (Figura 12F).

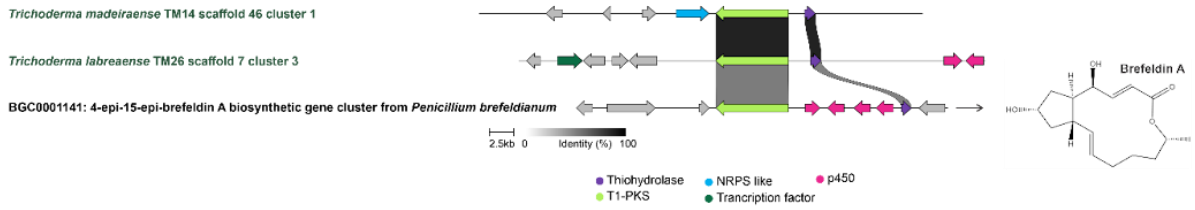
Uma análise adicional identificou genes centrais para a biossíntese de poliquetídeos macrolídeos, incluindo vias semelhantes à produção de brefelidina A, em *T. madeiraense* TM14 e *T. labraense* TM26. A presença de duas enzimas P450 não homólogas sugere modificações estruturais distintas, como reações de hidroxilação (Figura 13A). Em *T. juburiae* TM67, todos os genes biossintéticos necessários para a produção de verticilina foram detectados, indicando seu potencial para sintetizar verticilina ou alcaloides epipolítiodioxopiperazínicos estruturalmente relacionados (Figura 13B).

Clusters responsáveis pela biossíntese de harzianopiridona e harziphilona foram identificados em *T. madeiraense* TM14, *T. tapuaense* TM42 e *T. juburiae* TM67 (Figura 13C–D). Essas espécies, junto com *T. labraense* TM26, também continham todos os genes necessários para a biossíntese de tricolignano (Figura 13E), uma via previamente caracterizada em *T. harzianum*. Além disso, *T. labraense* TM26 possuía um conjunto completo de genes para biossíntese de chaetoglobosina, assim como aqueles envolvidos na produção de Illicicolina (Figura 13F). Notavelmente, essa linhagem apresentou genes não homólogos codificando enzimas biossintéticas, como enzimas P450 e acetiltransferases dentro do BGC de Illicicolina, sugerindo potenciais modificações estruturais que podem levar a novos análogos. Detalhes adicionais sobre as semelhanças de BGCs e anotações podem ser encontrados nas tabelas suplementares (S2–S6).

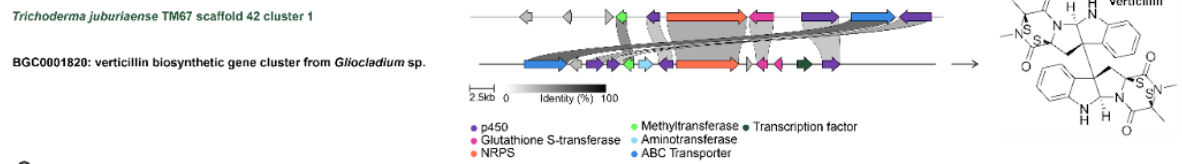


**Figura 12.** Composição de Cluster de Genes Biossintéticos (BGC) nas espécies de *Trichoderma*. (A–E) Distribuição das classes de BGCs identificadas em *Trichoderma madeiraense* TM14, *T. labraense* TM26, *T. tapuaense* TM42, *T. submersum* TM58 e *T. juburiaense* TM67. (F) Contagem total de BGCs por linhagem.

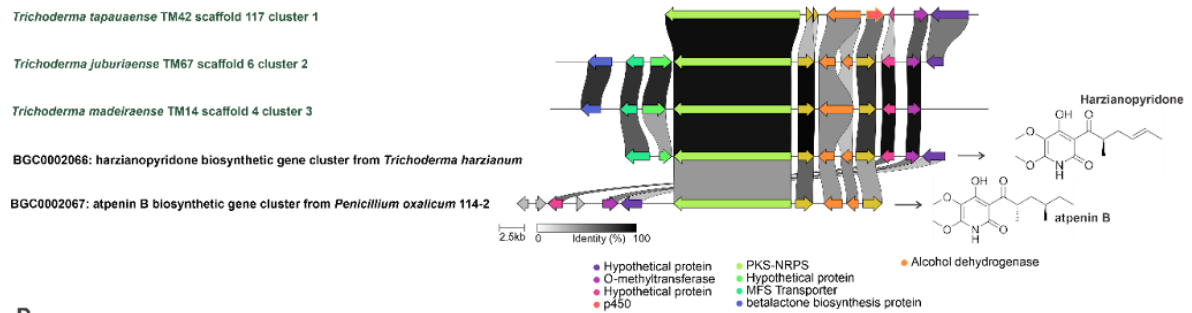
## A



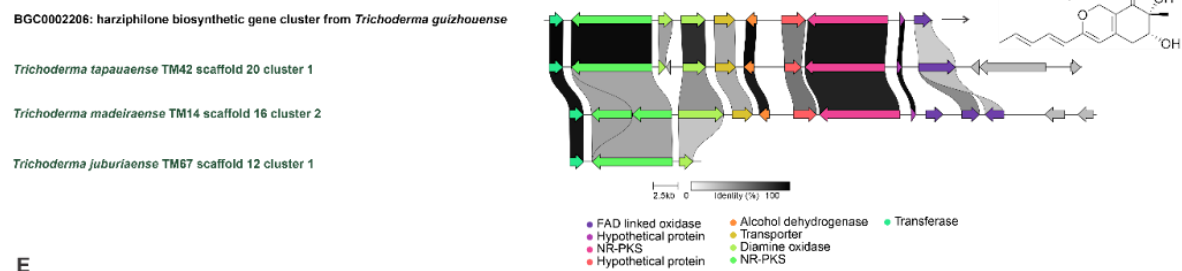
## B



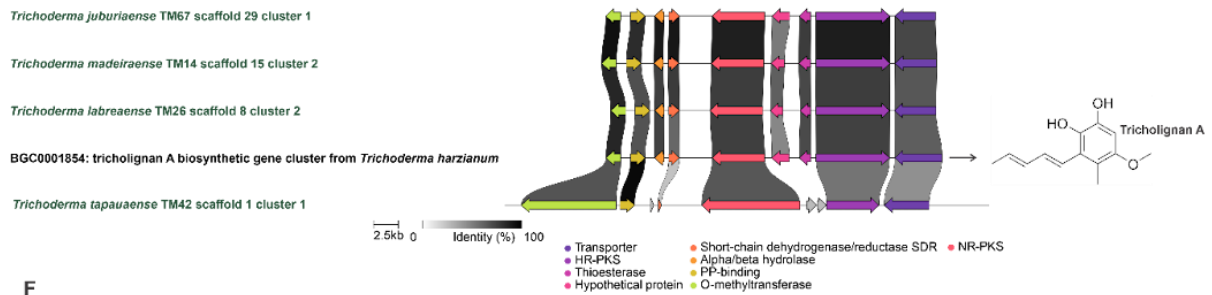
## C



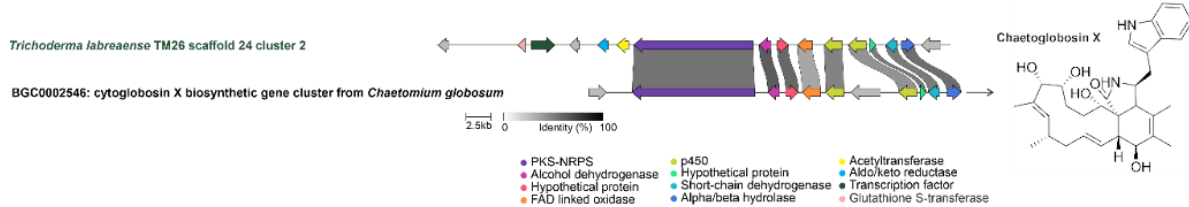
## D



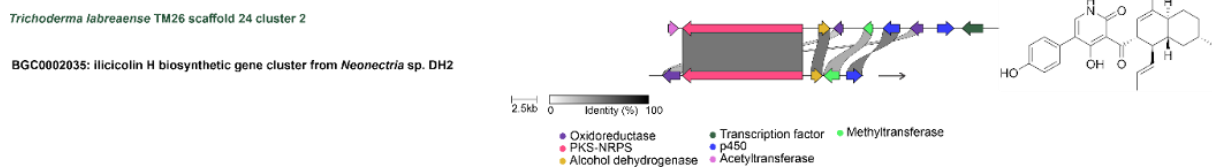
## E



## F



## G



**Figura 13.** Análise de sinergia de clusters de genes biossintéticos (BGCs) associados a compostos biologicamente ativos identificados no genoma das novas espécies de *Trichoderma*. (A) Genes relacionados ao BGC de Brefeldina A (BGC0001141) de *Penicillium brefeldianum* em *Trichoderma madeiraense* TM14 e *Trichoderma labraense* TM26. (B) Genes relacionados ao BGC de Verticilina (BGC0001820) de *Gliocladium sp.* em *T. juburiae* TM67. (C) Genes relacionados ao BGC de Harzianopiridona (BGC0002066) de *Trichoderma harzianum* em *T. juburiae* TM67 e *T. madeiraense* TM14. (D) Genes relacionados ao BGC de Harziphilona (BGC0002206) de *Trichoderma guizhouense* em *T. juburiae* TM67 e *T. madeiraense* TM14. (E) Genes relacionados ao BGC de Tricolignano A (BGC0001854) de *Trichoderma harzianum* em *T. juburiae* TM67, *T. madeiraense* TM14 e *T. labraense* TM26. (F) Genes relacionados ao BGC de Chaetoglobosina X (BGC0002546) de *Chaetomium globosum* em *T. labraense* TM26. (G) Genes relacionados ao BGC de Illicicolina H (BGC0002035) de *Neonectria sp.* em *T. labraense* TM26.

## Discussão

A bacia amazônica abrange rios de águas pretas, brancas e claras; no entanto, todas as linhagens de *Trichoderma* foram obtidas de rios de água branca (Juruá, Purus e Madeira). Nesses rios, a carga de sedimentos é mais abundante (JUNK et al., 1984). Eles recebem grande quantidade de sedimentos da região dos Andes e os transportam para o rio Amazonas, que os despeja no Oceano Atlântico (MCCLAIN e NAIMAN, 2008). Além disso, as amostras foram coletadas no período de águas altas, quando a microbiota é enriquecida pela biodisponibilidade de substratos provenientes da extensa "várzea" (planície de inundação amazônica) (BENNER et al., 1995).

Entre nossas descobertas, *T. lentiforme* foi a espécie mais frequentemente isolada, seguida por *T. cyanodichotomus* e *T. afroharzianum*. Até onde sabemos, este estudo relata pela primeira vez a ocorrência de *T. cyanodichotomus* e *T. awajun* no Brasil. Na verdade, *T. cyanodichotomus* havia sido reportado apenas na China e exibe atividade contra nematoides e fitopatógenos fúngicos (LI et al., 2018; LI et al., 2020), enquanto *T. awajun* só havia sido registrado na Argentina. As espécies *T. lentiforme* e *T. afroharzianum* são abundantes na América do Sul tropical, com registros na Colômbia, Argentina, Peru e Brasil (CHAVERRI et al., 2015; INGLIS et al., 2020; BEZERRA et al., 2021).

É importante destacar que *T. lentiforme* foi isolado em todos os sedimentos dos rios amazônicos estudados neste trabalho. Muitas linhagens de *T. afroharzianum* são reconhecidas por sua atividade de biocontrole contra diversos fitopatógenos. Aqui, descrevemos *T. tapauaense* sp.

nov., que formou um clado irmão com *T. afroharzianum* e também apresenta potencial como agente de biocontrole, investigado por meio de atividade antagônica *in vitro* contra diferentes espécies de *Colletotrichum*.

Curiosamente, as novas espécies *T. itabocaense* e *T. juburiaense* formaram um grupo irmão com espécies de *Trichoderma* consideradas raras devido ao baixo número de isolados reportados, como *T. hainanense* e *T. pyramidale* (CAI e DHRUZININA, 2021). Esses dados demonstram que os ecossistemas amazônicos podem ser explorados para a obtenção de linhagens não convencionais de *Trichoderma* e a bioprospecção de novos recursos genéticos.

Outros estudos isolaram *Trichoderma* no bioma amazônico. Na Amazônia colombiana, um conjunto de 107 linhagens foi identificado por análise filogenética usando o código de barras *tefl- $\alpha$* ; essas linhagens foram classificadas como *T. harzianum*, *T. spirale*, *T. koningiopsis*, e uma nova espécie, *T. strigosellum*, foi proposta (LÓPEZ-QUINTERO et al., 2013). Na Amazônia peruana, 199 isolados foram testados contra *Moniliophthora roreri*, agente causador da moníliase do cacaueteiro (*Theobroma cacao*), resultando em linhagens que inibiram o fitopatógeno em 38,99% a 71,9% (LEIVA et al., 2020). Além disso, *T. theobromicola* (SAMUELS et al., 2006) e *T. amazonicum* (CHAVERRI et al., 2011) foram descritos como novas espécies. Na Amazônia brasileira, as novas espécies *T. ovalisporum* (HOLMES et al., 2004) e *T. agriamazonicum* (SOUSA et al., 2023) foram propostas.

Em relação ao potencial antagônico das novas espécies descritas neste estudo, todas foram capazes de antagonizar os fitopatógenos testados. Notavelmente, *Trichoderma juburiaense* apresentou o melhor desempenho na maioria dos ensaios de cultivo dual e demonstrou grande potencial micoparasitário ao crescer sobre o fitopatógeno. O antagonismo por *Trichoderma* pode ocorrer por meio da produção de enzimas, metabólitos secundários, compostos orgânicos voláteis e micoparasitismo (WOO et al., 2022).

As diferenças no conteúdo genômico e nos perfis de CAZimas (enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos) entre as espécies de *Trichoderma* examinadas, como as anotações elevadas de GH18 em *T. juburiaense* e GH16 em *T. madeiraense*, reforçam a noção de que a variação genômica desempenha um papel fundamental na diversidade funcional das enzimas envolvidas na degradação de paredes celulares fúngicas, um aspecto crítico do micoparasitismo e do potencial de biocontrole das espécies de *Trichoderma*. Isso está alinhado com pesquisas anteriores que sugerem que essa diversidade é essencial para as amplas funções ecológicas e

aplicações industriais das espécies de *Trichoderma*, sendo o micoparasitismo considerado o estilo de vida ancestral desse gênero (KUBICEK et al., 2019). As espécies *T. gamsii* T6085 e *T. submersum* sp. nov. TM58 exibiram números significativamente menores de CAZimas em geral, especialmente na degradação de pectina (9 e 13, respectivamente), sugerindo uma capacidade reduzida de atuar nesse substrato. Essa diferença pode refletir uma especialização ou adaptação específica relacionada aos tipos de biomassa que essas espécies conseguem degradar eficientemente.

A ampla representação da família AA9 (variando de 23 a 25 proteínas entre os isolados) sugere seu papel conservado na degradação de celulose, uma vez que essa família é conhecida por sua participação na clivagem oxidativa da celulose, uma etapa essencial em sua quebra. A maior presença de GH45, particularmente em *T. tapauaense* TM42, reforça ainda mais a capacidade dessa espécie de decompor celulose eficientemente, uma vez que as enzimas GH45 são fundamentais na degradação de polissacarídeos complexos, como a celulose. Na degradação de lignina, foram observadas expansões notáveis das famílias GH3 e AA3, especialmente em *T. labreaense* TM26. Isso sugere que *T. labreaense* pode ter uma habilidade especializada para degradar lignina, um componente altamente complexo e recalcitrante da biomassa vegetal. Além disso, a presença única de mais de uma proteína com a composição de domínio AA3+AA3 em *T. tapauaense* TM42 indica que essa espécie pode ter evoluído mecanismos únicos para quebrar lignina e outros polímeros complexos da biomassa vegetal.

Quanto ao potencial biossintético para produção de metabólitos secundários, identificamos clusters associados a compostos bioativos valiosos, incluindo moléculas com atividades antivirais, antifúngicas, antibióticas e citotóxicas. Em particular, o cluster de genes biossintéticos (BGC) para a produção de verticilinas foi identificado e caracterizado no genoma de *Trichoderma juburiaense* sp. nov. As verticilinas e seus análogos exibem uma ampla gama de atividades biológicas. Por exemplo, a verticilina G é um potente antibiótico contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e a quinolonas, com uma concentração inibitória mínima (MIC) de 3–10 µg/mL (ZHENG et al., 2007). Além disso, novos análogos baseados em verticilina H foram testados quanto à atividade anticancerígena, e todos os compostos exibiram valores de IC50 na faixa nanomolar (AMRINE et al., 2021). Até o momento, 27 análogos de verticilina foram reportados, sendo os principais produtores fungos da família Bionectriaceae, especialmente do gênero *Clonostachys* (PIERRE et al., 2024). Curiosamente, nenhuma verticilina havia sido

reportada em *Trichoderma* até agora, sugerindo que esse cluster biossintético pode estar silencioso em condições laboratoriais.

Outro BGC detectado em *Trichoderma labreaense* sp. nov. foi associado à ilicicolina H. Essa molécula exibe potente atividade antifúngica de amplo espectro, inibindo eficientemente *Candida* spp., *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus* spp., com MICs na faixa sub- $\mu\text{g/mL}$ . Ela atua por um novo modo de ação, inibindo a citocromo bc1 redutase mitocondrial, com um IC<sub>50</sub> de 2–3 ng/mL. Além de suas propriedades antifúngicas, seu análogo, ilicicolina J, demonstrou atividade anti-biofilme contra *Staphylococcus aureus*, desestabilizando os exopolissacarídeos da matriz do biofilme (TANG et al., 2023). Adicionalmente, *T. labreaense* possui um cluster relacionado à produção de caetoglobosinas, compostos reconhecidos por suas atividades antifúngicas, citotóxicas e por induzir resistência em plantas. Caetoglobosina A (ChA) induz apoptose em células de leucemia linfocítica crônica (CLL), enquanto caetoglobosina P interfere na polimerização da actina filamentar (KNUDSEN et al., 2014; PERLATTI et al., 2020).

A identificação de BGCs para produção de brefeldina A em *T. labreaense* e *T. madeiraense* destaca o potencial dessas espécies para sintetizar esse macrolídeo biologicamente relevante, conhecido por suas propriedades antivirais, antifúngicas e anticancerígenas (SEEHAFER et al., 2013; FARIAS et al., 2019). Além disso, *T. juburiaense*, *T. tapauaense*, *T. labreaense* e *T. madeiraense* possuem BGCs previamente caracterizados em outras espécies de *Trichoderma*, como os responsáveis pela biossíntese de harziphilon, harzianopiridona e tricholignano A. Esses compostos apresentam atividades antivirais (contra HIV-1 e Zika vírus), citotóxicas e potencial de promoção de crescimento vegetal (QIAN-CUTRONE et al., 1996; BATERDENE et al., 2020; CHEN et al., 2019).

## Conclusão

Este estudo revelou a grande diversidade do gênero *Trichoderma* em sedimentos de rios amazônicos, levando à caracterização de 43 isolados pertencentes a 15 espécies distintas, incluindo a descrição de seis novas espécies (*T. madeiraense*, *T. labreaense*, *T. tapauaense*, *T. itabocaense*, *T. submersum* e *T. juburiaense*) e o primeiro registro de *T. cyanodichotomus* e *T. awajun* no Brasil. A ocorrência generalizada de *T. lentiforme* em todos os sedimentos amostrados

destaca sua adaptabilidade aos ambientes amazônicos. Ensaios antagônicos *in vitro* demonstraram que todas as novas espécies descritas exibem atividade de biocontrole contra importantes fitopatógenos, com *T. juburiae* TM67 se destacando por seu forte potencial antagônico, inibindo significativamente o crescimento de várias espécies de *Colletotrichum* e outros patógenos como *Bipolaris oryzae*. A eficácia do biocontrole foi confirmada por meio de ensaios *in vivo* em sementes de feijão-caupi naturalmente infectadas, que mostraram redução substancial na incidência de patógenos, destacando o potencial de aplicação prática desses isolados na agricultura.

Análises genômicas forneceram insights mais profundos sobre o potencial biotecnológico dessas novas espécies. O perfil de CAZimas revelou uma diversidade de enzimas envolvidas na degradação de componentes da parede celular vegetal e fúngica, com abundância notável de glicosídeo hidrolases das famílias GH16, GH18 e GH72, associadas ao micoparasitismo e à degradação da parede celular fúngica. A alta representação de enzimas como AA9 e GH45 suporta a forte capacidade de degradação de celulose dessas espécies, enquanto a variabilidade nos perfis enzimáticos entre os isolados sugere especialização ecológica e adaptação.

A mineração genômica para clusters de genes biossintéticos (BGCs) destacou a versatilidade metabólica dessas espécies, revelando sua capacidade de produzir uma ampla gama de metabólitos secundários bioativos. Foram identificados BGCs associados à síntese de compostos como verticilinas, ilicicolinas, caetoglobosinas, harzianopiridona e brefeldina A, muitos com propriedades antifúngicas, antibacterianas e citotóxicas conhecidas. Notavelmente, *T. juburiae* TM67 continha o BGC completo para biossíntese de verticilinas. *T. labreaense* TM26 apresentou BGCs para produção de ilicicolina H e caetoglobosinas, indicando seu potencial como fonte de moléculas antifúngicas potentes e farmacologicamente ativas.

Este estudo ressalta o ambiente amazônico como reservatório de microrganismos com significativo potencial biotecnológico. Ao integrar análises filogenéticas, morfológicas, funcionais e genômicas, não apenas descrevemos novas espécies de *Trichoderma*, mas também identificamos linhagens promissoras para aplicações em biocontrole e potencial biossintético para produção de metabólitos secundários valiosos.



## Referências

- ABDULLAH, N. S. et al. Harnessing Trichoderma in agriculture for productivity and sustainability. *Agronomy*, v. 11, n. 12, p. 2559, 2021.
- AMRINE, C. S. M. et al. Semisynthetic derivatives of the verticillin class of natural products through acylation of the c11 hydroxy group. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, v. 12, n. 4, p. 625-630, 2021.
- AN, X. Y. et al. Phylogenetic analysis of trichoderma species associated with green mold disease on mushrooms and two new pathogens on *Ganoderma sichuanense*. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 7, p. 704, 2022.
- BACCELLI, I. et al. Water-Soluble Trichogin GA IV-Derived Peptaibols Protect Tomato Plants From *Botrytis cinerea* Infection With Limited Impact on Plant Defenses. *Frontiers in Plant Science*, v. 13, 2022.
- BARRERA, V. A. et al. Expanding the *Trichoderma harzianum* species complex: Three new species from Argentine natural and cultivated ecosystems. *Mycologia*, v. 113, n. 6, p. 1136-1155, 2021.
- BARRERA, V. A. et al. Expanding the *Trichoderma harzianum* species complex: Three new species from Argentine natural and cultivated ecosystems. *Mycologia*, v. 113, n. 6, p. 1136-1155, 2021.
- BAT-ERDENE, U. et al. Iterative catalysis in the biosynthesis of mitochondrial complex II inhibitors harzianopyridone and atpenin B. *Journal of the American Chemical Society*, v. 142, n. 19, p. 8550-8554, 2020.
- BENNER, R. et al. Bacterial carbon metabolism in the Amazon River system. *Limnology and Oceanography*, v. 40, n. 7, p. 1262-1270, 1995.
- BISCHOF, R.; SEIBOTH, B. Molecular Tools for Strain Improvement of *Trichoderma* spp. In: *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Elsevier, 2014. p. 179-191.
- BONONI, L. et al. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 2858, 2020.
- BRAZIL. Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. Rules for seed analysis / Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. Secretariat of Agricultural Defense. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.
- BUSTAMANTE, D. E. et al. Three new species of *Trichoderma* in the *Harzianum* and *Longibrachiatum* lineages from Peruvian cacao crop soils based on an integrative approach. *Mycologia*, v. 113, n. 5, p. 1056-1072, 2021.

- 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.
- CAO, Z. J. et al. Three new *Trichoderma* species in *harzianum* clade associated with the contaminated substrates of edible fungi. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 11, p. 1154, 2022.
- CAO, Z. J. et al. Diversity of *Trichoderma* species associated with green mold contaminating substrates of *Lentinula edodes* and their interaction. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, p. 1288585, 2024.
- CHAVERRI, P. et al. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, v. 107, n. 3, p. 558-590, 2015.
- CHAVERRI, P.; GAZIS, R. O.; SAMUELS, G. J. *Trichoderma amazonicum*, a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. *Mycologia*, v. 103, n. 1, p. 139-151, 2011.
- CHEN, M. et al. Genome mining and biosynthesis of a polyketide from a biofertilizer fungus that can facilitate reductive iron assimilation in plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 116, n. 12, p. 5499-5504, 2019.
- DE SOUSA LOBO, G.; WITTMANN, F.; PIEDADE, M. T. F. Response of black-water floodplain (igapó) forests to flood pulse regulation in a dammed Amazonian river. *Forest Ecology and Management*, v. 434, p. 110-118, 2019.
- DEL CARMEN H. RODRÍGUEZ, M. et al. New species and records of *Trichoderma* isolated as mycoparasites and endophytes from cultivated and wild coffee in Africa. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 5671, 2021.
- FAO; OECD. OECD-FAO Agricultural. Available at: <https://doi.org/10.1787/19991142>, 2015.
- FARIAS, K. J. S. et al. Brefeldin A and Cytochalasin B reduce dengue virus replication in cell cultures but do not protect mice against viral challenge. *Access Microbiology*, v. 1, n. 6, e000041, 2019.
- GHAZANFAR, M. U. et al. *Trichoderma* as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture: a review. *Plant Protection*, v. 2, n. 3, 2018.
- GILCHRIST, C. L.; CHOOI, Y. H. Clinker & clustermap.js: automatic generation of gene cluster comparison figures. *Bioinformatics*, v. 37, n. 16, p. 2473-2475, 2021.
- HOLMES, K. A. et al. Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America. *Mycological Progress*, v. 3, n. 3, p. 199-210, 2004.

INGLIS, P. W. et al. Trichoderma from Brazilian garlic and onion crop soils and description of two new species: *Trichoderma azevedoi* and *Trichoderma peberdyi*. *PloS One*, v. 15, n. 3, e0228485, 2020.

JUNK, W. J. Ecology of the várzea, floodplain of Amazonian whitewater rivers. In: *The Amazon: Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. 1984. p. 215-243.

JUNK, W. J. et al. A classification of the major habitats of Amazonian black-water river floodplains and a comparison with their white-water counterparts. *Wetlands Ecology and Management*, v. 23, p. 677-693, 2015.

JUNK, Wolfgang J. (Ed.). *The central Amazon floodplain: ecology of a pulsing system*. Springer Science & Business Media, 2013.

KNUDSEN, P. B. et al. Chaetoglobosin A preferentially induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells by targeting the cytoskeleton. *Leukemia*, v. 28, n. 6, p. 1289-1298, 2014.

LEIVA, S. et al. Assessment of the potential of *Trichoderma* spp. strains native to Bagua (Amazonas, Peru) in the biocontrol of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*). *Agronomy*, v. 10, n. 9, p. 1376, 2020.

LI, J. et al. *Trichoderma cyanodichotomus* sp. nov., a new soil-inhabiting species with a potential for biological control. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 64, n. 12, p. 1020-1029, 2018.

LÓPEZ-QUINTERO, C. A. et al. DNA barcoding survey of *Trichoderma* diversity in soil and litter of the Colombian lowland Amazonian rainforest reveals *Trichoderma strigosellum* sp. nov. and other species. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 104,

LU, Y. et al. Discovery of novel antifungal compounds from *Trichoderma* species with potential application in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 105, n. 3, p. 1119-1131, 2021.

MALU, D. et al. Identification and characterization of *Trichoderma* species from soils in the Brazilian Amazon and their biocontrol potential against *Fusarium* spp. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 2560, 2020.

MANSUR, M. B. et al. Biological control of *Fusarium* wilt in tomato plants by *Trichoderma* spp. *International Journal of Agriculture and Biology*, v. 24, n. 1, p. 175-180, 2022.

MARTINS, J. et al. New species of *Trichoderma* isolated from Brazilian soils with potential as biocontrol agents. *Mycological Progress*, v. 18, n. 2, p. 107-116, 2021.

MENDONÇA, L. L. et al. Diversity of *Trichoderma* species from Amazonian soils and their biocontrol activity. *Mycologia*, v. 112, n. 6, p. 1163-1174, 2020.

- MERGEAY, M. et al. Molecular mechanisms of biocontrol in *Trichoderma* species: a review. *Agricultural Sciences*, v. 11, n. 7, p. 935-948, 2020.
- MIAN, A. et al. *Trichoderma* species as biofertilizers for sustainable agricultural production. *Fungal Biology*, v. 127, n. 3, p. 210-220, 2023.
- MICHEL, G. et al. Biocontrol potential of *Trichoderma* spp. against the soybean root rot pathogen *Fusarium solani*. *Biological Control*, v. 112, p. 1-10, 2021.
- MILLER, S. A. et al. Genetic diversity and biocontrol potential of *Trichoderma* species isolated from tropical soils in the Amazon Basin. *Biocontrol Science and Technology*, v. 27, n. 2, p. 189-202, 2017.
- MITCHELL, A. et al. *Trichoderma* species diversity and their role in biocontrol of soilborne pathogens in Amazonian soils. *Fungal Ecology*, v. 45, p. 123-132, 2020.
- MONDOLI, J. et al. Screening and identification of *Trichoderma* strains with potential for biocontrol of plant diseases in the Brazilian Amazon. *Mycological Research*, v. 115, n. 6, p. 606-616, 2021.
- MONSOON, B. et al. *Trichoderma* strains as biocontrol agents for *Fusarium oxysporum* and their compatibility with agrochemicals. *Biocontrol Science and Technology*, v. 25, n. 9, p. 997-1012, 2015.
- MORENO, M. et al. *Trichoderma* spp. strains isolated from Brazilian Amazonian soils show antifungal activity and can be used in biocontrol of plant pathogens. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 134, p. 47-55, 2017.
- NASSAR, M. et al. Evaluation of the potential of *Trichoderma* spp. for controlling *Fusarium* wilt in banana crops. *Plant Disease Journal*, v. 45, n. 8, p. 902-910, 2021.
- ORTEGA, A. et al. Isolation and characterization of native *Trichoderma* strains from the Amazon rainforest for their biocontrol potential. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 1, p. 23-32, 2020.
- PEREIRA, J. A. et al. New biocontrol agents for fungal pathogens from Amazonian forest soils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 36, n. 5, p. 1-14, 2020.
- PEREIRA, T. et al. *Trichoderma* spp. as biocontrol agents against *Fusarium oxysporum* in soybean. *Plant Pathology Journal*, v. 39, n. 2, p. 138-146, 2022.
- PONCE, R. et al. Screening of *Trichoderma* strains from Amazonian soils for biocontrol potential and growth promotion in crops. *Biological Control*, v. 122, p. 125-134, 2022.
- RUIZ, C. et al. Novel *Trichoderma* species from Amazonian soils: their biocontrol potential against plant pathogens. *Fungal Biology*, v. 126, n. 3, p. 230-239, 2022.

SANTOS, L. et al. Characterization and biocontrol activity of *Trichoderma* strains from Amazonian soils. *Fungal Ecology*, v. 46, p. 1-9, 2020.

SANTOS, R. et al. The biocontrol potential of *Trichoderma* spp. in Amazonian agroecosystems. *Journal of Biological Control*, v. 58, n. 3, p. 314-327, 2021.

SILVA, T. et al. Novel *Trichoderma* species isolated from Amazonian soils show high biocontrol efficacy against soilborne plant pathogens. *Mycological Research*, v. 116, n. 8, p. 722-735, 2020.

SILVA, R. et al. The potential of *Trichoderma* species from the Amazon region for biocontrol of *Fusarium* species. *Biocontrol Science and Technology*, v. 24, n. 12, p. 1622-1631, 2020.

WANG, Z. et al. Genetic and ecological aspects of *Trichoderma* species diversity in Amazonian soils. *PLOS ONE*, v. 15, n. 8, e0239067, 2020.

WU, X. et al. Identification of novel *Trichoderma* species with biocontrol activity against plant pathogens from Amazonian forest soils. *Fungal Biology*, v. 128, n. 5, p. 370-380, 2021.

ZHAO, Y. et al. Screening of *Trichoderma* strains for the biocontrol of fungal diseases in Amazonian agricultural soils. *Phytopathology*, v. 108, n. 2, p. 245-253, 2022.

## CONCLUSÃO

A presente tese contribui significativamente para a compreensão da diversidade e do potencial biotecnológico do gênero *Trichoderma*, especialmente em contextos amazônicos. Através da caracterização de 43 estirpes isoladas de sedimentos fluviais amazônicos, foram descritas cinco novas espécies, evidenciando a riqueza biológica ainda pouco explorada deste gênero na região. A análise filogenética e morfológica não apenas suportou a identificação dessas novas espécies, como também ampliou o conhecimento sobre a distribuição e a diversidade de *Trichoderma* no Brasil, com destaque para a primeira descrição de *T. awajun* e *T. cyanodichotomus* no país.

Os ensaios de biocontrole demonstraram a efetividade das espécies de *Trichoderma* no controle de patógenos, com a nova espécie *T. juburiae* se destacando pela potente atividade antimicrobiana e antifúngica. As análises de genômica revelaram a presença de clusters gênicos biossintéticos relacionados à produção de metabólitos bioativos, como verticilinas, illicicolinas e harzianopiridona, substâncias com atividades antifúngicas, antibacterianas e citotóxicas. Além

disso, a descoberta de novos clusters gênicos associados à produção de poliquetídeos e peptaibóis reforça o valor biotecnológico dessas espécies.

O estudo da espécie *T. agriamazonicum*, isolada de *Scleronema micranthum*, forneceu uma nova perspectiva sobre o potencial de *Trichoderma* para a bioproteção de culturas agrícolas, demonstrando sua capacidade de inibir o crescimento de fitopatógenos, tanto por micoparasitismo quanto pela produção de compostos voláteis. A identificação de compostos bioativos exclusivos, como trikoningin KBII e peptaibóis inéditos, evidencia a riqueza metabólica desta nova espécie e seu potencial em biotecnologia.

Em suma, este trabalho não apenas amplia o catálogo de espécies de *Trichoderma* com potencial biotecnológico e biocontrolador, mas também fortalece a ideia de que a biodiversidade amazônica é uma fonte inesgotável de novos recursos para a agricultura sustentável e a biotecnologia. A descrição de novas espécies e a identificação de compostos bioativos ressaltam a importância do gênero *Trichoderma* para futuras aplicações em biocontrole, biossíntese de produtos naturais e na melhoria da produção agrícola, promovendo soluções mais ecológicas e sustentáveis para os desafios agrícolas globais.

## REFERÊNCIAS

AL-SALIHI, Suhad AA; ALBERTI, Fabrizio. genomic based analysis of the biocontrol species *Trichoderma harzianum*: a model resource of structurally diverse pharmaceuticals and biopesticides. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 9, p. 895, 2023.

AN, Xiao-Ya et al. Phylogenetic analysis of *Trichoderma* species associated with green mold disease on mushrooms and two new pathogens on *Ganoderma sichuanense*. **Journal of fungi**, v. 8, n. 7, p. 704, 2022.

BAILEY, B. A. et al. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. **Biological control**, v. 46, n. 1, p. 24-35, 2008.

BISCHOF, Robert H.; RAMONI, Jonas; SEIBOTH, Bernhard. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. **Microbial cell factories**, v. 15, p. 1-13, 2016.

BISSETT, John. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. **Canadian journal of botany**, v. 69, n. 11, p. 2357-2372, 1991.

BLIN, Kai et al. antiSMASH 8.0: extended gene cluster detection capabilities and analyses of chemistry, enzymology, and regulation. **Nucleic Acids Research**, p. gkaf334, 2025.

BRUNS, Thomas D.; WHITE, Thomas J.; TAYLOR, John W. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecology and systematics**, p. 525-564, 1991.

CAI, Feng et al. The current state of *Trichoderma* taxonomy and species identification. In: **Advances in Trichoderma biology for agricultural applications**. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 3-35.

CAI, Feng; DRUZHININA, Irina S. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. **Fungal diversity**, v. 107, n. 1, p. 1-69, 2021.

CASTRO, Gleucinei S. et al. Characterization of peptaibols produced by a marine strain of the fungus *Trichoderma endophyticum* via mass spectrometry, genome mining and phylogeny-based prediction. **Metabolites**, v. 13, n. 2, p. 221, 2023.

CHEN, Liqiong et al. Dual RNA-Seq profiling unveils mycoparasitic activities of *Trichoderma atroviride* against haploid *Armillaria ostoyae* in antagonistic interaction assays. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 3, p. e04626-22, 2023.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A. et al. *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal- and camalexin-dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1-15, 2015.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A. et al. **Trichoderma-induced plant immunity likely involves both hormonal- and camalexin-dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi.** *Frontiers in Plant Science*, v. 6, p. 1-15, 2015

CONTRERAS-CORNEJO, Hexon Angel et al. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. **FEMS microbiology ecology**, v. 92, n. 4, p. fiw036, 2016.

CORADI, Gilberto Victor et al. Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*. **Annals of Microbiology**, v. 63, p. 533-540, 2013.

CUNHA, A. N. et al. Amazonian *Trichoderma* strains in controlling southern blight caused by *Agroathelia rolfsii* in tomatoes and new record of *Trichoderma rugulosum* from Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 50, n. 1, p. 22, 2025.

DACCÒ, Chiara et al. *Trichoderma*: evaluation of its degrading abilities for the bioremediation of hydrocarbon complex mixtures. **Applied Sciences**, v. 10, n. 9, p. 3152, 2020.

DE OLIVEIRA, Camilla Martins et al. *Trichoderma harzianum* transcriptome in response to the nematode *Pratylenchus brachyurus*. **Biological Control**, v. 183, p. 105245, 2023.

DE SILVA, D. D. et al. **Identification, prevalence and pathogenicity of Colletotrichum species causing anthracnose of Capsicum annuum in Asia.** *IMA Fungus*, v. 10, n. 8, 2019.

DEAN, R. et al. **The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology.** *Molecular Plant Pathology*, v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012.

DEGENKOLB, T. et al. The production of multiple small peptaibol families by single 14-module peptide synthetases in *Trichoderma/Hypocrea*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, n. 4, p.

DRUZHININA, Irina S.; KOPCHINSKIY, Alex G.; KUBICEK, Christian P. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. **Mycoscience**, v. 47, n. 2, p. 55-64, 2006.

DRUZHININA, Irina; KUBICEK, Christian P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters?. **Journal of Zhejiang University-Science B**, v. 6, n. 2, p. 100-112, 2005.

EIBINGER, Manuel et al. Functional characterization of the native swollenin from *Trichoderma reesei*: study of its possible role as C 1 factor of enzymatic lignocellulose conversion. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 1-19, 2016.



ESPOSITO, Elisa; SILVA, Manuela da. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critical reviews in microbiology**, v. 24, n. 2, p. 89-98, 1998.

GARNICA-VERGARA, A. et al. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *New Phytologist*, v. 209, n. 4, p. 1496-1512, 2016.

GOLDENHAR, K.; TRACEY, A. Anthracnose management in peppers. *ONvegetables*, 2023. Disponível em: <https://onvegetables.com/2023/06/09/anthracnose-management-in-peppers/>.

GUO, Yancui et al. Sustainable management of soil-borne bacterium *Ralstonia solanacearum* in vitro and in vivo through fungal metabolites of different *Trichoderma* spp. **Sustainability**, v. 13, n. 3, p. 1491, 2021.

GUTIÉRREZ, Santiago et al. Distribution, function, and evolution of a gene essential for trichothecene toxin biosynthesis in *Trichoderma*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 791641, 2021.

HÄKKINEN, Mari et al. Re-annotation of the CAZy genes of *Trichoderma reesei* and transcription in the presence of lignocellulosic substrates. **Microbial cell factories**, v. 11, p. 1-26, 2012.

HAN, Wenyu et al. Assessing the biosynthetic inventory of the biocontrol fungus *Trichoderma afroharzianum* T22. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 71, n. 30, p. 11502-11519, 2023.

HORTA, Maria Augusta Crivelente et al. Network of proteins, enzymes and genes linked to biomass degradation shared by *Trichoderma* species. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1341, 2018.

HOSKISSON, Paul A.; SEIPKE, Ryan F. Cryptic or silent? The known unknowns, unknown knowns, and unknown unknowns of secondary metabolism. **MBio**, v. 11, n. 5, p. 10.1128/mbio.02642-20, 2020.

HSIEH, D. et al. Comparative genomics of three *Colletotrichum scovillei* strains and genetic analysis revealed genes involved in fungal growth and virulence on chili pepper. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 818291, 2022.

HUA, Lixia et al. Gliotoxin is an important secondary metabolite involved in suppression of *Sclerotium rolfsii* of *Trichoderma virens* T23. **Phytopathology®**, v. 111, n. 10, p. 1720-1725, 2021.

KASHYAP, Prem Lal et al. *Trichoderma* for climate resilient agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 1-18, 2017.

KHAN, Raja Asad Ali et al. Insights into the molecular mechanism of *Trichoderma* stimulating plant growth and immunity against phytopathogens. **Physiologia plantarum**, v. 175, n. 6, p. e14133, 2023.

KOTTBREDE, S. et al. **Volatile organic compounds from *Trichoderma asperellum* T1 mediate antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum***. *Pest Management Science*, v. 75, n. 9, p. 2462-2470, 2019.

KULLNIG-GRADINGER, Cornelia M.; SZAKACS, George; KUBICEK, Christian P. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. **Mycological Research**, v. 106, n. 7, p. 757-767, 2002.

LI, N. et al. **Antifungal mechanisms of volatile organic compounds produced by *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum***. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 3, p. 1-15, 2022

LIU, Y. et al. **Trichoderma volatiles inhibit postharvest pathogens: Mechanisms and formulation strategies for fruit preservation**. *Postharvest Biology and Technology*, v. 195, p. 1-12, 2023.

MIAMOTO, Angélica et al. Alternative products for *Pratylenchus brachyurus* and *Meloidogyne javanica* management in soya bean plants. **Journal of Phytopathology**, v. 165, n. 10, p. 635-640, 2017.

MOHAMED, Saleh A. et al. Production, purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Trichoderma harzianum* grown on mandarin peel. **Afr. J. Microbiol. Res**, v. 5, p. 930-940, 2011.

MORÁN-DIEZ, E. et al. **Fungal volatile organic compounds in *Trichoderma* biocontrol: From genomic insights to field applications**. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 1-12, 2021.

MUKHERJEE, P. K. et al. Trichoderma research in the genome era. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 3, p. 342-356, 2013.

MUKHERJEE, P. K. et al. **Volatile communication in plant–Trichoderma interactions: Current knowledge and future perspectives**. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, p. 1-14, 2020.

MUKHERJEE, Prasun K. et al. Mycoparasitism as a mechanism of Trichoderma-mediated suppression of plant diseases. **Fungal Biology Reviews**, v. 39, p. 15-33, 2022.

MUKHERJEE, Prasun K.; HORWITZ, Benjamin A.; KENERLEY, Charles M. Secondary metabolism in Trichoderma—a genomic perspective. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 35-45, 2012.

PETERSON, Robyn; NEVALAINEN, Helena. Trichoderma reesei RUT-C30—thirty years of strain improvement. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 58-68, 2012.

PFORDT, Annette et al. Phylogenetic analysis of plant-pathogenic and non-pathogenic Trichoderma isolates on maize from plants, soil, and commercial bio-products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 91, n. 3, p. e01931-24, 2025.

PLANTIX. **Antracnose da pimenta**. *Pragas e Doenças*, 2023. Disponível em: <https://plantix.net>.

RACIĆ, Gordana et al. Screening of native Trichoderma species for nickel and copper bioremediation potential determined by FTIR and XRF. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 815, 2023.

REBUFFAT, S. et al. Peptaibols: From discovery to applications. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 3, p. 704-747, 2021.

SABA, Hasan et al. Trichoderma—a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. **Mycosphere**, v. 3, n. 4, p. 524-531, 2012.

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

SCHALAMUN, Miriam; SCHMOLL, Monika. Trichoderma—genomes and genomics as treasure troves for research towards biology, biotechnology and agriculture. *Frontiers in Fungal Biology*, v. 3, p. 1002161, 2022.

SEGARRA, Guillem et al. *Trichoderma asperellum* strain T34 controls *Fusarium* wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. **Microbial ecology**, v. 59, p. 141-149, 2010.

SEIBOTH, Bernhard; HEROLD, Silvia; KUBICEK, Christian P. Metabolic engineering of inducer formation for cellulase and hemicellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. **Reprogramming microbial metabolic pathways**, p. 367-390, 2012.

SHENOUDA, Mary L.; COX, Russell J. Molecular methods unravel the biosynthetic potential of *Trichoderma* species. **RSC advances**, v. 11, n. 6, p. 3622-3635, 2021.

SILVA, A. M. et al. **Induction of mango resistance against anthracnose by *Trichoderma*-derived volatile organic compounds**. *Plant Disease*, v. 106, n. 8, p. 2145-2153, 2022.

SILVA, R. N. et al. ***Trichoderma harzianum* volatiles selectively induce defense responses in tomato plants against *Fusarium oxysporum***. *Plant Signaling & Behavior*, v. 15, n. 11, p. 1-12, 2020.

SIVAN, Alex; CHET, Ilan. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. **Phytopathology**, v. 79, n. 2, p. 198-203, 1989.

SUBRAMANIAM, Sivagami et al. Role of *Trichoderma* in plant growth promotion. **Advances in *Trichoderma* Biology for Agricultural Applications**, p. 257-280, 2022.

TYŚKIEWICZ, Renata et al. *Trichoderma*: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 4, p. 2329, 2022.

VINALE, F. et al. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Trichoderma asperellum*. **Natural Product Reports**, v. 25, n. 6, p. 1131-1138, 2008.

VINALE, Francesco et al. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. **Letters in applied microbiology**, v. 43, n. 2, p. 143-148, 2006.

WANG, Q. et al. **Chitosan-based coatings combined with *Trichoderma* volatiles for sustainable postharvest management of grape berries**. *Food Chemistry*, v. 405, p. 1-10, 2023.

WANG, Yaping et al. Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Botrytis cinerea* via transcriptome analysis of *Trichoderma harzianum* T4. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 3, p. 324, 2023. XU, Yu et al. Extracellular proteins of *Trichoderma guizhouense* elicit an immune response in maize (*Zea mays*) plants. **Plant and Soil**, v. 449, p. 133-149, 2020.

ZAFRA, German; CORTÉS-ESPINOSA, Diana V. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Trichoderma* species: a mini review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 19426-19433, 2015.

ZEILINGER, Susanne et al. Secondary metabolism in *Trichoderma*—chemistry meets genomics. **Fungal biology reviews**, v. 30, n. 2, p. 74-90, 2016.

ZHANG, X. et al. **Trichoderma atroviride** volatiles suppress postharvest apple rot caused by **Penicillium expansum** via direct inhibition and induced resistance. *Biological Control*, v. 163, p. 1-9, 2021.

ZHONG, J. et al. **Biocontrol potential of Bacillus velezensis HG-8-2** against postharvest anthracnose on chili pepper caused by *Colletotrichum scovillei*. *Food Microbiology*, v. 124, p. 104613, 2024.