

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

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Trichoderma* DA
RESTINGA DE GUAIBIM, BAHIA**

Lucas Souza Sales

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
JULHO - 2022**

DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Trichoderma* DA RESTINGA DE GUAIBIM, BAHIA

Lucas Souza Sales
Biólogo
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2022

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

Orientador: Prof. Dr. Phellippe Arthur Santos Marbach

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
JULHO - 2022**

FICHA CATALOGRÁFICA

S163d	<p>Sales, Lucas Souza. Diversidade de espécies de Trichoderma da restinga de Guaibim, Bahia: aprimorando a compreensão da diversidade de espécies do <i>Clado spirale</i> e descrição de duas novas espécies / Lucas Souza Sales._ Cruz das Almas, BA, 2022. 77f.; il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Ciências Agrárias.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Phellippe Arthur Santos Marbach.</p> <p>1.Fungos - Morfologia. 2.Fungos - Diversidade biológica. 3.Controle biológico - Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 579</p>
-------	--

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

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

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Trichoderma* DA RESTINGA
DE GUAIBIM, BAHIA**

Comissão examinadora da Defesa de Dissertação de

Lucas Souza Sales

Aprovada em 03 de agosto de 2022

Documento assinado digitalmente



PHÉLLIPPE ARTHUR SANTOS MARBACH

Data: 16/05/2023 16:15:47-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente



JORGE TEODORO DE SOUZA

Data: 10/05/2023 18:23:31-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente



CARLOS ANTONIO INACIO

Data: 10/05/2023 19:22:17-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Carlos Antonio Inácio
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Examinador Externo

“tem que acreditar.
Desde cedo a mãe da gente fala
assim:
'filho, por você ser preto, você tem que
ser duas vezes melhor.'
Aí passado alguns anos eu pensei:
Como fazer duas vezes melhor, se
você tá pelo menos cem vezes
atrasado pela escravidão, pela história,
pelo preconceito, pelos traumas, pelas
psicoses... por tudo que aconteceu?
duas vezes melhor como?
Ou melhora ou ser o melhor ou o pior
de uma vez.
E sempre foi assim.
Você vai escolher o que tiver mais
perto de você,
O que tiver dentro da sua realidade.
Você vai ser duas vezes melhor
como?
Quem inventou isso aí?
Quem foi o pilantra que inventou isso
aí?
Acorda pra vida rapaz”
(Racionais Mc's – **Introdução A vida é
um Desafio**)

AGRADECIMENTOS

Ao meu Pai (Josué Souza Sales), que sempre me deu bons conselhos, apoio moral e financeiro, nunca me deixou desamparado, buscando sempre me dar amor ao máximo, te amo coroa, nunca esqueça isso!

A minha rainha (Júcelia Fonseca Souza), que sempre se mantém preocupada comigo, tentando me mimar ao máximo, sempre me vendo como um menino indefeso, te amo mãe, você é a maior parte de mim.

Ao meu orientador, Phellippe Marbach, pela dedicação, paciência e incentivo ao longo dessa “jornada inesperada”.

Aos meus familiares e amigos que estão sempre ao meu lado.

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela formação;

A Capes e CNPq;

A toda equipe de estagiários do Laboratório de biologia Evolutiva;

A todos os professores que contribuíram para minha formação;

A todos que de alguma forma me ajudaram.

Obrigado a todos por todo o apoio, direto ou indiretamente.

DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Trichoderma* DA RESTINGA DE GUAIBIM, BAHIA

RESUMO GERAL

Em geral, os estudos sobre a diversidade biológica das restingas são limitados à fauna e flora e o conhecimento sobre a diversidade microbiana desse ecossistema é limitado a poucos estudos sobre fungos micorrízicos e leveduras. Devido às ações antrópicas e mudanças gradativas no ecossistema mundial, grupos taxonômicos estão sendo perdidos sem sequer serem conhecidas. O conhecimento sobre a diversidade fúngica do ecossistema Restinga é limitado, e esse é um dos ecossistemas brasileiros com maior degradação antropogênica. Uma das consequências da elevação do nível oceânico, devido às mudanças climáticas, será a perda de extensas áreas do ecossistema Restinga e conseqüentemente, de perda irreversível de diversidade biológica ainda desconhecida. Um dos principais grupos taxonômicos de fungos filamentosos presente neste ambiente, são os *Trichoderma*, gênero que possui espécies que podem desempenhar diferentes potenciais biotecnológicos. Associado a isso, a restinga, sendo uma formação única no território Brasileiro e tendo como características um bioma adverso, pode abrigar espécies com alto potencial adaptativo, conseqüentemente espécies que podem desempenhar novos potenciais biotecnológicos. Dessa forma, o objetivo desse estudo, foi descrever a nível de espécie, isolados oriundos da Restinga de Guaibim, Bahia, que estão depositados no Laboratório de Biologia Evolutiva da UFRB e posteriormente testar seus potenciais biotecnológicos.

Palavras – Chave: Biodiversidade, Restinga, *Trichoderma*

DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Trichoderma* DA RESTINGA DE GUAIBIM, BAHIA

ABSTRACT

In general, studies on the biological diversity of restingas are limited to fauna and flora and knowledge about the microbial diversity of this ecosystem is limited to few studies on mycorrhizal fungi and yeasts. Due to anthropic actions and gradual changes in the world ecosystem, taxonomic groups are being lost without even being known. Knowledge about the fungal diversity of the Restinga ecosystem is limited, and this is one of the Brazilian ecosystems with the highest anthropogenic degradation. One of the consequences of rising ocean levels, due to climate change, will be the loss of extensive areas of the Restinga ecosystem and, consequently, the irreversible loss of biological diversity still unknown. One of the main taxonomic groups of filamentous fungi present in this environment are the *Trichoderma*, a genus that has species that can play different biotechnological potentials. Associated with this, the restinga, being a unique formation in the Brazilian territory and having an adverse biome as characteristics, can harbor species with high adaptive potential, consequently species that can play new biotechnological potential. Thus, the objective of this study was to describe, at the species level, isolates from the Restinga de Guaibim, Bahia, which are deposited in the Evolutionary Biology Laboratory of UFRB and later test their biotechnological potential.

Keywords: Biodiversity, Restinga, *Trichoderma*

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Aprimorando a compreensão da diversidade de espécies do clado Spirale e descrição de duas novas espécies.

Tabela 1. Sequências e informações de isolados relativos identificados como *T. spirale* recuperados do NCBI e utilizados neste estudo.....33

Tabela 2. Caracteres contínuos e fenótipo de colônia de espécies de *Trichoderma* pertencentes ao clado Spirale.....43

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: Aprimorando a compreensão da diversidade de espécies do clado Spirale e descrição de duas novas espécies.

Figura 1. Dendrograma de isolados do gênero *Trichoderma* gerados a partir do marcador molecular BOX, demonstrando a diversidade genética que isolados de uma mesma espécie possuem.....32

Figura 2. Fragmentos das sequências do *tef1* depositados no NCBI de diferentes isolados relacionados com *T. spirale*. Em negrito isolado utilizado e descrito neste estudo.....34

Figura 3. Filogenia da melhor árvore de máxima verossimilhança revelada por RAxML a partir de uma análise do alinhamento da sequência do *tef1* relacionadas com *T. spirale*, grupo externo, *T. longisporum* e *T. hunanense*. MV acima de 50% (esquerda), PP acima de 80% (direita), indicada nos nós. Novas espécies e isolados deste estudo estão indicados em negrito. Para cada cor indicada na seção ASAP, constitui um táxon ou uma nova espécie, respectivamente, seus locais de isolamento e os trabalhos responsáveis indicados nos numerais (Tab.1)39.

Figura 4. Filogenias das melhores árvores de máxima verossimilhança revelada por RAxML a partir de uma análise de *tef1* RIII (6º exon), *tef1*, *rpb2* e *cal1*. Grupo externo, em *tef1* RIII, *rpb2* e concatenados, *T. longisporum* e *T. hunanense*, em *cal1*, *T. stramineum* e *T. velutinum*. MV acima de 50% (esquerda), PP acima de 80% (direita), indicado nos nós. Em *tef1* RIII, representação dos APG's presente na figura 3. Novas espécies propostas estão indicadas em negrito.....41

Figura 5. *Trichoderma gilbertensae* - 1–3 culturas incubadas em diferentes meios em 20 °C por 7 dia (1 em CMD, 2 em SNA, 3 em PDA), 4, 6 – 9 (CMD), 5, 10 – 18 (SNA) 6 – 8, 11 – 13 conidióforos e fiálides, 9, 14, 15 clamidósporos, 7, 10 conídios. 6, 11, 8, 10 barras = 2 µm, outras barras = 5 µm.....46

Figura 6. *Trichoderma rubropilosa* - 1–3 culturas incubadas em diferentes meios em 20 °C por 7 dias (1 em CMD, 2 em SNA, 3 em PDA), 4,5, 10 – 13 (CMD), 6 – 9 (SNA), 4 – 6, 8, 7, 13 conidióforos, fiálides e clamidósporos, 7, 10 conídios, 11,12 clamidósporos, 4, 6, 9, 13 barras = 5 µm, 5,7, 10 – 12 barras = 10 µm.....50

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Restinga.....	13
2.2 Taxonomia do gênero <i>Trichoderma</i>	14
2.3 Importância do gênero <i>Trichoderma</i>	16
3. REFERÊNCIAS.....	17
CAPÍTULO 1 - Aprimorando a compreensão da diversidade de espécies do clado Spirale e descrição de duas novas espécies.....	
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. MATERIAL DE MÉTODOS.....	29
2.1 Recuperação de sequências de <i>T. spirale</i>	29
2.2 Amplificação, sequenciamento e diversidade.....	30
2.3 Análises filogenéticas.....	30
2.4 Delimitação de espécies baseada em sequência.....	31
2.5 Caracterização Morfológica.....	31
3. RESULTADOS.....	31
3.1 Diversidade genética do isolados baseada em BOX-PCR.....	31
3.2 Caracterização das sequências <i>tef1</i> recuperadas.....	32
3.3 Filogenias e delimitação de supostas novas espécies pelo ASAP.....	33
3.4 Descrição de <i>Trichoderma gilgilbertensae</i> sp. nov e <i>Trichoderma rubropilosa</i> sp. nov.....	41
4.TAXONOMIA.....	44
5.DISSCUSSÃO.....	51
5.1 Diversidade genética.....	51
5.2 Fragmentos do <i>tef1</i> relacionados a <i>T. spirale</i>	52
5.3 APG's uma diversidade escondida.....	53
5.4 Adição de novas espécies ao clado Spirale.....	55
5.5 A importância da identificação correta para o uso biotecnológico.....	55
5.6 Os limites de <i>T. spirale</i>	57
5.7 Espécies escondidas.....	58
5.8 A falta de responsabilidade com os bancos de dados.....	59
6.CONCLUSÕES.....	60
7.REFERÊNCIAS	61

1.INTRODUÇÃO GERAL

O bioma restinga é um dos principais alvos da exploração antrópica devido a sua localização costeira (De Miranda et al., 2021; De Araújo e Da Costa, 2021; Caponi, 2022). A restinga é alvo constante da expansão imobiliária e degradação do meio ambiente, em virtude da remoção ilegal de areia e de vegetação nativa, além de possuir áreas que são utilizadas para depósitos de lixo e aberturas de trilhas para facilitar o acesso à praia (Vieira e Louzada, 2008).

Afim de amenizar o impacto causado pela ação antrópica, é necessário demonstrar a importância da biodiversidade endêmica do ecossistema restinga, promovendo dessa forma a criação de novas áreas de proteção e/ou melhorando as estratégias de preservação já existentes (Ribeiro et al., 2007).

A restinga é um ecossistema que abriga uma grande biodiversidade de espécies vegetais (Schneider et al., 2001; Martins et al., 2012; Rocha et al., 2005; Brunner et al., 2018), sendo parte dela endêmicas das restingas. De acordo com a base de dados Flora do Brasil 2020 (encurtador.com.br/diFPY) até o momento existe registro de 2459 espécies vegetais que ocorrem nas restingas do Brasil, sendo 1300 (52,8%) endêmicas do Brasil, e destas 321 (12,7%) são endêmicas das restingas. Além disso, algumas espécies presentes na restinga são oriundas de ecossistemas adjacentes à restinga durante a sua formação e não são mais encontradas em seus ecossistemas de origem (Narvaes et al., 2009; Martins et al., 2019).

A flora e fauna das restingas são amplamente conhecidas, em contraste, existe uma escassez de dados sobre a microbiota desse ambiente, e os poucos trabalhos são em sua maioria sobre fungos micorrizos e leveduras (Goi e Souza, 2012; Silva et al., 2013; Cordazzo e Stürmer, 2007; Cogliatti-Carvalho et al., 2001; Martins et al., 2019). Esse cenário vem sendo mudado, demonstrando que esse ecossistema apresenta também diversidade de novas espécies de fungos ascomicetos, tais como: *Penicillium reconvexovelosoi*, *Aspergillus bezerrae*, *P. guaibinense*, *P. restingae* (Andrade et al., 2014, 2018, 2019^a, 2019^b). Uma parte das espécies de fungos presente no solo, são os fungos filamentosos, que podem realizar mineração e degradação da matéria orgânica e inorgânica, de origem vegetal ou antrópica, proporcionando nutrientes para plantas e microrganismos presentes no solo (Bononi et al., 2020; Ding et al.,

2021; Zhu et al., 2022). Esse papel da comunidade de fungos filamentosos é particularmente importante, contudo, a diversidade de fungos filamentosos das restingas ainda é pouco conhecida.

Um dos principais grupos de fungos filamentosos responsáveis pela manutenção de nutrientes do solo pertencem ao gênero *Trichoderma*, que pode ser encontrado em diferentes *habitats*, como na matéria orgânica vegetal em decomposição e em plantas vivas como endofíticos (Carvalho et al., 2011; Patricio et al., 2001; Dashtban et al., 2010; Segarra et al., 2013; Van wees et al., 2008). As espécies de *Trichoderma* são utilizadas no biocontrole de fungos fitopatogênicos, doenças associadas a pragas agrícolas e promotores de crescimento de plantas, além de serem excelentes produtores de enzimas utilizadas nas indústrias farmacêuticas, têxtil e nas agroindústrias (Schuster e Schmoll, 2010). Atualmente são conhecidas mais de 390 espécies de *Trichoderma* MycoBank [Banco de dados] disponível em:(<https://www.mycobank.org/>). Contudo, segundo um amplo estudo realizada por HU et al., (2019) em ecossistemas chineses, a diversidade das espécies de *Trichoderma* é pelo menos o dobro.

Existe uma escassez de dados sobre diversidade genética e taxonômica do gênero *Trichoderma* nos ecossistemas brasileiros, dentre eles as restingas. Dessa forma este trabalho teve como objetivos estudar a diversidade genética e realizar a identificação molecular de isolados de *Trichoderma* oriundos da serapilheira da restinga de Guaibim, BA.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Restinga

A Resolução do CONAMA nº 303 de 20/03/2002 define restinga como

“depósito arenoso paralelo a linha da costa, de forma geralmente alongada, produzido por processos de sedimentação, onde se encontram diferentes comunidades que recebem influência marinha, também consideradas comunidades edáficas por dependerem mais da natureza do substrato do que do clima. A cobertura vegetal nas restingas ocorrem mosaico, e encontra-se em praias, cordões arenosos, dunas e depressões, apresentando, de acordo com o estágio sucessional, estrato herbáceo, arbustivos e arbóreo, este último mais interiorizado.” (DOU, 2002, Art. 2º, inciso VIII)

O ecossistema das restingas inicia sua formação no período Quaternário dentro do Holoceno, sendo dessa forma uma formação vegetal relativamente nova na escala geológica terrestre (Silva, 1999; Cerqueira, 2000). Além de seu ecossistema inato, a restinga também integra outros biomas, como a Mata Atlântica, que é conhecida como um dos maiores *hotspots* de biodiversidade do mundo (Tabarelli et al., 2006). As restingas detêm a presença de diferentes tipos de comunidades vegetais florísticas e fisionômicas, tendo presença de herbáceas, arbustivas e arbóreas, que recebem a influência marinha e podem apresentar cobertura vegetal em mosaico (Martins, 2012; Dias et al., 2008). O solo das restingas são pobres em nutrientes, tendo em sua composição essencialmente quartzo e espaços de bolsões de ar, dificultando o estabelecimento das plantas que necessitam exclusivamente do solo para adquirir nutrientes (Azevedo et al., 2014). Essa pouca disponibilidade de nutrientes, força as plantas a buscar nutrientes na atmosfera ou oriundos da vegetação morta que se deposita no solo de forma lenta (Azevedo et al., 2014). Devido a esses fatores limitantes presentes nesse ecossistema, as plantas tendem a cooperar com outros organismos presentes no solo, como fungos e bactérias que realizam a captação desses nutrientes, como o nitrogênio (N), ou outros nutrientes que auxiliam em seu desenvolvimento (Freire et al., 2016; de oliveira et al., 2009; Azevedo et al., 2014).

2.2 Taxonomia do gênero *Trichoderma*

As primeiras espécies de *Trichoderma* (*Ascomycota*, *Sordariomycetes*, *Hypocreomycetidae*, *Hypocreales*, *Hypocreaceae*) foram descritas por Christiaan Hendrik Persoon (*Pers.*) em 1794, sendo a mais conhecida até hoje e permanente no gênero *T. viride*.

O gênero *Hypocrea*, teleomorfo de *Trichoderma*, foi descrito por Elias Freis (*Fr.*) em 1825, baseado em amostras de *Sphaeria rufa* *Pers.* que o mesmo renomeou para *Hypocrea rufa* (*Pers.*) *Fr.* Mesmo sendo fases de vida diferentes de um mesmo organismo, nessa época ambos os gêneros não estavam relacionados e pouco se sabia das fases sexuais de espécies fúngicas. Somente 40 anos depois, em 1865, os irmãos Ludovicus Renatus Tulasne e Carolus Tulasne, demonstram que as espécies *T. viride* e *H. rufa*, eram uma única espécie em fases de vida diferentes. Após essa descoberta, dezenas de

espécies começaram a ser redescritas. Bisby em 1939, sugeriu reduzir todas as espécies do gênero a uma única espécie, sendo ela *T. viride*, devido à falta de caracteres confiáveis para distingui-las. A teoria de Bisby, se baseava no fato de ser morfológicamente impossível distinguir *H. rufa* de *H. gelatinosa* e que os isolados anamorfos eram variáveis morfológicamente entre si, levando-o a concluir que *Trichoderma/Hypocrea* eram gêneros monotipo e que *H. gelatinosa* era uma forma de crescimento diferente ou em um outro estágio morfológico de *H. rufa*. Em 1969, Rifai em sua monografia do gênero *Trichoderma* adotou o conceito de espécies agregadas e propôs a existência de nove agregados de espécies ou complexos de espécies. Posteriormente, Bissett (1984, 1991^a, 1991^b, 1991^c) revisou os agregados de espécies proposto por Rifai, analisando a macro e micromorfologia, dividiu o gênero em cinco seções: *Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Trichoderma*, *Saturnisporum*, *Hypocreanum* e algumas linhagens solitárias, defendendo a existência de 27 espécies morfológicas. Com o advento das ferramentas de biologia molecular nos anos 90, os estudos sobre a diversidade de *Trichoderma*, tiveram novas mudanças. Os resultados obtidos por estudos de diversidade genética da época, utilizando marcadores moleculares eram incongruentes com a taxonomia vigente. Diversos estudos demonstravam que algumas espécies estavam em um estado de polifília ou que eram espécies sinônimos (Fujimori e Okuda, 1994). Contudo, tais questões foram elucidadas utilizando outras ferramentas moleculares de maior precisão, como a classificação de *T. reesei* que por muito tempo foi considerado por Rifai (1969) e Bissett (1984) *T. longibrachiatum*. Porém, após Mayer et al., (1992) demonstrar por meio de análises moleculares que *T. reesei* não era sinônimo de *T. longibrachiatum*, mudou drasticamente as pesquisas futuras sobre celulasas fúngicas tendo como a principal espécie *T. reesei*.

Inicialmente as primeiras filogenias moleculares do gênero *Trichoderma*, foram realizadas utilizando sequências das regiões espaçadoras internas transcritas 1 e 2 (ITS1 e ITS2), pertencentes ao operon dos RNAs ribossomais e o gene codificador do RNA ribossomal 5.8S. Contudo, as filogenias provenientes das regiões ITS1 e ITS2 não possuem suporte estatístico suficiente para delimitar algumas espécies, indicando que esse conjunto genético possuía pouca resolução dentro deste gênero. (Kuhls et al., 1997; Kindermann et al., 1998; Kullnig-gradinger et al., 2002). Dessa forma, outras regiões genômicas

foram acrescentadas nas análises filogenéticas afim de obter uma delimitação interespecífica e possibilitando uma maior compreensão e identificação sobre os clados e espécies desse gênero.

Assim, outras regiões genômicas passaram a ser usadas para elucidar as relações filogenéticas entre as espécies de *Trichoderma*, como o RNA 18S e 28S, *tef1*, actina (*act*), calmodulina (*cal1*), entre outras (Kullnig-gradinger et al., 2002; Chaverri et al., 2003; Druzhinina et al., 2005). Dentre estas novas marcas moleculares o *tef1* era a que possuía uma maior resolução filogenética, portanto passou a ser reconhecida como o DNA *barcode* desse gênero (Jaklitsch, 2009, 2011, 2015; Chaverri et al., 2015; Kubicek et al., 2008).

Atualmente o uso da filogenia molecular na distinção de espécies é particularmente importante no gênero *Trichoderma*, fazendo-se necessário uma concordância genealógica de genes não ligados para obter uma compreensão de espécie única, seja ela nova ou existente, pois existem grandes complexos de espécies crípticas, ou seja, impossíveis de serem distinguidas morfologicamente (Chaverri et al., 2015; Druzhinina et al., 2010; Samuels et al., 2010; Kubicek et al., 2008). Seguindo as diretrizes do Código Internacional de Nomenclatura (ICN) para algas, fungos e plantas (Código de Melbourne, Art. 14.13), 254 nomes de espécies de *Trichoderma* foram aceitos em 2015 (Bissett et al., 2015). Atualmente, são reconhecidas mais de 390 espécies de *Trichoderma* e esse número pode ser ainda maior nos próximos anos (Hu et al., 2019).

2.3 Importância do gênero *Trichoderma*

Os fungos são utilizados de diferentes formas pelas indústrias, como alimento, promotores de crescimento em plantas e outros fungos, produtores de enzimas e no controle biológico contra pragas (Chambergo e Valencia, 2016). As espécies do gênero *Trichoderma*, estão associados ou desempenham todas essas funções, além de serem um dos maiores produtores de enzimas (Orlandelli et al., 2012). Além disso, muitas espécies de *Trichoderma* estão diretamente associadas a produção de fármacos, comidas, tecidos, tintas e etanol. (Carvalho filho et al., 2008; Song et al., 2019; Jia et al., 2019; Silva et al., 2019). Algumas espécies de *Trichoderma* podem possuir imunossupressores que regulam as respostas das células T, esse mecanismo de

ação quando utilizado e bem sucedido pode auxiliar em diferentes quadros clínicos, como doenças reumáticas, esquizofrenias, diabetes e em transplantes de órgãos (Kunii et al., 2019; Moon et al., 2019; Utine et al., 2019).

Enzimas como quitinase, xilase e outras celulases que possuem aplicações industriais, são comumente produzidas por espécies de *Trichoderma* como: *T. harzianum*, *T. viride*, *T. virens*, *T. reesei*, *T. asperellum*, entre outras (Felse et al., 1999; Liu et al., 2006; Abd-aziz et al., 2008; Li et al., 2019). Espécies de *Trichoderma* também são usadas como agente de biocontrole contra fungos fitopatogênicos como *Fusarium oxysporum*, responsável por causar a murcha ou amarelecimento em plantas, e *Sclerotinia sclerotiorum* causadora do mofo branco em soja (Poveda, 2021; Da Silva et al., 2021). Além disso, espécies de *Trichoderma* são utilizadas no biocontrole de nematódeos (Ferreira et al., 2008; Nafady et al., 2022).

Devido a sua importância básica e aplicada existe um esforço sistemático da comunidade científica em estudar e explorar a diversidade taxonômica de *Trichoderma* e nos últimos cinco anos foram descritas mais de 200 novas espécies desse gênero (Qiao et al., 2018). Contudo, ainda existe uma escassez de dados sobre diversidade genética e taxonômica do gênero *Trichoderma* nos ecossistemas brasileiros, dentre eles as restingas.

3. REFERÊNCIAS

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

ANDRADE, J. P. et al., *Aspergillus bezerrae*. **Persoonia**, v. 42, p. 378-379, 2019^b.

ANDRADE, J. P. et al., *Penicillium guaibinense*. **Persoonia**, v. 41, p. 388-389, 2018.

ANDRADE, J. P. et al., *Penicillium reconvexovelosoi*. **Persoonia**, v. 43, p. 382-383, 2019^a.

ANDRADE, J. P. et al., *Penicillium restingae*. **Persoonia**, v. 32, p. 292-293, 2014.

BISBY, G. R. *Trichoderma viride* Pers. ex Fries, and notes on *Hypocrea*.

Transactions of the British Mycological Society, v. 23, n. 2, p. 149-168, 1939.
BISSETT, John et al., Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. **IMA fungus**, v. 6, n. 2, p. 263-295, 2015.

BISSETT, John et al., Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. **IMA fungus**, v. 6, n. 2, p. 263-295, 2015.

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

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

BISSETT, John. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. **Canadian journal of botany**, v. 69, n. 11, p. 2373-2417, 1991.^b

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

BONONI, Laura et al., Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.

BRUNNER, Ivano et al., Ability of fungi isolated from plastic debris floating in the shoreline of a lake to degrade plastics. **PLoS one**, v. 13, n. 8, p. e0202047, 2018.

CAPONI, Vincenzo. The economic and environmental effects of seasonality of tourism: A look at solid waste. **Ecological Economics**, v. 192, p. 107262, 2022.

CARVALHO FILHO, M. R. et al., Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético in vitro e colonização endofítica de mudas de eucalipto. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2008.

CARVALHO, Daniel DC et al., Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Embrapa Arroz e Feijão-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2011.

CERQUEIRA, Rui. Biogeografia das restingas. **Ecologia de restingas e lagoas**

costeiras, v. 1, p. 65-75, 2000.

CHAMBERGO, Felipe S.; VALENCIA, Estela Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2567-2577, 2016.

CHAVERRI, Priscila et al., Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 27, n. 2, p. 302-313, 2003.

CHAVERRI, Priscila 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.

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

COGLIATTI-CARVALHO, LUCIANA et al., Variação na estrutura e na composição de *Bromeliaceae* em cinco zonas de restinga no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Macaé, RJ. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 1, p. 1-9, 2001.

CORDAZZO, César Vieira; STURMER, Sidney Luiz. Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em *Panicum racemosum* (*p. beauv.*) spreng (*poaceae*) em dunas costeiras do extremo sul do Brasil. **Atlântica (Rio Grande)**, v. 29, n. 1, p. 65-68, 2007.

DA SILVA, Lincon Rafael et al., Mycelial Inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma* spp. Volatile Organic Compounds in Distinct Stages of Development. **Pakistan journal of biological sciences: PJBS**, v. 24, n. 4, p. 527-536, 2021.

DASHTBAN, Mehdi et al., Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. **Critical reviews in biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 302-309, 2010.

DE ARAÚJO, Maria Christina Barbosa; DA COSTA, Monica Ferreira. Cigarette butts in beach litter: Snapshot of a summer holiday. **Marine Pollution Bulletin**, v. 172, p. 112858, 2021.

DE MIRANDA, Danubia Rafaela Costa et al., Evaluation of the environmental

perception of the users over solid residues on the beach of Tamandaré/Brazil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 13, p. e591101319997-e591101319997, 2021.

DING, M.-Y. et al., Emerging salt marshes as a source of *Trichoderma arenarium* sp. nov. and other fungal bioeffectors for biosaline agriculture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 1, p. 179-195, 2021.

DRUZHININA, Irina S. et al., An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 10, p. 813-828, 2005.

DRUZHININA, Irina S. et al., The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, p. 94, 2010.

FELSE, P. Arthur; PANDA, T. Self-directing optimization of parameters for extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in batch mode. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 6-7, p. 563-566, 1999.

FERREIRA, Paulo Afonso et al., Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. **Revista Trópica—Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 2, n. 3, p. 15-21, 2008.

FRIES, E. Systema orbis vegetabilis. **Typographia academica**, 1825.

FUJIMORI, F.; OKUDA, T. Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbial screening. **The Journal of antibiotics**, v. 47, n. 2, p. 173-182, 1994.

GOI, Silvia Regina; SOUZA, Francisco A. de. Diversidade de microrganismos do solo. **Floresta e Ambiente**, v. 13, n. 2, p. 46-65, 2012.

HU, Jindong et al., Large-scale *Trichoderma* diversity was associated with ecosystem, climate and geographic location. **Environmental microbiology**, 2019.

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

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

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

JIA, Mengyun et al., Structural characteristics and functional properties of soluble dietary fiber from defatted rice bran obtained through *Trichoderma viride* fermentation. **Food Hydrocolloids**, v. 94, p. 468-474, 2019.

KINDERMANN, J. et al., Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA cluster. Academic Press Inc, v. 24, p. 298-309, 1998.

KUBICEK, Christian P.; KOMON-ZELAZOWSKA, Monika; DRUZHININA, Irina S. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 10, p. 753, 2008.

KUHLS, K. et al., Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. **Mycologia**, v. 89, n. 3, p. 442-460, 1997.

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.

KUNII, Yasuto et al., Differential protein expression of DARPP-32 versus Calcineurin in the prefrontal cortex and nucleus accumbens in schizophrenia and bipolar disorder. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

KUNII, Yasuto et al., Differential protein expression of DARPP-32 versus Calcineurin in the prefrontal cortex and nucleus accumbens in schizophrenia and bipolar disorder. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

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

LIU, Jia et al., Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2347-2351, 2006.

MARTINS, M. L. L. et al., Vegetation type of the sand coastal plains of the Environmental Protection Area (APA) of Guaibim, Valença, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 1, p. 66-73, 2012.

MEYER, R. J. Mitochondrial DNAs and plasmids as taxonomic characteristics in *Trichoderma viride*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 2269-2276, 1991.

MOON, Daeun; KIM, Jinu. Cyclosporin A aggravates hydrogen peroxide-induced cell death in kidney proximal tubule epithelial cells. **Anatomy & cell biology**, v. 52, n. 3, p. 312-323, 2019.

NAFADY, Nivien A. et al., Effective and Promising Strategy in Management of Tomato Root-Knot Nematodes by *Trichoderma harzianum* and Arbuscular Mycorrhizae. **Agronomy**, v. 12, n. 2, p. 315, 2022.

ORLANDELLI, Ravelly Casarotti et al., Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, 2012.

PATRICIO, Flávia RA; KIMATI, Hiroshi; BARROS, Benedito C. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonísticos a *Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, v. 27, n. 2, p. 223-229, 2001.

PERSOON, Ch H. Neuer Versuch einer systematischen Eintheilung der Schwämme. **Neues Magazin für die Botanik**, v. 1, p. 63-128, 1794.

POVEDA, Jorge. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceri and *Ascochyta rabiei* infecting protected geographical indication Fuentesauco-Chickpea by *Trichoderma* species. **European Journal of Plant Pathology**, v. 160, n. 4, p. 825-840, 2021.

QIAO, Min et al., Three new species of soil-inhabiting *Trichoderma* from southwest China. **MycoKeys**, n. 44, p. 63, 2018.

QIN, Wen-Tao; ZHUANG, Wen-Ying. Seven new species of *Trichoderma* (*Hypocreales*) in the *Harzianum* and *Strictipile* clades. **Phytotaxa**, v. 305, n. 3, p. 121-139, 2017.

RIBEIRO, CARLOS ANTONIO ALVARES SOARES et al., Delimitação automática de APPs: uma verdade inconveniente. **Criação de Capa: Armando de Lima Sardinha Imagem da Capa: Clayton Ferreira Lino**, p. 43, 2007.

RIFAI, M. A. A revision of the genus *Trichoclerma*. **Mycol. Pap.** 116: 1-56. 1969.

ROCHA, CF D. et al., Endemic and threatened tetrapods in the restingas of the biodiversity corridors of Serra do Mar and of the Central da Mata Atlântica in eastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, n. 1, p. 159-168, 2005.

SAMUELS, Gary J. et al., *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. **Mycologia**, v. 102, n. 4, p. 944-966, 2010.

SAMUELS, Gary J. et al., *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. **Mycologia**, v. 102, n. 4, p. 944-966, 2010.

SCHNEIDER, José Alberto P.; TEIXEIRA, Rogério L. Relacionamento entre anfíbios anuros e bromélias da restinga de Regência, Linhares, Espírito Santo, Brasil. **Iheringia**, v. 91, p. 41-48, 2001.

SCHUSTER, André; SCHMOLL, Monika. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787-799, 2010.

SEGARRA, Guillem et al., Effectiveness of biological control of *Phytophthora capsici* in pepper by *Trichoderma asperellum* strain T34. **Phytopathologia Mediterranea**, p. 77-83, 2013.

SILVA, Cristiane Figueira da et al., Fauna edáfica em área periodicamente inundável na restinga da Marambaia, RJ. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, n. 3, p. 587-595, 2013.

SILVA, Roberto N. et al., *Trichoderma*/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. **Fungal biology**, v. 123, n. 8, p. 565-583, 2019.

SILVA, SANDRO MENEZES. Diagnóstico das restingas no Brasil. **Avaliação e**

ações prioritárias para a conservação da zona costeira e marinha, 1999.

SONG, Yin-Ping et al., Nitrogenous cyclonerane sesquiterpenes from an algicolous strain of *Trichoderma asperellum*. **Organic Chemistry Frontiers**, v. 6, n. 21, p. 3698-3704, 2019.

TABARELLI, Marcelo; MELO, M. D. V. C.; LIRA, O. C. A Mata Atlântica do nordeste. **Rio de Janeiro: MMA**, 2006.

UTINE, Canan Asli; STERN, Michael; AKPEK, Esen Karamursel. Immunopathological features of severe chronic atopic keratoconjunctivitis and effects of topical cyclosporine treatment. **Ocular immunology and inflammation**, v. 27, n. 7, p. 1184-1193, 2019

VAN WEES, Saskia CM; VAN DER ENT, Sjoerd; PIETERSE, Corne MJ. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 4, p. 443-448, 2008.

VIEIRA, Letícia; LOUZADA, Júlio NC; SPECTOR, Sacha. Effects of degradation and replacement of Southern Brazilian coastal sandy vegetation on the dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae). **Biotropica**, v. 40, n. 6, p. 719-727, 2008.

ZHU, Lixia et al., Trichoderma Bio-Fertilizer Decreased C Mineralization in Aggregates on the Southern North China Plain. **Agriculture**, v. 12, n. 7, p. 1001, 2022.

CAPÍTULO 1

APRIMORANDO A COMPREENSÃO DA DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DO CLADO SPIRALE E DESCRIÇÃO DE DUAS NOVAS ESPÉCIES

Resumo: Durante um levantamento do gênero *Trichoderma* no ecossistema de restinga brasileiro, encontramos 22 isolados relacionados a *Trichoderma spirale* com base nas identidades de *tef1* o marcador molecular utilizado para discriminar espécies deste gênero. Bisset descreveu *T. spirale* em 1991, desde então apenas quatro espécies filogeneticamente relacionadas a eles foram descritas e foram agrupadas no clado Spirale. Isso pode indicar que essa linhagem taxonômica é pouco amostrada em nível de espécie, no entanto, as sequências *tef1* atribuídas a *T. spirale* em bancos de dados públicos variam de 93,5% a 100% de identidade com a *tef1* do tipo desta espécie. Esses isolados são originários da Europa, Ásia, América do Sul, Central e do Norte, sugerindo que *T. spirale* é uma espécie amplamente distribuída em todo o mundo ou que essas sequências *tef1* representam novas espécies ocultas filogeneticamente relacionadas ao clado Spirale. Nossos resultados indicam que a maioria dessas sequências de *tef1* representam 12 novas prováveis espécies escondidas do clado Spirale delimitadas a partir do alinhamento de *tef1* usando ASAP. Aqui, dois deles são descritos como *Trichoderma gilbertensae* sp. nov. e *Trichoderma rubropilosa* sp. nov. baseado na abordagem polifásica.

Palavras-chaves: Fungos; Restinga; Taxonomia; filogenia; Controle biológico, Compostos voláteis.

IMPROVING UNDERSTANDING OF THE SPECIES DIVERSITY OF CLADE SPIRALE AND DESCRIPTION OF TWO NEW SPECIES

Abstract: During a survey of the genus *Trichoderma* in the Brazilian ecosystem restinga, we found 22 isolates related to *Trichoderma spirale* based on identities of *tef1* the molecular marker used to discriminate species of this genus. Bisset described *Trichoderma spirale* in 1991, since then only four species phylogenetically related to them were described and they were grouped into the *Spirale* Clade. It could indicate that this taxonomic lineage is poorly sampled at species level, however, the *tef1* sequences assigned to *T. spirale* at public databases range from 93,5% to 100% identity to the *tef1* of the type of this species. These isolates are originated from Europe, Asia, South, Central and North America, suggesting that *T. spirale* is a highly diverse worldwide-distributed species or these *tef1* sequences represent new hidden species phylogenetically related to the *spirale* Clade. We present results indicating that most of these *tef1* sequences represent 12 new hidden putative species from the *Spirale* clade delimited from the *tef1* alignment using ASAP. Here, two of them are described as *Trichoderma gilbertensae* sp. nov. and *Trichoderma rubropilosa* sp. nov. based on polyphasic approach

Keywords: Fungi; Restinga; Taxonomy; Phylogenetic; Biological Control; volatile compounds

1. INTRODUÇÃO

Trichoderma spirale foi descrito por Bissett em 1991 em uma revisão da seção *Pachybasium*. O tipo da espécie foi isolado do solo da Tailândia e a característica morfológica mais marcante dessa espécie é seu principal eixo de conidióforos em espiral com seu alongamento apical estéril sem ramos férteis perto do ápice. Devido a essa característica Bissett cunhou o epíteto dessa espécie de *spirale*. Mais tarde, Chaverri et al., (2003) reescreveu essa espécie analisando além da sua morfologia, sua filogenia e fisiologia. As espécies novas descritas nesse estudo, diferem das espécies de *T. spirale* já descritas na literatura: Pela ausência do conidióforo prolongado e estéril, maior variação de conídios e na amplitude de crescimento.

T. spirale foi considerado uma linhagem solitária até recentemente, quando Chen e Zhuang (2017) descreveram, *Trichoderma Hunanense* e *Trichoderma longisporum*. Estas espécies são filogeneticamente distantemente relacionadas com *T. spirale*, contudo, elas foram agrupadas no clado Spirale baseado na combinação filogenética dos genes *rpb2* e *tef1*. De acordo com a topologia da árvore filogenética este novo grupo taxonômico era monofilético e basal entre as espécies do clado *Green-spored* das espécies de *Trichoderma*, indicando que esse táxon é uma linhagem primitiva dentro deste grupo (Chen e Zhuang 2017). Segundo Chen e Zhuang (2017) as espécies desse clado distinguem das demais espécies de *Trichoderma* verdes pela presença de pústulas com prolongações de hifas e conidióforos sinuosos e estéreis e/ou poucas vezes ramificadas, presença de conídios elipsoidais e produção de pigmento amarelo no meio de cultura.

Em 2021, Zheng et al., (2021) descreveram duas novas espécies, *Trichoderma subuliforme* e *Trichoderma subazureum*, que foram incluídas no clado Spirale. Contudo a topologia da árvore filogenética combinada de *rpb2* e *tef1* destas espécies mostra três ramos não relacionados filogeneticamente, um clado contendo *T. hunanense* e *T. longisporum*, um clado contendo *Trichoderma subuliforme* e *T. spirale* e *Trichoderma subazureum* como uma linhagem solitária. Este resultado indica que o clado Spirale é polifilético e a posição taxonômica das espécies desse clado é incerta. Adicionalmente, *T. subuliforme* e *T. subazureum*, possuem características morfológicas que diferem de *T. spirale*,

como diferenças na taxa de crescimento e diferentes padrões de conidióforos e hifas ao comparar com *T. spirale*, como demonstrado por Zheng et al., (2021).

Em 2017, Jang et al., fizeram o registro de ocorrência de *T. spirale* na Coreia do Sul. O isolado foi coletado do solo, assim como o tipo de *T. spirale*, e esse é o único registro de ocorrência dessa espécie que inclui filogenia com *tef1* e descrição morfológica e é coerente com a descrição dessa espécie. Outros isolados identificados como *T. spirale* já foram descritos como endofíticos em *Pinus radiata*, *Theobroma cacao*, *Coffea canefora* e *Coffea arabica* (Tabela 1) ou produtores de biomoléculas de interesse industrial como β -1,3-glucanase e quitinase, compostos voláteis úteis no biocontrole de fitopatógenos e compostos antitumorais como o tirosol e o ácido tricodêmico, indicando que essa espécie possui relevância biotecnológica (BAILEY et al., 2008; Kamala et al., 2015; Baiyee et al., 2019; Li et al., 2012; Li et al., 2019). Em geral, a identificação desse isolados foi feita com pouca precisão, seja por filogenia molecular de um único gene ou por comparação da sequência de nucleotídeos de marcadores moleculares, como ITS ou *tef1*, com o tipo de *T. spirale*.

O *tef1* é o marcador molecular com maior resolução para discriminar espécies de *Trichoderma* e a identidade do *tef1* de alguns isolados com o tipo de *T. spirale* é de apenas 93%. Além disso, estes isolados são oriundos de diferentes ambientes e continentes como Europa, Ásia, América do Sul e Central e do Norte (Tab. 1). Isto sugere que *T. spirale* é uma espécie com distribuição mundial e grande diversidade genética ou que estas sequências de nucleotídeos são oriundas de isolados que representam espécies não descritas e relacionadas filogeneticamente com *T. spirale*. Nosso grupo de pesquisa estuda sistematicamente a diversidade de fungos filamentosos celulolíticos no ecossistema brasileiro restinga e durante um levantamento desta comunidade fúngica na restinga de Guaibim, BA encontramos 22 isolados de *Trichoderma* filogeneticamente relacionados com *T. spirale*. Neste estudo investigamos as relações evolutivas e padrões de distribuição biogeográficos dos nossos isolados com os isolados previamente identificados como *T. spirale* e com sequências nucleotídicas de *tef1* disponíveis em bases de dados públicas. Nossos resultados indicam que a maioria desses isolados estão identificados incorretamente e representam até 10 espécies filogeneticamente relacionadas com *T. spirale*, a caracterização, morfológica, fisiológica e filogenética de duas

delas, *Trichoderma gilbertensae* sp. nov. e *Trichoderma rubropilosa* sp. nov. são relatadas.

2. MATERIAL DE MÉTODOS

Os isolados de *Trichoderma* foram obtidos de quatro amostras de serrapilheira coletadas no período de 28 de agosto de 2012 na restinga da Área de Proteção Ambiental de Guaibim, BA (13° 16' 10"S 38° 57' 33" W). As amostras foram denominadas de Mata Norte (MTN), Mata Sul (MTS), Moita Norte (MON) e Moita Sul (MOS). As amostras foram armazenadas a 4°C antes do isolamento dos fungos. O volume de 500 µL da diluição 10⁻³ preparada a partir de 25g de cada amostra de serrapilheira foi espalhado em placas de Petri de 15 cm de diâmetro contendo ágar, suplementado com 100 mg/L de cloranfenicol, meio de cultura seletivo para fungos celulolíticos e incubadas a 25°C. Após 4-5 dias as colônias de *Trichoderma* foram transferidas para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo ágar extrato de malte e incubadas a 25°C. Plugs de 5mm de diâmetro das colônias com 4 dias de crescimento foram transferidas para tubo de 2,0 mL contendo 1,0 mL de salina e agitado vigorosamente. O volume de 100 µL da diluição 10⁻⁵ desta amostra foi espalhada em placas de Petri de 9 cm contendo ágar extrato de malte e incubadas a 25°C. Após 24 horas uma micro colônia de cada isolado foi transferida para placas de Petri de 9 cm contendo ágar extrato de malte e incubadas por 7 dias a 25°C e conservadas pelo método de Castellani. As amostras foram identificadas e incorporada ao acervo de culturas microbianas do Laboratório de Biologia Evolutiva (LABEV) na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). O *Trichoderma spirale* strain 49 foi isolado do ninho de formigas-cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa*) por Rocha et al, (2017) e gentilmente cedido pelo mesmo.

2.1 Recuperação de sequências de *T. spirale*

Todas as sequencias de nucleotídeos do gene *tef1* depositadas e identificadas como *T. hunanense*, *T. longisporum* e *T. spirale*, *T. subuliforme* e *T. subazureum* foram recuperadas do NCBI. Em seguida foram recuperadas todas as sequencias de nucleotídeos do *tef1* de todos os isolados do gênero *Trichoderma* para utilização em uma filogenia prévia. Posteriormente foram recuperadas todas as sequências remanescentes relacionadas ao clado Spirale. Por fim foram

recuperadas as sequências do gene *rpb2* e *cal1* disponíveis dos isolados que possuíam *tef1* que são relacionados ao clado Spirale.

2.2 Amplificação, sequenciamento e diversidade

A extração de DNA dos isolados foi realizada utilizando o protocolo CTAB com modificações (Doyle 1990). A amplificação dos genes *rpb2*, *tef1* e *cal1* foram realizados utilizando os iniciadores fRPB2-5F, fRPB2_7cR., F- TEF1-728 F, TEF1LLErev e CAL 228 F, CAL 737 R as reações e programações foram seguidas e adaptadas conforme (Carbone e Kohn 1999; Liu et al., 1999; Jaklitsch e Voglmayr 2015; Druzhinina et al., 2005) Os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit comercial *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit GE Healthcare* e sequenciados pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. As sequências foram editadas no programa DNA Dragon 1.1.9.1. Para a análise de variabilidade genética foi utilizada a técnica Rep-PCR, baseado na amplificação DNA de elementos BOX PCR utilizando o *primer* BOXA 1R (Lee e Wong 2009). O programa P.A.S.T versão 3.20, foi utilizado para construção do dendrograma empregando o coeficiente de Jaccard e o método Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA).

2.3 Análises filogenéticas

Os alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos foram feitos no programa MAFFT (Kato et al., 2019) e editados manualmente no programa MEGA 6.0 e 11 (Tamura et al., 2013). Os melhores modelos evolutivos foram determinados pelo programa *JmodelTest* 2.1.6, utilizando o modelo de seleção *corrected akaike information criterion* (AICc) do *JmodelTest2* foi determinado que para o conjunto de dados do *tef1* (fig. 3) o modelo HKY+G, para o *tef1* e *rpb2* (fig. 4) o modelo GTR+I+G e para a *cal1* K80+G. As análises filogenéticas foram realizadas na plataforma CIPRES, utilizando o arquivo de entrada tipo NEXUS para todos os conjuntos de dados, esses arquivos foram convertidos em *relaxed Phylip*, para análises no RAxML on XSEDE, utilizando o modelo GTRGAMMA com 1000 *bootstraps* obtendo a melhor árvore de Máxima Verossimilhança (MV). As inferências Bayesianas foram realizadas utilizando o MrBayes 3.2. usando Monte Carlo de cadeia de Markov (MCMC). Foram utilizadas quatro cadeias MCMC, uma fria e três quentes, executando um milhão de gerações, com

amostragens a cada mil gerações. Para fase de queima, foram excluídas 25% das primeiras árvores, e os valores de probabilidade posterior (PP) foram estimados pelos 75% de árvores remanescentes. As árvores foram visualizadas no FigTree v1.4.4 e editadas no CorelDraw 2020.

2.4 Delimitação de espécies baseada em sequência

Para a delimitação das espécies, foi utilizado o ASAP (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/>) um novo método para construir partições de espécies a partir de alinhamentos de sequências de locus únicos, inferindo dessa forma prováveis distâncias entre espécies próximas (Puillandre et al., 2020.)

2.5 Caracterização Morfológica

As análises morfológicas foram realizadas em triplicada de três repetições, utilizando os meios Corn Meal Agar Destrose (CMD), Sintético Nutriente-Ágar (SNA) e Batata Dextrose Ágar (BDA) em uma temperatura de 20 e 25 °C por 14 dias, em placa de plástico com 20 ml de meios de cultura. A inoculação foi realizada utilizando suspensão de esporos de 1 ml de ágar-água e retirado 3 µl para inoculação. Nesse período foram analisadas todas as características macros e microscópicas. A foto documentação foi feita com o microscópico Zeiss Imager A2 AXIO e câmera Canon T6i. A taxa de crescimento e as temperaturas foram determinadas segundo Samuels et al., (2002) e Chaverri (2003). Os isolados de *Trichoderma* foram inoculados nos meios de cultura BDA e SNA (Nirenberg, 1976) e CMD e cultivados nas temperaturas 15, 20, 25, 30 e 35°C por 72hs com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Este experimento foi repetido seis vezes.

3 RESULTADOS

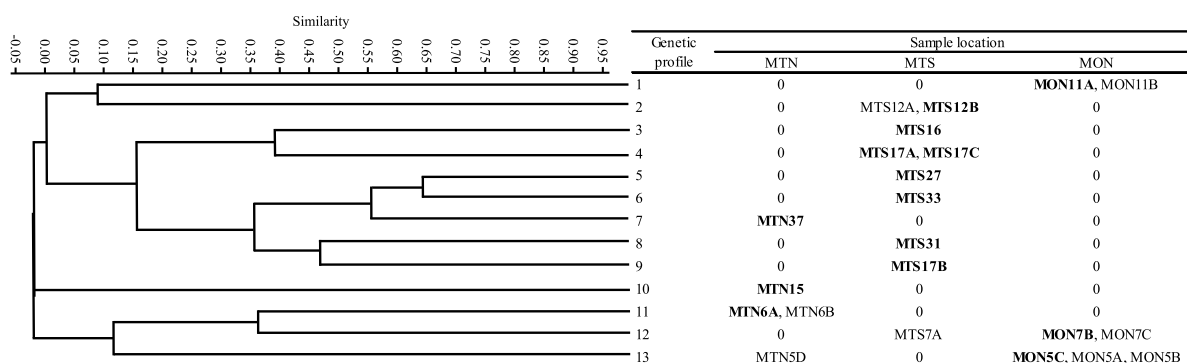
3.1 Diversidade genética do isolados baseada em BOX-PCR

Foram obtidos 88 isolados de *Trichoderma* durante os procedimentos de isolamento, que foram agrupados em 13 perfis genéticos pelo BOX-PCR. O *tef1* de pelo menos um isolado de cada perfil genético foi sequenciado e usado em uma blast search que mostrou que isolados de 13 perfis genéticos diferentes (um total de 22 isolados) eram closely related to *T. spirale*. Eles foram encontrados

em três das quatro amostras de serrapilheira analisadas, cinco isolados na amostra Mata Norte (MTN), 10 isolados na Mata Sul (MTS) e sete isolados na Moita Norte (MON).

O número de marcas moleculares obtidas por isolados variou entre 5 e 7 com tamanho variando de ~200 bp a 1250 bp, sendo 23 delas polimórficas (Fig. 1). Os isolados ficaram distribuídos em 13 perfis genéticos (PG) distintos: 1 PG representado por 4 isolados, 1 PG por 3 isolados, 4 PG's por 2 isolados e 7 PG's representados por apenas um isolado (Figura 1). Apenas dois PG's genéticos continham isolados oriundos de amostras diferentes, o PG 1, com um isolado da MTN e três isolados da MON e o PG 2, com um isolado da MTS e dois isolados da MON (Figura 1). Os demais PG's continham isolados de apenas uma amostra.

Figura 1 - Dendrograma de isolados do gênero *Trichoderma* gerados a partir do marcador molecular BOX, demonstrando a diversidade genética que isolados de uma mesma espécie possuem.



3.2 Caracterização das sequências *tef1* recuperadas

Foram recuperadas 88 sequências de *tef1* de 86 isolados relacionados com as espécies do clado *Spirale*, oitenta identificados como *T. spirale*, um identificado como *T. minutisporum*, um identificado como *T. lixii*, um identificado como *Trichoderma asymmetricum* e um sem identificação em nível de espécie. Trinta e três isolados também tinham sequências de nucleotídeos do *rpb2* e 11 de *cal1* disponíveis (Tab. 1). Nós dividimos o gene *tef1* em três regiões a fim de facilitar a compreensão da análise da representatividade das sequências de *tef1* recuperadas. A região I (RI) vai do primeiro éxon até o fim do quarto éxon, a região II (RII) do início do quarto até o fim do quinto íntron e a região III (RIII) contém apenas o sexto éxon (Fig. 2). O tamanho das sequências de *tef1*

recuperadas variou de 141 a 1554 nucleotídeos, elas representam regiões diferentes do gene e a identidade delas com o *tef1* do tipo de *T. spirale* variou de 93,51 a 100,0%. A maior parte das regiões I, II e III (>50%) estão representadas em 6, 81 e 14 das sequências recuperadas, respectivamente (Fig. 2) Seis sequências contém a maior parte das regiões I e II e 9 sequências a maior parte das regiões II e III (Fig. 2). A região II está representada na maioria das sequências recuperadas, ela inclui o quarto e o quinto íntrons e é a região mais variável do *tef1*. Os *tef1*'s do isolado *T. spirale* ITCC-7276 contém apenas a RIII e não tem sobreposição com a maioria das sequências dos *tef1* recuperados (Fig. 2). O *tef1* do isolado *T. spirale*. NBT 75 (AJ563623.1) e do *tef1* de *T. spirale* CBS 346.93 (AF401018.1) não incluem a maior parte de nenhuma das regiões do *tef1* (Fig. 2). Todos os *tef1* dos nossos isolados descritos neste trabalho contém as RII e III.

Seis sequências de *tef1* recuperadas são do tipo de *T. spirale* (DAOM 183974 = CBS 346.93) e de isolados adicionais usados na descrição da espécie (DAOM 177714 e DAOM 171919). O isolado DAOM 183974 possui duas sequências disponíveis, a primeira contém toda RII (EU280049.1) e a segunda (AF534626.1) a maior parte da RIII (Figura S1). O isolado CBS 346.93 também possui duas sequências, contudo ambas são da RII, a primeira (AY605817.1), com 265 bases e 100% de identidade com o *tef1* (EU280049.1) do tipo de *T. spirale* (Fig. S1). A segunda (AF401018.1) tem 183 bases e apenas 93,54% de identidade com o *tef1* (EU280049.1) do tipo de *T. spirale* (Figura S1). De fato, ela possui maior identidade com o *tef1* do isolado identificado como *T. spirale* TAMA 0200 (AB856699.1 – 99,45%) e com o tipo de *T. subazureum* (MT070148.1 – 98,38%), uma espécie recentemente descrita do clado Spirale. O *tef1* do isolado adicional DAOM 177714 contém a RII e apenas 94,56% de identidade com o *tef1* (EU280049.1) do tipo de *T. spirale* (EU280049.1) enquanto que o isolado adicional DAOM 171919 contém a maior parte da RIII e apenas 97,56% com o *tef1* (AF534626.1) do tipo de *T. spirale* (Fig. S1).

Figura 2 – Fragmentos das sequencias do *tef1* depositados no NCBI de diferentes isolados relacionados com *T. spirale*. Em negrito isolado utilizado e descrito neste estudo.

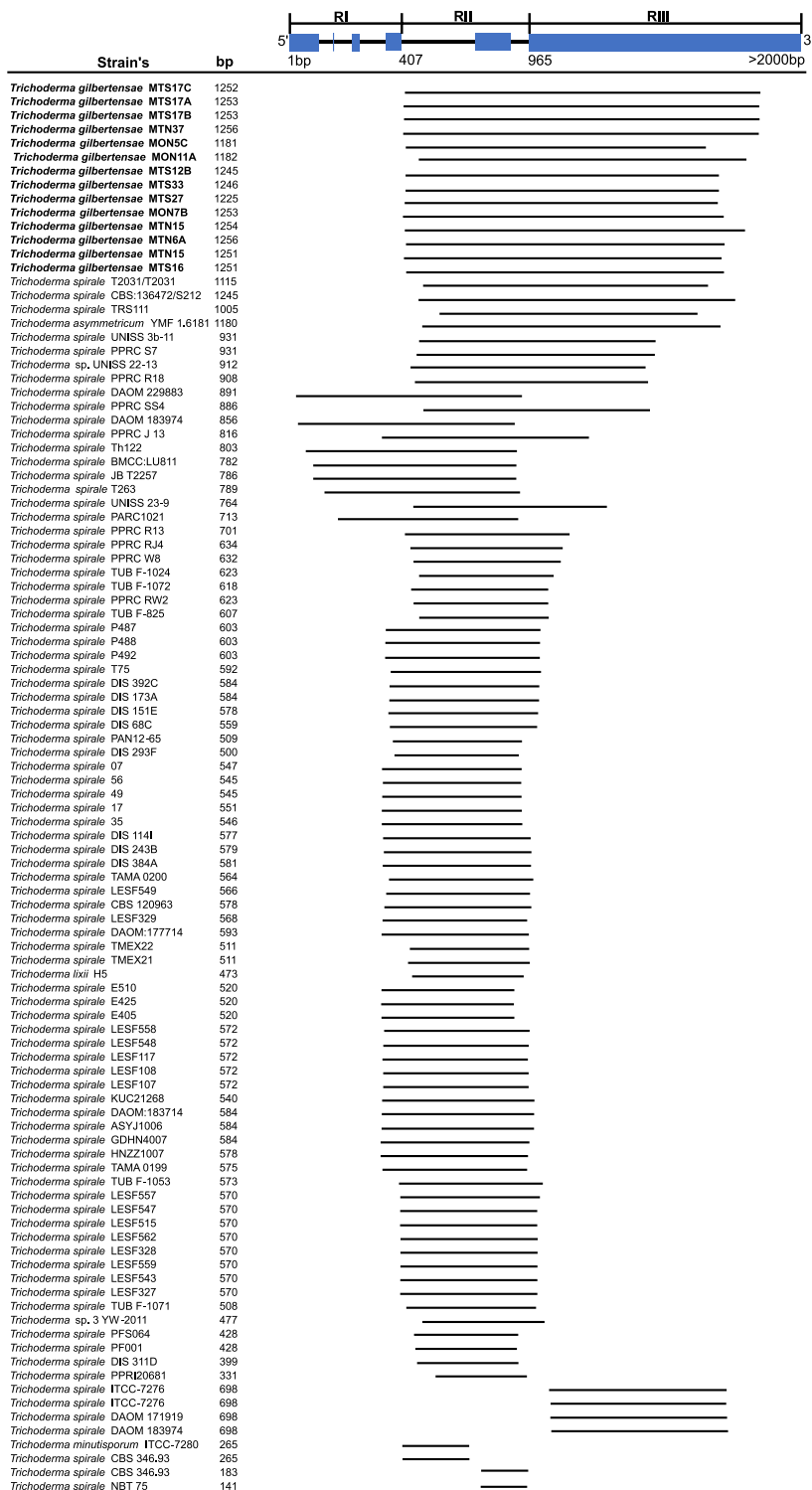


Tabela 1 - Sequências e informações de isolados relativos identificados como *T. spirale* recuperados do NCBI e utilizados neste estudo.

Strain's	Other collection	Country	Habitat	Probable biotechnological	NCBI GenBank			Autors
					sp1	sp2	caf1	
<i>T. strain</i> MTS17A		Brazil, Guanabara reservoir, Bahia	Laf-liter					In this study
<i>T. strain</i> MTS17B								
<i>T. strain</i> MT17C								
<i>T. strain</i> MTN37								
<i>T. strain</i> MONGC								
<i>T. strain</i> MON11A								
<i>T. strain</i> MTS12B								
<i>T. strain</i> MTS53								
<i>T. strain</i> MTS27								
<i>T. strain</i> MON7B								
<i>T. strain</i> MTN15								
<i>T. strain</i> MTN6A								
<i>T. strain</i> MTN15								
<i>T. strain</i> MTS16								
<i>T. spirale</i> UNISS 36-11	C.P.K. 2309	Saudiá	Soil - Extensive Grassland Ecosystem		EF96077.1			1° - Mijleh et al., 2008
<i>Trichoderma</i> sp. UNISS 22-13	C.P.K. 2312				EF96074.1			
<i>T. spirale</i> UNISS 23-9	C.P.K. 2318				EF96075.1			
<i>T. spirale</i> PPRC 57		Etiópia	Soil samples collected from coffee plant rhizosphere	Biocontrol on <i>Gibberella vossii</i> strains, the causative agent of coffee wilt.	F345484.1			2° - Mdaw et al., 2010
<i>T. spirale</i> PPRC R18					F345478.1			
<i>T. spirale</i> PPRC S54					F345472.1			
<i>T. spirale</i> PPRC R18					F345476.1			
<i>T. spirale</i> PPRC R14					F345479.1			
<i>T. spirale</i> PPRC W8			Soil sample of the coffee tree rhizofera		F345441.1			
<i>T. spirale</i> PPRC J 13					F345444.1			
<i>T. spirale</i> PPRC RW2					F345453.1			
<i>T. spirale</i> TUB F-1024		Brazil, Iguaçu Falls	Subtropical rain forest		AY87261.1			3° - Duizhinu et al., 2005
<i>T. spirale</i> TUB F-1071					AY87265.1			
<i>T. spirale</i> TUB F-1053					AY87260.1			
<i>T. spirale</i> TUB F-1072		Argentina	Subtropical rain forest		AY87264.1			
<i>T. spirale</i> TUB F-825	ATCC MYA-4917	Brazil, Rio de Janeiro	Soil, Botanical garden		AY87277.1			
<i>T. spirale</i> DSS 20F		Cameroon	Stem endophyte		F346375.1	F344239.1		4° - Chaverri et al., Unpublished
<i>T. spirale</i> DSS 30C			Stem endophyte <i>Erwinia</i> sp.		F346370.1	F344238.1		
<i>T. spirale</i> DSS 384A			Stem endophyte <i>Ancistracdadia korupensis</i>		F346368.1	F344239.1		
<i>T. spirale</i> DSS 311D			Stem endophyte <i>Erwinia gabonensis</i>		F346369.1	F344299.1	F344239.1	
<i>T. spirale</i> DSS 1141		Egíptia	Stem endophyte <i>Theobroma cacao</i>		F346290.1	F344235.1	F344239.1	
<i>T. spirale</i> DSS 243B			Stem endophyte <i>Theobroma bicolor</i>		F346373.1	F344235.1	F344239.1	
<i>T. spirale</i> DSS 60C			Stem endophyte <i>Theobroma</i> sp.		F346372.1	F344298.1	F344239.1	
<i>T. spirale</i> DSS 151E		Costa Rica	Stem endophyte <i>Theobroma grandiflorum</i>		F346374.1	F344236.1	F344239.1	
<i>T. spirale</i> CBS 12963		Taiquía	Soil of <i>Solanum tuberosum</i>		F346291.1	F344263.1		
<i>T. spirale</i> DSS 1733A		Brazil	Stem endophyte <i>Theobroma</i> sp.		F346371.1	F344270.1	F344239.1	
<i>T. spirale</i> LESF549		Brazil, Botucatu-SP	Soil adjacent of <i>Acta sphaerica</i>		K1279036.1	K1278970.1		5° - Bakky et al., 2008
<i>T. spirale</i> LESF538			Soil 10m distant from nest <i>Acta sphaerica</i>		K1279026.1	K1278966.1		6° - Matayo et al., 2016
<i>T. spirale</i> LESF537			<i>Aspergillus</i>		K1279025.1	K1278967.1		
<i>T. spirale</i> LESF548			Fungus garden <i>Acta capiguera</i>		K1279034.1	K1278963.1		
<i>T. spirale</i> LESF547			Soil 10m distant from nest <i>Acta sphaerica</i>		K1279033.1	K1278960.1		
<i>T. spirale</i> LESF515			Soil 10m distant from nest <i>Acta sphaerica</i>		K1279032.1	K1278959.1		
<i>T. spirale</i> LESF559			Fungus garden, <i>Acta sphaerica</i>		K1279029.1	K1278962.1		
<i>T. spirale</i> LESF529			Fungus garden, <i>Acta sphaerica</i>		K1279035.1	K1278969.1		
<i>T. spirale</i> LESF517			Soil adjacent of nest <i>Acta sphaerica</i>		K1279024.1	K1278961.1		
<i>T. spirale</i> LESF508			Fungus garden <i>Acta sphaerica</i>		K1279023.1	K1278967.1		
<i>T. spirale</i> LESF507			Soil 10m distant from nest <i>Acta sphaerica</i>		K1279022.1	K1278956.1		
<i>T. spirale</i> LESF562			Soil adjacent of nest <i>Acta sphaerica</i>		K1279031.1	K1278965.1		
<i>T. spirale</i> LESF543			Soil adjacent of nest <i>Acta sphaerica</i>		K1279028.1	K1278961.1		
<i>T. spirale</i> LESF528		Brazil, Camacan-BA	Fungus garden <i>Acta sphaerica</i>		K1279030.1	K1278964.1		
<i>T. spirale</i> LESF527		Brazil, Iteso-BA	Fungus garden <i>Acta sphaerica</i>		K1279027.1	K1278968.1		
<i>T. spirale</i> DAOM 22883	RMF-T114	Panamá	Rainforest soil		EJ280050.1			7° - Hoyos et al., 2009
<i>T. spirale</i> DAOM 183974		Thailândia, Mekong	Bamboo stand soil		EJ280049.1	AF545533.1	F344239.1	
<i>T. spirale</i> DAOM177714		Canada	Deciduous leaf litter		AY758986.1			8° - Sunuck, 2002
<i>T. spirale</i> DAOM183714	CBS 346.93	Thailand	Soil under bamboo		AY758989.1			9° - Chaverri et al., 2005
<i>T. spirale</i> DAOM 171919		Costa Rica	Primonate forest soil		AF54628.1			10° - Chaverri et al., 2005
<i>T. spirale</i> CBS 346.93	DAOM183714	Unknown	Unknown		AF54628.1			11° - Kubig-Grainger et al., 20
<i>T. spirale</i> 41	Rocha S.L.	Brazil, Viçosa-MG	Leaf cut by ant	Use in biological control against leaf-cutting ants (<i>Acta sphaerica</i>)	K1279033.1			11° - Rocha S.L. et al., 2017
<i>T. spirale</i> 07					K1279065.1			
<i>T. spirale</i> 56					K1279071.1			
<i>T. rubrospina</i> 49					K1279069.1			
<i>T. spirale</i> 35					K1279062.1			
<i>T. spirale</i> 17					K1279064.1			
<i>T. spirale</i> E510	COAD2413	Cameroon Dji forest Reserve, Soumakou, Eastern province	Stem endophyte <i>Coffea canephora</i>		M8044105.1	M8044199.1		12° - Rodrigues et al., 2021
<i>T. spirale</i> E425	COAD2408				M8044096.1	M8044199.1		
<i>T. spirale</i> S405	COAD2404				M8044091.1	M8044194.1		
<i>T. spirale</i> TMEX22		México	Unknown		J3805123.1			13° - Jedytycka et al., Unpublished
<i>T. spirale</i> TMEX21					J3805122.1			
<i>T. spirale</i> TAMA 0200		Japão, Tokyo	Unknown		AB856699.1	AB856770.1		14° - Yabuki et al., 2013
<i>T. spirale</i> TAMA 0199					AB856698.1	AB856769.1		
<i>T. spirale</i> T2031T2031	CBS136472	Malásia	Soil samples		M0727491.1			15° - Rahman et al., 2021
<i>T. spirale</i> S212		Espanha, Cantabria, Torrelavega, Macizo de Ampo, Pico del Ingles, Palnia	Acetinal morphol on <i>Curva necromaniensis</i>		K5967340.1	K3645248.1		16° - Jaldich and Voghny, 20
<i>T. spirale</i> TRS111			Unknown		KP009963.1	KP009982.1		17° - Okera et al., 2015
<i>T. spirale</i> Th-72		Colômbia, Letícia	Soil	Use in biological control against <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	AB858939.1	AB858939.1		18° - Smith et al., 2013
<i>T. spirale</i> BMCC14811	ICMP 20999	New Zealand	Isolated Soil and from roots of <i>Pinus radiata</i>		K3871152.1			19° - Braithwaite et al., 2007
<i>T. spirale</i> JB T2257		Canada			K3871151.1			
<i>T. spirale</i> PAN12-65		USA, DC	Soil under boxwood tree		M8216099.1			20° - Crouch et al., Unpublished
<i>Trichoderma</i> sp. 3 YW-2011	HRUP0402	China	Soil		J2151485.1			21° - Li et al., 2013
<i>T. spirale</i> PFR04		South Korea	Root of <i>Pinus densata</i> within the leafy ring of <i>Trichoderma matsushiroi</i>	<i>T. spirale</i> promotes the growth of <i>Trichoderma matsushiroi</i> , the treatment increased the growth area of <i>T. matsushiroi</i> by 124-207% compared to the control plates.	M8044091.1			22° - Oh et al., 2019
<i>T. spirale</i> KUC23268					KX018221.1			23° - Jiang et al., 2017
<i>T. spirale</i> ASY11066		China	Soil		JQ040425.1			24° - Sun et al., 2012
<i>T. spirale</i> GDH48007					JQ040424.1			
<i>T. spirale</i> HNZZ1007			Endophyte		JQ040423.1			
<i>T. spirale</i> PPR12681		South Africa	Soil		KC287797.1			25° - du Plessis et al., 2018
<i>T. spirale</i> ITCC-7276		Índia	Rhizospheric soil		LN897318.1;			26° - Kumar, 2020
					LN897314.1			
<i>T. minutissimum</i> ITCC-7280		Índia	Soil		LN897316.1	LN897312.1		
<i>T. spirale</i> NBT 75		Espanha	Sulfurized soil		AF562623.1			27° - Hemosa et al., 2004
<i>T. spirale</i> P487		Polónia	Seedling's root - <i>Quercus robur</i>		M2078894.1			28° - Janowiak et al., 2022
<i>T. spirale</i> P488					M207895.1			
<i>T. spirale</i> P492					M2078896.1			
<i>T. spirale</i> T263		Brazil	<i>Sclerotium microthamum</i>		MT893974.1			29° - Fernandes et al., Unpublished
<i>T. spirale</i> PARC1021		Índia	<i>Pinus parviflora</i>		MT4541424.1	MT4541401.1		30° - Urbica-Torres et al., 2020
<i>T. spirale</i> T75		Espanha	Soil		MZ546828.1			31° - Hemosa et al., 2002
<i>H. lici</i> H5		Peru	<i>Brexa brasiliensis</i>		FP967628.1			32° - Guio and Chaverri, 2020
<i>T. asymmetricum</i> YME1.631H		China	Soil		MT1052186.1			33° - Zhang et al., 2021

3.3 Filogenias e delimitação de supostas novas espécies pelo ASAP

Inicialmente foram realizadas análises filogenéticas com as sequências do *tef1*, *rpb2* e *cal1* relacionadas com as espécies do clado Spirale recuperadas na base de dados do NCBI. Também foram incluídas nestas análises todas as espécies descritas do clado Spirale e espécies de clados filogeneticamente relacionados com o clado Spirale que possuíam o *tef1* (contendo RII e III), *rpb2* e *cal1* do tipo disponíveis. Os números de acesso dessas sequências estão disponíveis nas tabelas S1. Os *tef1* de *T. spirale* NBT 75 (AJ563623.1) e *T. spirale* CBS 346.93 (AF401018.1) são muito curtas, 141 e 183 bases, respectivamente, e não foram incluídas nas análises filogenéticas.

Os *tef1* das espécies descritas do clado Spirale bem como todas as sequências recuperadas relacionadas com *T. spirale* incluídas nesta análise filogenética formaram um clado bem suportado estatisticamente (MV e PP >90) e distinto das espécies dos clados filogeneticamente relacionados (Figura S2). Resultados similares foram obtidos com as filogenias com *rpb2* e *cal1* (Figuras S3 e S4). Em todas as reconstruções filogenéticas *T. longisporum* e *T. hunanense* foram basais no clado Spirale (Figuras S2, S3 e S4).

A monofilia do clado Spirale foi recuperada nas filogenias com *tef1*, *rpb2* e *cal1* tendo *T. longisporum* e *T. hunanense* como basais no grupo. Portanto, nós realizamos uma análise filogenética apenas com os *tef1* do clado Spirale usando *T. longisporum* e *T. hunanense* como grupo externo para maximizar o número de sítios não ambíguos no alinhamento múltiplo e prevenir eventuais homoplasias que pudessem resultar em ruído filogenético. Este alinhamento múltiplo também foi usado para inferir quais sequências do *tef1* poderiam representar prováveis novas espécies usando o ASAP. A maioria dos isolados incluídos nesta análise filogenética formaram clados estatisticamente bem suportado e distintos do clado que contém o *tef1* do tipo de *T. spirale* (DAOM 183974 = CBS 346.93).

As análises de delimitação de espécies pelo ASAP resultaram em um total de 14 partição de espécies. O número de isolados nas partições variou de 1 a 40 e a maioria dos ASAP *partition group's* (APG) representam clados da árvore filogenética estatisticamente bem suportado (Fig. 3). Três APG's (2, 4 e 10) incluem as espécies já descritas neste clado, *T. spirale*, *T. subuliforme* e *T.*

subazureum. Portanto, as sequências relacionadas com *T. spirale* recuperadas da base de dados representam pelo menos 10 prováveis novas espécies pertencentes ao clado Spirale. uma diversidade de espécies quase 4 vezes maior do que a registrada para esse clado.

Os isolados relacionados com *T. spirale* recuperados das bases de dados do NCBI são predominantemente do continente americano (39 de 86), e estão presentes em 9 dos 14 APG's (Fig. 3). Quatro APG's são constituídos por apenas um isolado, sendo dois da América do Sul (APG's 11 e 14) um da Europa (APG 3) e um da Ásia (APG 6). O *tef1* desses isolados é em geral, mais divergente em relação às sequências do APG mais proximamente relacionadas. Três APG's (5, 9 e 12) possuem apenas dois isolados oriundos de um único trabalho ou submissão direta não publicada (Fig. 3). Os isolados do APG 5 são da Europa enquanto que os isolados dos APG's 9 e 12 são da América do Sul. Os APG's 2, 10 e 13 possuem 11, 4 e 5 membros, respectivamente. Os isolados dos APG's 2 e 10 são da Ásia enquanto que os isolados do APG 13 são provenientes da América do Sul. Os membros dos APG's 4, 7 e 8 são originados de três continentes e foram relatados de 3 há 9 trabalhos ou submissões diretas não publicadas. O APG 1 possui o maior número de membros, 34 oriundos das Américas e seis da África, reportados em 11 trabalhos ou submissões diretas não publicadas. Todos os isolados deste trabalho oriundos do ecossistema Restinga são membros do APG 1, indicando que todos eles representam uma única espécie nova.

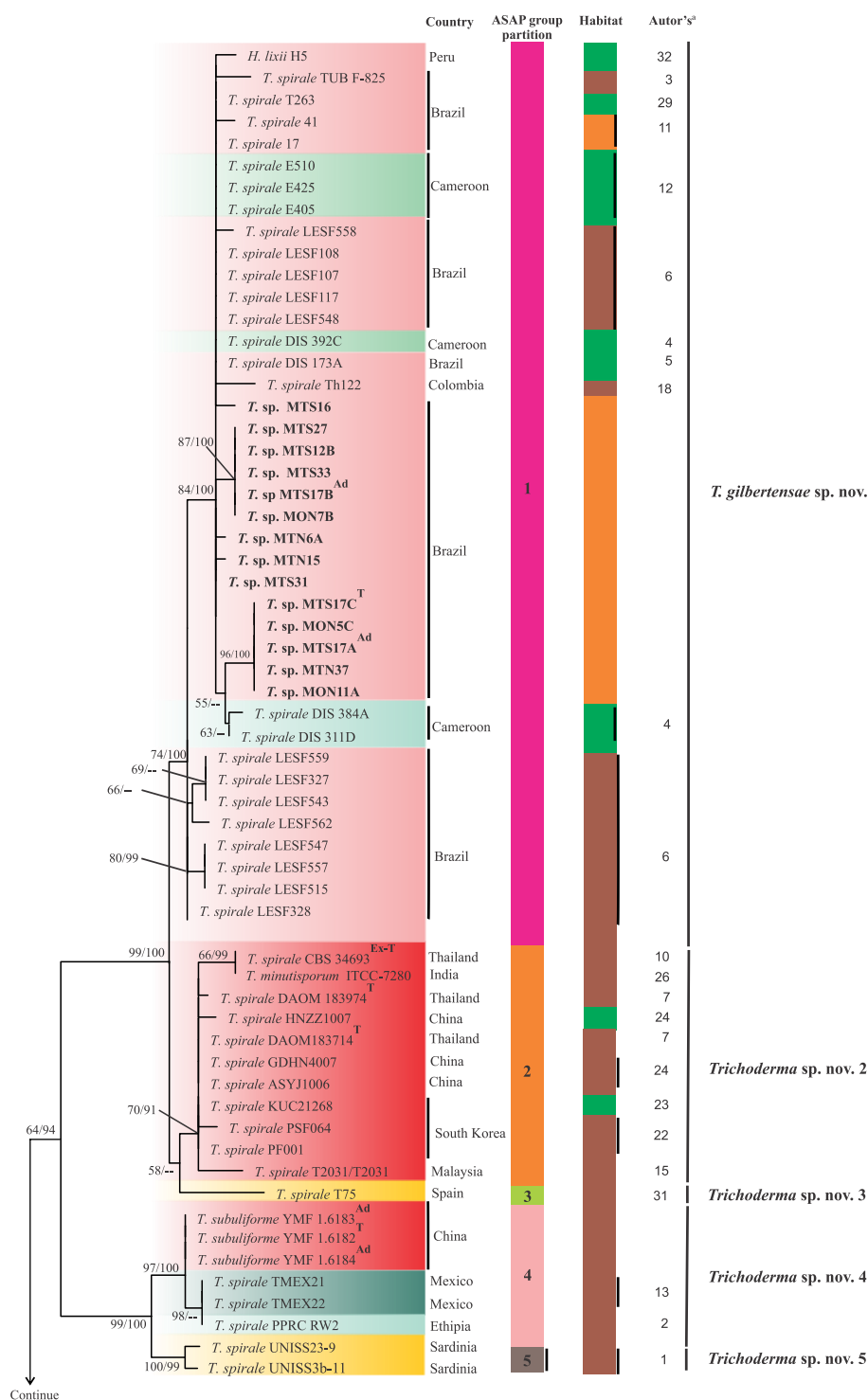
Mais da metade dos isolados relacionados com *T. spirale* foram isolados de amostras de solo, incluindo os tipos de todas as espécies do clado Spirale. Dez APG's possuem isolados obtidos de um único substrato/ambiente, cinco do solo (APG's 3, 4, 5, 10 e 13), dois de serapilheira (APG's 11 e 12) e dois endofíticos (APG's 9 e 14). O número de isolados nestes APG's variou de 1 a 6. Os APG's 2 e 7 possuem isolados de serapilheira e solo enquanto que os APG's 1 e 8 contêm isolados de serapilheira, endofíticos e do solo, o número de isolados nestes APG's variou de 9 a 40. Isolados oriundos da serapilheira e solo representaram a maioria no APG 1 enquanto que nos APG's 2 e 8 os isolados de solo predominaram. O APG 7 foi o único grupo onde os endofíticos representaram a maioria dos membros.

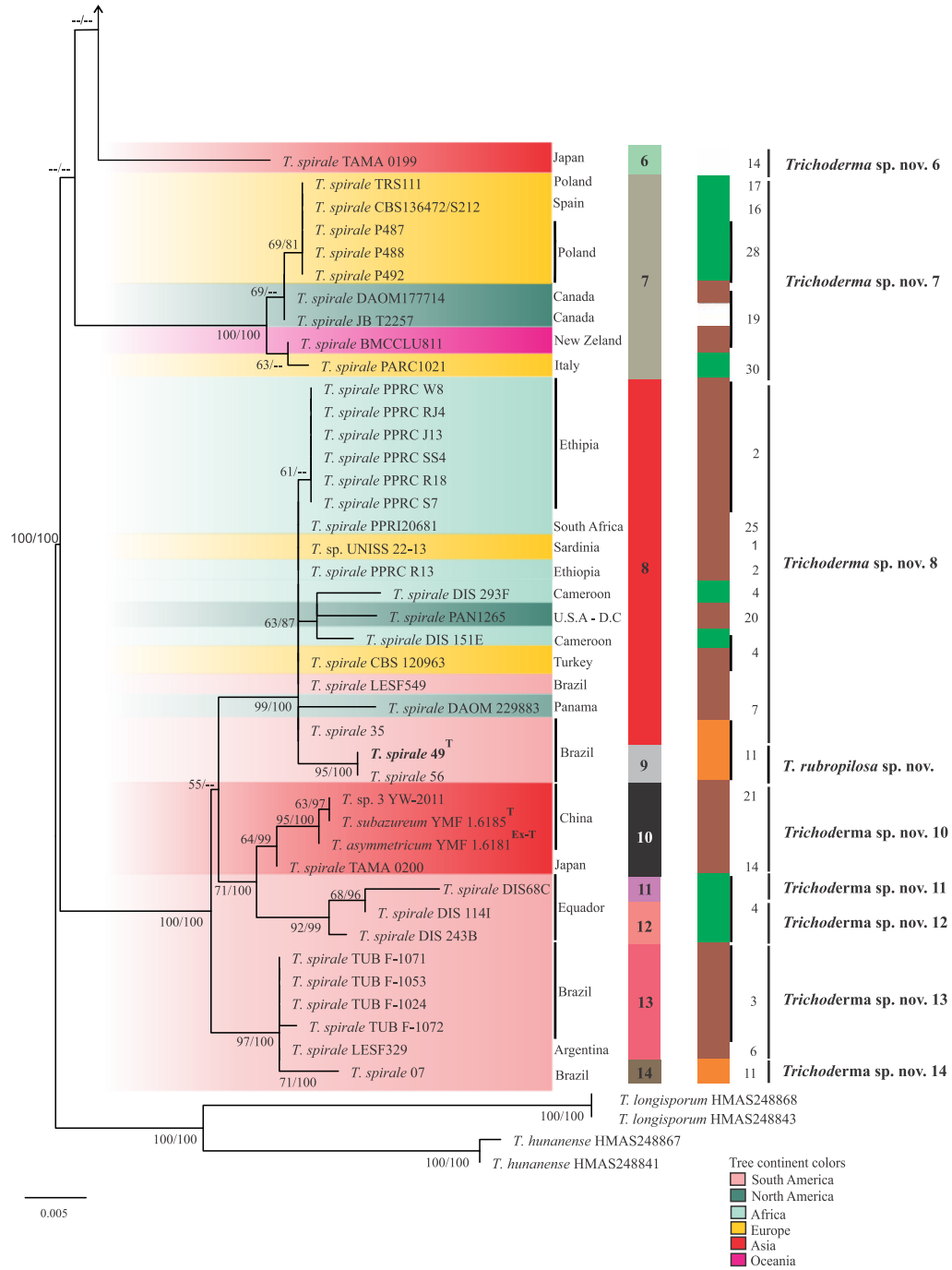
O tipo de *T. spirale*, (DAOM 183974 = CBS 346.93, oriundo da Tailândia),

está no grupo de partição 2, que contém apenas isolados da Ásia, incluindo o isolado *Trichoderma spirale* KUC21268, registro de ocorrência da espécie para a Coréia do Sul (Jang et al., 2017). Contudo, um dos isolados adicionais usados para descrever *T. spirale* isolado DAOM 177714 (Bisset,1991), com *tef1* disponível, fica no grupo de partição 7, que não é filogeneticamente relacionado com o grupo de partição 2, que contém o tipo de *T. spirale*. Este isolado é oriundo do Canadá e fica proxivamente relacionado com outro isolado do mesmo país na filogenia.

Os *tef1s* dos isolados ITCC 7276 e DAOM 171919 possuem apenas a RIII (Fig. 2) e não tinham sítios em comum com a maioria das sequências relacionadas com *T. spirale* recuperadas. Portanto, estes *tef1* não foram incluídos na filogenia molecular apresentada na figura 3 para prevenir qualquer viés que pudesse resultar em alterações na topologia da árvore filogenética do *tef1*. *T. spirale* DAOM 171919 foi usado como isolado adicional na descrição de *T. spirale* (Bisset 1991; Chaverri et al., 2003). As relações filogenéticas destes isolados foram elucidadas realizando uma análise filogenética incluindo apenas o *tef1* dos isolados relacionados com *T. spirale* que continham a RIII. Os isolados selecionados por esse critério são representantes dos APG's 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9 e 10. A topologia desta árvore filogenética recuperou a maioria destes APG's (Fig. 4A). Os *tef1s* do isolado ITCC 7276 ficaram no clado que contém isolados do APG 2, incluindo o tipo de *T. spirale*. O isolado DAOM 171919 ficou no clado que inclui isolados do APG 8, distantemente relacionado com o APG 3, ambos clados estatisticamente bem suportados (Fig. 4A).

Figura 3 – Filogenia da melhor árvore de máxima verossimilhança revelada por RAxML a partir de uma análise do alinhamento da sequência do *tef1* relacionadas com *T. spirale*, grupo externo, *T. longisporum* e *T. hunanense*. MV acima de 50% (esquerda), PP acima de 80% (direita), indicada nos nós. Novas espécies e isolados deste estudo estão indicados em negrito. Para cada cor indicada na seção ASAP, constitui um táxon ou uma nova espécie, respectivamente, seus locais de isolamento e os trabalhos responsáveis indicados nos numerais (Tab.1).





e (Figura 3, 4A-B e D). *Trichoderma rubropilosa* difere morfologicamente de *T. subazureum* na adição de uma conformação do conidióforo, sendo trichoderma-like há verticillium-like enquanto que o conidióforo de *T. subazureum* é exclusivamente trichoderma-like; essas espécies também diferem no comprimento e na base das fiálides bem como na taxa de crescimento (Tab. 2).

Tabela 2 - Caracteres contínuos e fenótipo de colônia de espécies de *Trichoderma* pertencentes ao clado Spirale.

Species	<i>T. gilbertensae</i> MTS17C		<i>T. gilbertensae</i> MTS17A		<i>T. gilbertensae</i> MTS17B		<i>T. rubropilosa</i>		<i>T. spirale</i> Bisset (1991)	<i>T. spirale</i> Chaverri (2003)	<i>T. spirale</i> Jang (2017)	<i>T. subazureum</i>	<i>T. subuliforme</i>	<i>T. hunanense</i>	<i>T. longisporum</i>								
Culture mediums	SNA	CMD	SNA	CMD	SNA	CMD	SNA	CMD	PDA	CMD	SNA	SNA	SNA	PDA	PDA								
C x L of the conidia	3-6 x 2-4	3-4 (-6) x 2-3	3-5 x 2-4	3-6 x 2-3	3-5 x 2-4	1-6 x 2-5 (-8)	3.0-4.4 x 2.8-4.0	3.5-4.5 x (2.0-)	2.5-3.0(-3.7)	4.1-5.1 x 2.5-2.8(-3)	(3.2-)	3.5-4.4(-4.9) x (2.1-)	2.4-2.9	(2.9-)	3.2-3.9(-4.3) x 2.1-2.7(-3.4)	(3.6-)	4.2-5.6 (-7.5) x 3.1-3.9	(4.4-)	5.0-6.4 (-7.5) x 2.6-3.1				
CL of conidia	1.3-2.0	1-2	1,3-2	1-2	1-1,7	0,5-1,7	(1.1-)	1.4-1.5(-1.8)	n/a	(1.1-)	1.4-1.8	(1.1-)	1.4-1.8	1.2-1.6	(1.0-)	1.2-1.6(-2.1)	(1.6-)	1.8-2.3(-2.8)					
C x L of the cell that phialides appear	(5-)	7-22 (-24) x 2-4	5-18 (-21) x 2-4	3-15 (-17) x 1-5	(2-)	5-18 (-25) x 1-4	4-15 (-25) x 2-4	(6-)	8-12 (-23) x 2-6	no observed	(2.7-)	3.0-4.5(-6.0)	n/a	no observed	no observed	no observed	no observed	no observed					
L from the base of the phialid	1-3	1-3	1-3	1-3	1-3	1-4	Slightly constricted	(1.5-)	2.0-3.0(-4.2)	1.9-2.8(-3.2)	(2.0-)	2.2-2.9(-3.5)	1.9-3.0	2.2-3.3	1.9-3.6								
C x L phialid	4-13(-17) x 2-5	(4-)	5-11 (-15) x 2-4	(-3)	6-16 (-22) x 1-5	(-5)	8-15 (-21) x 1-4	(-4)	8-12 (-15) x 2-4	(6-)	8-12 (-23) x 2-6	3.3-5.2 x 2.8-4.0	(3.2-)	4.5-6.5(-8.2) x (2.7-)	3.0-3.7(-4.5)	(3.7-)	4-6.4(-7.4) x (4.7-)	5.2-11.9(-20.6) x (2.2-)	2.7-3.6(-4.2)	3-5(-6), (3.7-)	7.0-15.8(-19.4) x (8.3-)	11.1-15.3(-21.4) x 3.1-3.9	5.6-9.4(-11.4) x 3.6-5.0
CL of the phialid	1.7-3.4(-3.7)	2.0-3.3 (-3.8)	1-6	3.5-6 (-6.7)	2-5	2-5	n/a	(1.0-)	1.3-2.0(-2.7)	n/a	(1.3-)	1.7-4.9(-8.5)	(1.2-)	2.4-5.9(-6.6)	2.1-5.5	1.2-2.4							
Conidiophore	trichoderma-like to verticillium-like	trichoderma-like to verticillium-like	trichoderma-like to verticillium-like	trichoderma-like to verticillium-like	trichoderma-like to verticillium-like	trichoderma-like to verticillium-like	pachybasium-like	pachybasium-like	undefined	trichoderma-like	trichoderma-like	trichoderma-like	trichoderma-like	trichoderma-like to verticillium-like	pachybasium-like								
C x L of Chlamydo-spore	4-11(-13) x 5-12	4-9 x 3-5(-9)	4-10 x 3-6 (-8)	4-7(-9) x 4-8	no observed	4-8 (-11) x 3-6 (-10)	05-13	(4.5-)	7.0-15.0(-22.0)	n/a	no observed	no observed	no observed	no observed	(6.6-)	8.3-11.7 x (6.6-)	7.6-11.0						
CL of Chlamydo-spore	(0.8-)	1-1.3	(0.9)	1.2 x 1.3 (1.7)	1,2-1,7	1-1,3	(-0.5)	1-1.6 (-1.8)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	1.0-1.3									

Species	<i>T. gilbertensae</i> MTS17C		<i>T. gilbertensae</i> MTS17A		<i>T. gilbertensae</i> MTS17B		<i>T. rubropilosa</i>		<i>T. spirale</i> Bisset (1991)	<i>T. spirale</i> Chaverri (2003)	<i>T. spirale</i> Jang (2017)	<i>T. subazureum</i>	<i>T. subuliforme</i>	<i>T. hunanense</i>	<i>T. longisporum</i>
Culture mediums	SNA	CMD	SNA	CMD	SNA	CMD	SNA	CMD	PDA	CMD	SNA	SNA	SNA	SNA	SNA
Pustule Formation	Pulvinata, globose and aggregates	Pulvinata, globose and aggregates	not produce	not produce	not produce	not produce	Diminishing, aggregated and	Diminishing, aggregated and	Compact, chushion-shape, concentric or irregular.	Pulvinata, compact subglobose	undefined	Minute, dense, relatively abundant in margin	undefined	Spreading in concentric rings, pulvinate	Hemispherical, compact, remaining discrete
Mycelium formation	Aerial	Aerial and adhered	diffuse aerial	adhered	Aerial hyphae dense	diffuse aerial	diffuse aerial	diffuse aerial	Aerial mycelium, floccoso to woolly, white or greyish.	Aerial hyphae dense	Aerial	Aerial hyphae dense	Aerial hyphae	Diffuse aerial	Diffuse aerial
Soluble pigment	noted	noted	noted	noted	noted	noted	noted	noted	noted	noted	noted	noted	No noted	noted	noted

Species	<i>T. gilbertensae</i> MTS17C		<i>T. gilbertensae</i> MTS17A		<i>T. gilbertensae</i> MTS17B		<i>T. rubropilosa</i>		<i>T. spirale</i> Bisset (1991)	<i>Trichoderma spirale</i> Chaverri (2003)		<i>T. subazureum</i>	<i>T. subuliforme</i>	<i>T. hunanense</i>	<i>T. longisporum</i>
Culture mediums	SNA	PDA	SNA	PDA	SNA	PDA	SNA	PDA	PDA	SNA	BDA	SNA	SNA	PDA	PDA
15 °C	3	06-11	02-05	03-07	01-04	0-3	1-2	05-06	n/a	04-08	08-13	n/a	n/a	n/a	n/a
20 °C	12-20	14-23	04-07	09-20	09-10	08-12	16-20	22-25	40-70	20-35	29-40	n/a	n/a	n/a	n/a
25 °C	26-39	39-40	15-26	21-34	20-21	18-22	34-50	37-41	n/a	40-50	47-54	45	34	46-47	46-47
30 °C	19-39	27-38	13-25	25-33	22-20	21	14-38	42-45	n/a	51-63	60-70	39	24	n/a	n/a
35 °C	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	1-1	0-1	n/a	0-13	0-4	n/a	n/a	n/a	n/a

*Em negrito espécies descritas nesse trabalho

4 TAXONOMIA

Trichoderma gilbertensae sp. nov. L. S., SALES, L. L.; De SANTANA; D.; ANDRADE, J. P.; SOUZA, J. T.; MARBACH, P. A. S.

MycoBank No: Não depositado

Etimologia: *gilbertensae* nomeado em homenagem ao artista Gilberto Gil, ícone da cultura brasileira na luta pela liberdade de expressão principalmente durante a ditadura militar.

Figura 5

Tipo. Bahia, distrito de Valença – Praia de Guaibim (13°18'03.1"S/38°57'57.6"W), litter, 11/10/2012, Jackeline Pereira Andrade. Tipo MTS17C, preservado em estado inativo (Castelani/30% glycerol) conservado e em uso na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/UFRB e Laboratório de Fitopatologia Molecular/UFLA. GenBank *tef1*= OQ677402.1, *rpb2*= OQ677417.1, *cal1*= OQ677422.1

Diagnose: *Trichoderma gilbertensae* sp. nov é filogeneticamente distinto de *T. spirale*, pelos genes *tef1* e *cal1*. Além disso, as características microscópicas de *Trichoderma gilbertensae* sp. nov são amplamente variados em ambos os meios de cultura em que *T. spirale* foi descrito, como o tamanho dos conídios e suas formas, suas taxas de crescimento, as formas de seus conidióforos e suas fiáides, além disso, há forte corroboração que demonstra que *T. spirale* é restrita à Ásia, enquanto *Trichoderma gilbertensae* sp. nov. para o continente americano. O clado Spirale pode ser diagnosticado por apresentar pústulas pulvinadas com longas ramificações sinuosas em sua superfície, produção de pigmento solúvel amarelo a verde cana em meio de cultura, uma variação de conidióforos, tricoforma, verticillium e paquibásio-like, além de conídios elipsoidais.

Teleomorfo. Desconhecido

Descrição. Em CMD após 72 h colônia com 11 – 26 mm diam, micélio cobrindo a placa após 5 dias a 20°C. Colônia hialina, radial, finamente zonada, hifas aéreas quase ausentes, aparecendo em anéis concêntricos. Conidiação

iniciando após 5 d, formada nas hifas aéreas e nas pústulas, pústulas surgindo na margem da colônia, pulvinadas, 0.3 – 1.3 x 0.3 – 1.3 mm diam (n=20), inicialmente branca, ficando verde após 10 d, com prolongações salientes além da superfície, longos, sinuosos e raramente ramificados nas pontas. Nenhum odor distinto observado. Pigmento amarelado claro observado no centro da colônia. Conidióforos *trichoderma-like* há *verticillium-like*, retos ou sinuosos com ramos férteis surgindo do eixo principal, pareados ou solitários, contendo 1-3 células, às vezes não se ramificando. Fiálides dispostas frouxamente, solitárias ou pareadas, lageniformes a estreitamente lageniformes, às vezes subuladas, 4-13(-17) x 2-5 µm, l/w 1.7-3.4(-3.7), 1 – 3 µm largura da base, surgindo de uma célula (5-)7 – 22(-24) x 2 – 4 µm (n=60). Conídios verdes, lisos, principalmente oblongos ou elipsoidais, às vezes obvoídes 3 – 6 x 2 – 4 µm, l/w 1.3 – 2.0 (n=60). Clamidósporos comuns, intercalares ou terminais, globosos a subglobosos, 4 – 11(-13) x 5 – 12 µm, l/w (0.8-)1 – 1.3 (n=45).

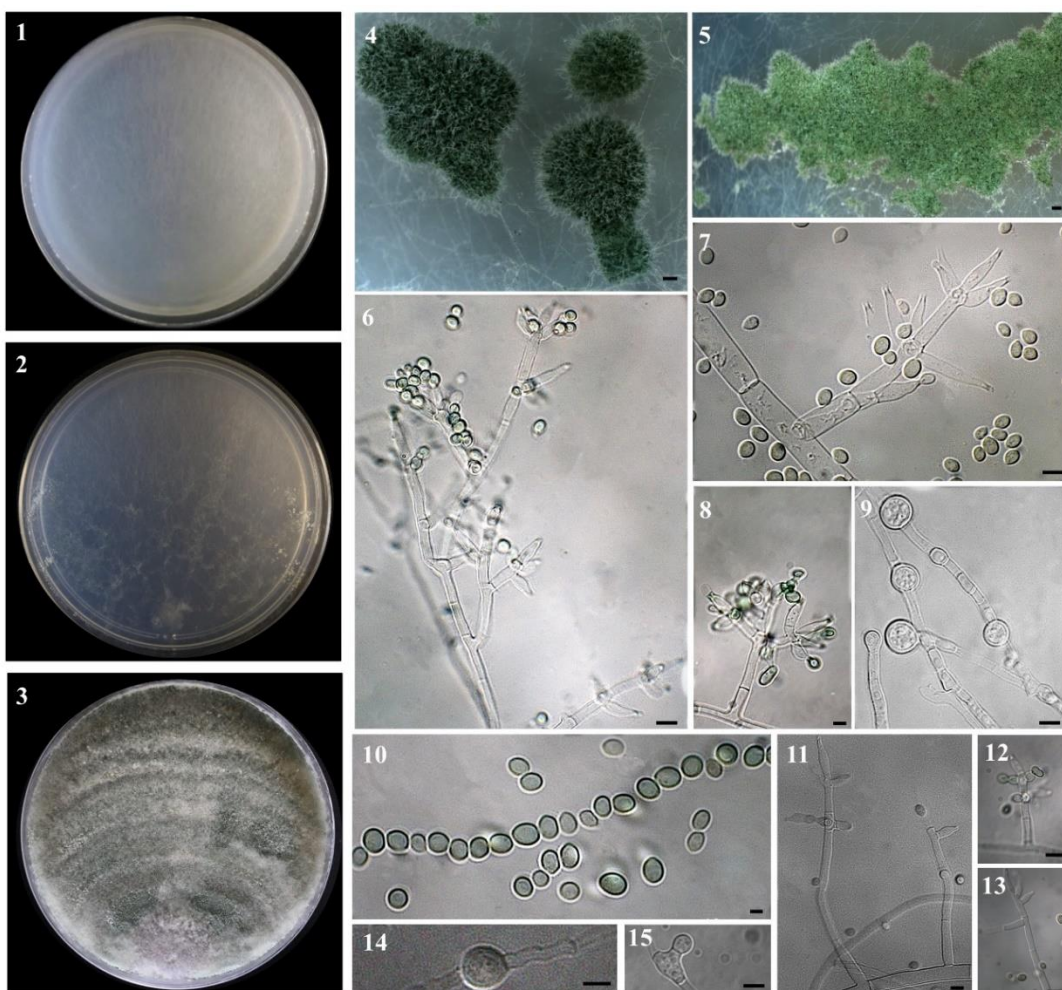
Em SNA após 72 h colônias com 3 – 24 mm diam, micélio cobrindo a placa após 6 dias a 20 °C. Colônia hialina, radial, finamente zonada, hifas aéreas moderadas aparecendo em anéis concêntricos. Conidiação iniciando após 5 d, formada nas hifas aéreas e nas pústulas, pústulas surgindo na margem da colônia, pulvinadas, (0.3-) 0.5 – 0.9 (-1.1) x (0.2-) 0.4 – 0.6 mm (n=20), inicialmente branca, ficando verde após 11 d, com prolongações salientes além da superfície, longos, sinuosos e raramente ramificados nas pontas. Nenhum odor distinto observado. Pigmento não observado. Conidióforos *trichoderma-like*, retos ou sinuosos com ramos férteis surgindo do eixo principal, pareados ou solitários, contendo 1 – 3 células. Fiálides dispostas frouxamente, solitárias ou pareadas, lageniformes a estreitamente lageniformes, 3 – 13 (-22) x 1 – 5 µm, l/w 1.7 – 6.7, 1-3 µm largura da base, surgindo de uma célula (2-) 5 – 22 (-24) x 1 – 5 µm (n=180). Conídios verdes, liso, principalmente oblongo ou elipsoidal, às vezes ovóide ou obvoíde 3 - 4 (-6) x 2 – 3 µm, l/w 1 – 2 (n=180). Clamidósporos comuns, intercalares ou terminais, globosos a subglobosos ou ovoídes, 4 – 11 (-13) x 3 – 12 µm, l/w (0.8 -) 1 x 1.7 (n=135).

Em PDA após 72 h colônia raio 6 - 25 mm a 20 ° C, micélio cobrindo a placa após 7 d a 20 ° C. Colônia densa inicialmente branca, tornando-se verde escura

com crescimento circular irregular, formando anéis dispersos concêntricos. Conidiação iniciando após 6 d, formada em hifas aéreas densas, Pústulas brancas agregadas no micélio, tornando-se agregados verdes e solitários no anel em 8 d. Nenhum odor distinto observado. Nenhum pigmento observado.

Distribuição. América do Sul, Brasil, Bahia, Valença, Praia de Guaibim.

Figura 5. *Trichoderma gilbertensae* - 1–3 culturas incubadas em diferentes meios em 20 °C por 7 dia (1 em CMD, 2 em SNA, 3 em PDA), 4, 6 – 9 (CMD), 5, 10 – 18 (SNA) 6 – 8, 11 – 13 conidióforos e fiáldes, 9, 14, 15 clamidósporos, 7, 10 conídios. 6, 11, 8, 10 baras = 2 µm, outras barras = 5 µm.



Amostras adicionais examinadas. Bahia, distrito de Valença - Praia de Guaibim (13°18'03.1" S/ 38°57'57.6" W), lixo, 10/11/2012, coletado por Jackeline Pereira Andrade. Holótipo MTS17A e MTS17B, preservados em estado inativo (Castelani/30% glicerol) na conservação e uso da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/UFRB e Laboratório de Fitopatologia Molecular/UFLA. Identificação GenBank MTS17A *tef1*= OQ677400.1, *rpb2*= OQ677415.1, *cal1*=

OQ677420.1. Identificação GenBank MTS17B *tef1*= OQ677401.1, *rpb2*= OQ677416.1, *cal1*= OQ677421.1.

Notas. *Trichoderma gilbertensae* sp. nov difere de *T. spirale* filogeneticamente, morfológicamente e fisiologicamente. O tamanho da colônia de *T. spirale* é maior que o de *Trichoderma gilbertensae* sp. nov. em todas as temperaturas. Os conidióforos de *T. spirale* são do tipo paquibásio enquanto *Trichoderma gilbertensae* sp. nov, possui conidióforos do tipo verticillium e tricoderma e maior variação de conídios, além de conídios maiores [3 – 6 x 2 – 4] , [3 - 4 (-6) x 2 – 3] entre *T. spirale* [3,5–4,5 x (2,0–)2,5–3,0(-3,7)], 4,1–5,1 x 2,5– 2,8(-3) CMD e SNA, respectivamente. As fiáides de *T. spirale* [(3,2-)4,5-6,5(-8,2) x (2,7-)3,0-3,7(-4,5)] µm analisadas por Chaverri et al., (2003) em CMD e para Jang et al., (2017) [(3,7-)4–6,4(-7,4) x 2,6–3,5(-4,3)] µm em SNA são menores que *Trichoderma gilbertensae* sp. nov [4-13(-17) x 2-5] e [3 – 13 (-22) x 1 – 5]. Espécimes adicionais como os isolados MTS18A e MTS17B não produziram pústulas em nenhum meio analisado e sua conidiação foram observadas apenas no meio SNA. Essas características estão ausentes no tipo *T. spirale*. Além disso, *Trichoderma gilbertensae* sp. nov. são fortemente suportado (MV e PP >80%) pelos dados filogenéticos apresentados nas árvores, demonstrando que este espécime estar evoluindo independentemente ao longo do tempo.

Trichoderma rubropilosa sp. nov., L. S., SALES, L. L.; De SANTANA; D.; ANDRADE, J. P.; SOUZA, J. T.; MARBACH, P. A. S.

MycoBank No: não depositado.

Etimologia: *rubropilosa* em relação ao local de coleta, folhas cortadas do formigueiro *Atta sexdens rubropilosa*.

Figura 6

Tipo. Brasil, Zona da Mata de Minas Gerais, Viçosa, remanescentes de Mata Atlântica: floresta estacional, subtropical, semidecídua, montana 'Mata do Seu Nico' (Fazenda Bonsucesso), 20°45'23" S e 42°52'23 " W, 750 m de altitude, 20°48'07" S e 42°51'31" W. Coletado por (02/2010) Silma Leite Rocha. Tipo 49

preservado em estado inativo (Castelani/30% glicerol) na conservação e uso da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/UFRB e Departamento Florestal da Universidade Federal de Viçosa/UFV. Identificação do GenBank *tef1*= KT619069.1, *OQ677414.1*, *rpb2*= OQ677419.1, *cal1*= OQ677423.1.

Diagnose. *Trichoderma rubropilosa* sp. nov está relacionado com a espécie *T. subazureum*, onde ambas as espécies possuem características semelhantes, sendo a principal diferença apoiada por dados filogenéticos e uma pequena variação nas morfologias microscópicas, como uma variação de conidióforo, base das fiálides e diferenças nas taxas de crescimento.

Teleomorfo. Desconhecido

Descrição. Em CMD após 72 h, raio da colônia 23 – 24 mm a 20 °C, placa coberta de micélio após 7 d a 20 °C. Colônia vegetativa com pouco micélio aéreo, inicialmente hialino, tornando-se branco hialino após 10 dias com crescimento radial irregular. Conidiação iniciando após 10 d, formadas nas hifas aéreas e nas pústulas, pústulas inicialmente brancas e verdes, solitárias e agregadas, surgindo inicialmente nas margens da placa, algumas posteriormente tornando-se verde-escuras em toda a placa após 12 d, 0.4 – 0.6 (1.6) x 0.4 – 0.6 (1.6) 11 d (n = 20). Nenhum odor distinto observado. Pigmento amarelo-esverdeado inicialmente observado ao redor do inóculo, posteriormente se espalhando por toda a placa. Conidióforos trichoderma-like e verticillium-like. Fiálides dispostas frouxamente, solitárias ou pareadas, lageniformes a estreitamente lageniformes e ampuliformes 5 – 14 (-19) x 2 – 5 µm, l/w 2 – 3,8, 1 – 4 µm largura da base (n = 60), proveniente de uma célula (6-)8 – 12 (-23) x 2 – 6 µm (n = 30). Conídios verdes, lisos, subglobosos, globosos e ovóides, 1 – 6 x 2 – 5 (-8) µm, l/w 0.5 – 1,7 (n = 60). Clamidósporos observados após três semanas 4 – 8 (-11) x 3 – 6 (-10) µm, l/w (-0.5) 1 – 1.6 (-1.8) abundante, intercalada e terminal, globosa a subglobosa (n = 45).

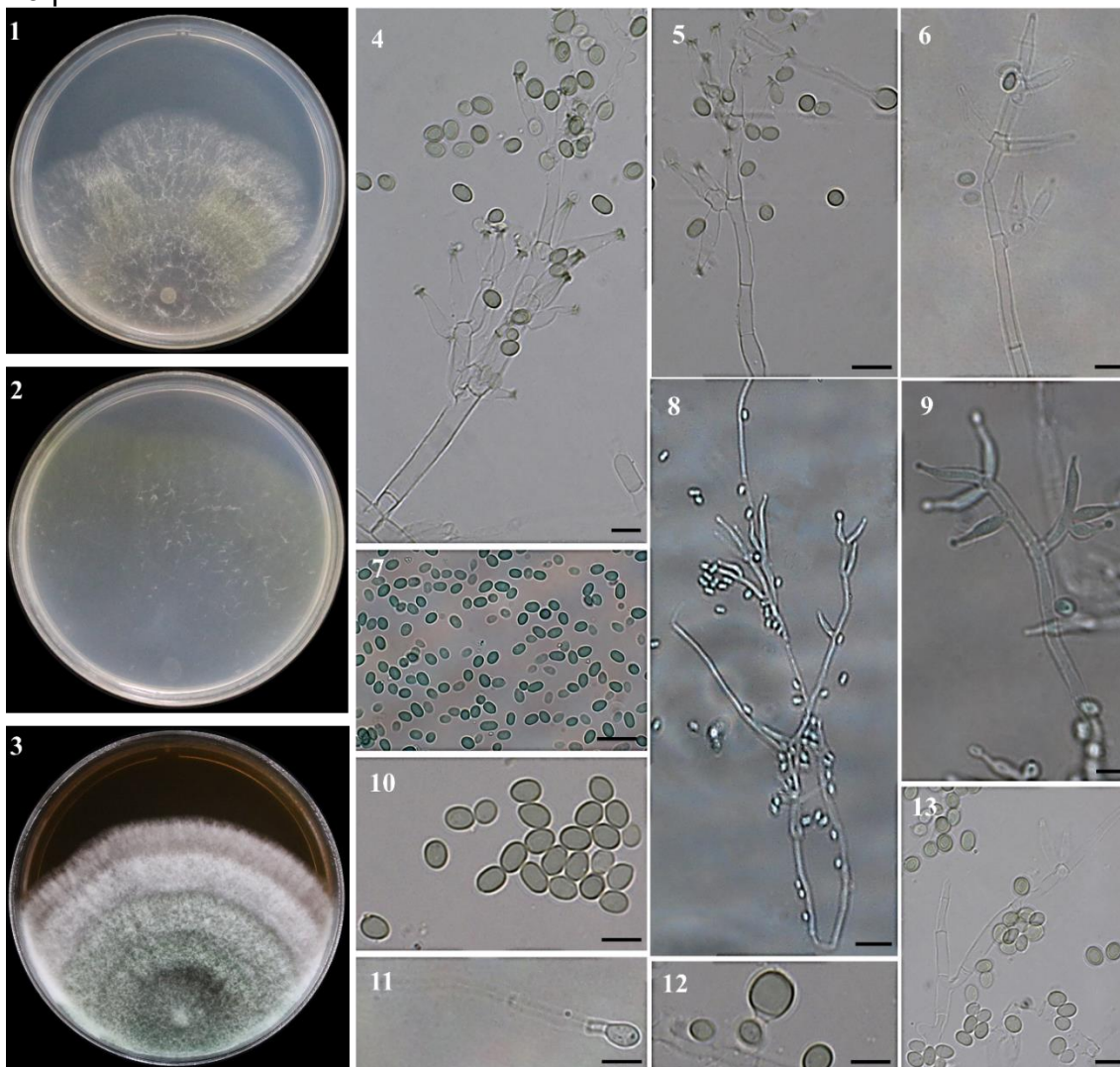
Em SNA após 72 h. raio da colônia 16 – 18 mm a 20 °C, placa coberta de micélio após 7 dias a 20 °C. Colônia branca hialina, com crescimento radial, halocêntrica, inicialmente com micélio formado por hifas vegetativas e aéreas vagamente arranjadas. Conidiação iniciando após 7 d, formada em hifas aéreas e em pústulas, pústulas solitárias ou agregadas na periferia da placa, espalhando-se

posteriormente na parte superior da placa, inicialmente brancas e verdes, poucos agregados, depois tornando-se verde-escuras e densas, muito agregado em (- 0,5) 0,8 – 1 (- 1,5) x 0,5 – 0,8 (-1,5) 14 d (n = 20). Nenhum odor distinto observado. Nenhum pigmento notado. Conidióforos *trichoderma-like* e *verticillium-like*. Fiálides dispostas frouxamente, solitárias ou pareadas, lageniformes a estreitamente lageniformes, às vezes alongadas e ampuliformes (- 4) 8 – 12 (- 15) x 2 – 4 µm, l/w 2 – 5, 1 – 3 µm largura da base (n = 60), proveniente de uma célula 4 – 15 (-25) x 2 – 4 µm (n = 60). Conídios verdes, lisos, subglobosos, globosos e ovóides, 3 – 5 x 2 – 4 µm, l/w 1 – 1,7 (n = 60). Clamidósporos não observados.

Em PDA após 72 h colônia raio 22 - 25 mm a 20 ° C, placa coberta de micélio após 7 d a 20 ° C. Colônia densa inicialmente branca, tornando-se verde escura com crescimento circular, formando anéis concêntricos. Conidiação iniciando após 7 d, formada em hifas aéreas densas, pústulas brancas formam-se na periferia da placa após 10 d. Nenhum odor distinto observado. Nenhum pigmento observado.

Distribuição. Brasil, Minas Gerais, Viçosa, 'Mata do Seu Nico' (Fazenda Bonsucesso).

Figura 6. *Trichoderma rubropilosa* - 1–3 culturas incubadas em diferentes meios em 20 °C por 7 dias (1 em CMD, 2 em SNA, 3 em PDA), 4,5, 10 – 13 (CMD), 6 – 9 (SNA), 4 – 6, 8, 7, 13 conidióforos, fiálides e clamidósporos, 7, 10 conídios, 11,12 clamidósporos, 4, 6, 9, 13 barras = 5 µm, 5,7, 10 – 12 barras = 10 µm.



Notas. *Trichoderma rubropilosa* sp. nov. difere de *T. spirale* filogeneticamente, morfologicamente e fisiologicamente. O tamanho das colônias de *T. spirale* é maior que o de *Trichoderma rubropilosa* sp. nov. em todas as temperaturas. Os conidióforos de *T. spirale* são do tipo paquibásio enquanto *Trichoderma rubropilosa* sp. nov, possui conidióforos do tipo verticillium e tricoderma e maior variação de conídios, além dos conídios serem maiores no CMD [1 – 6 x 2 – 5 (-8)] e um pouco menores no SNA [3 – 5 x 2 – 4] enquanto em *T. spirale* [3,5–4,5 x (2,0–)2,5–3,0(-3,7)], [4,1–5,1 x 2,5– 2,8(-3)] CMD e SNA, respectivamente. As fiálides de *T. spirale* [(3,2-)4,5-6,5(-8,2) x (2,7-)3,0-3,7(-4,5)] µm analisadas por Chaverri et al., (2003) entre CMD e para Jang

et al., (2017) [(3,7–)4–6,4(–7,4) x 2,6–3,5(–4,3)] µm) entre SNA são menores que *Trichoderma rubropilosa* sp. nov [5 – 14 (-19) x 2 – 5] e [(- 4) 8 – 12 (- 15) x 2 – 4]. ***Trichoderma rubropilosa* sp. nov.** também tem diferenças marcantes quando comparado com sua provável espécie irmã atual de *T. subazureum* Z.F. Yu & Y. F. Lv (2021), os conídios de *Trichoderma rubropilosa* sp. nov são evidentemente maiores, [1 – 6 x 2 – 5 (-8)] µm vs [(3,2–)3,5–4,4(–4,9) x (2,1–)2,4–2,9] µm, mais a base das fiáldes ***Trichoderma rubropilosa* sp. nov.** são maiores que a de *T. subazureum*, [1 – 4] vs [(2.0–)2.2–2.9(–3.5)] µm, além disso, existem diferenças marcantes quando se compara a taxa de crescimento de ambas as espécies em diferentes meios. Além disso, ***Trichoderma rubropilosa* sp. nov.** é fortemente suportado (MV e PP >80%) pelos dados filogenéticos apresentados nas árvores.

5 DISCUSSÃO

5.1 Diversidade genética

A busca por marcadores genéticos entre os microrganismos vem sendo pesquisada desde dos anos 80. Stern et al., (1988), demonstraram a presença de DNA repetitivo em *Salmonella typhimurium* surgindo o primeiro *fingerprint* em nível molecular para microrganismos, o REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*). A técnica de RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) foi inicialmente desenvolvida por Williams et al., (1990) simultaneamente Welsh e McClelland (1990). Mais tarde Hulton, Higgins e Sharp (1991) descreveram a presença de um novo elemento repetitivo em *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *enterobacteria* (*Yersinia pseudotuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*) o ERIC (*Repetitive Intergenic Consensus*) e em 1992 o marcador molecular BOX-PCR foi descrito para *Streptococcus pneumoniae* por Martin, et al., (1992).

Esses marcadores são utilizados na caracterização da diversidade genética de microrganismos sejam eles eucariotos ou procariotos, uma vez que são regiões que possuem uma alta taxa de conservação e estão distribuídas de maneira generalizada nos genomas desses organismos. Esses marcadores moleculares tem sido utilizados como *fingerprint* para distinguir espécies ou mesmo cepas de uma espécie, uma vez que as chances de microrganismos não

relacionados filogeneticamente terem o mesmo perfil genético são mínimas (Weising 1994; Claverys et al., 1998; Versalovic et al., 1993; Mishra et al., 2013, 2015; Chen et al., 2013; Bilung et al., 2018;). Desse modo, esses marcadores genéticos são utilizados para a caracterização da diversidade genética de diversos microrganismos, visando tanto a diferenciação das espécies na genotipagem ou para triagem bacteriana ou fúngica (Wong e Lin 2001; Van Belkum et al., 2001; Zhu et al., 2001).

Nesse estudo os elementos BOX demonstraram pouca eficiente para distinguir isolados da mesma espécie. Contudo, não significa que este marcador não possua uma importância significativa na distinção ou triagem de espécies ou isolados tanto de *Trichoderma* quanto de outros gêneros. Como demonstrado neste estudo, foi observado padrões similares tanto na filogenia quanto no dendrograma com os isolados utilizados para a descrição de *T. gilbertensae*, no qual fica evidenciado uma divergência morfológica entre as cepas adicionais e a cepa tipo e essa mesma divergência é observada nos perfis genéticos desses isolados. Dessa forma, mesmo não alcançando um único padrão genético para os isolados, é observado que existe uma riqueza genética oculta e não acessada dentro do gênero *Trichoderma* que não está sendo explorada e estudada.

5.2 Fragmentos do *tef1* relacionados a *T. spirale*

Devido à falta de uma região para identificação a nível de espécies para os isolados de *Trichoderma*, os bancos de dados recebem fragmentos de diferentes regiões do gene *tef1*. Muitos desses fragmentos são depositados de forma direta nos bancos de dados sem estarem vinculados a uma publicação, ou por meios de trabalhos taxonômicos e não taxonômicos (Kullnig-Gradinger et al., 2002; Chaverri, et al., 2003; Gerardo et al., 2004; Hermosa et al., 2004; Druzhinina et al., 2005; Samuels 2006; Hoyos-Carvajal et al., 2009; Gazis e Chaverri 2010; Belayneh Mulaw et al., 2010; Smith et al., 2013; Jaklitsch e Voglmayr, 2015; Montoya et al., 2016; Rocha et al., 2017; Jang et al., 2017; Oh et al., 2019; Urbez-Torres et al., 2020; Illescas et al., 2021; Jankowiak et al., 2022). O depósito feito sem acurácia implica em um aumento de sequências com baixa confiabilidade, podendo levar a classificação taxonômica equivocada, de maneira que não representa o número real de espécies. Aos longos dos anos,

a espécie *T. spirale*, vem sendo atribuída a diversos isolados oriundos de diferentes trabalhos, como controle biológico, produção de enzimas e desenvolvimento vegetal, contudo essas identificações são realizadas utilizando diferentes regiões do *tef1*, ou com o gene ITS, que não é indicado para identificação a nível de espécie (Smith et al., 2013; Belayneh Mulaw et al., 2010; Oh et al., 2019; Li et al., 2019). Como caracterizado nesse estudo, a maioria das sequências do *tef1* dos isolados relacionados com *T. spirale*, possui a RII integralmente ou de forma parcial, essa mesma região é atualmente recomendada e utilizada para identificação e descrição de espécies dentro do gênero *Trichoderma* (Cai et al., 2021). Apenas quatro sequências não possuem a RII, tornando dessa forma inviável uma determinação a nível de espécie. Devido à falta de padronização no sequenciamento do *tef1*, problemas em relação a identificação das espécies se tornaram frequentes nos bancos de dados (Chaverri et al., 2015). Criando a necessidade de se apurar os dados depositados afim de diminuir as chances de erros e atribuições a sequências ou espécies referentes.

5.3 APG's uma diversidade escondida

O surgimento de espécies crípticas e de complexos de espécies dentro do reino *Fungi* é um processo comum, devido a sua plasticidade fenotípica muitas espécies são indistinguíveis a nível morfológico (Hawksworth e Lücking 2017). Esse fenômeno é recorrente dentro do gênero *Trichoderma* (Chaverri et al., 2003, 2015; Jaklitsch et al., 2013). Possuindo atualmente, dois grandes complexos de espécies, o clado Viride e o clado *Green-spored* especificamente o subclado Harzianum (Samuels et al., 2006; Druzhinina et al., 2010; Jaklitsch et al., 2013). Afim de delimitar as espécies dentro desses complexos, é empregado diversas formas de análises, como, concordância genealógica de diferentes genes, padrões geográficos e morfofisiológicos (Samuels et al., 2006; Druzhinina et al., 2010; Jaklitsch et al., 2013). O Clado Spirale não é um complexo de espécie, os padrões morfológicos, geográficos e fisiológicos são evidentes, nesse estudo, utilizamos os métodos voltados para delimitações de complexos afim de acurar os dados da melhor maneira possível. Dessa forma, afim de chegarmos em um *n* de espécies presente nesse clado, utilizamos o método de

delimitação de espécies, o ASAP, que vem sendo empregado em diferentes gêneros (Bustamante et al., 2021; Leavitt, et al., 2021; Zhang et al., 2022). Todavia, demonstramos por meio dessa metodologia que existem 14 APG's no Clado Spirale, sendo três delas exclusivas de espécies já descritas dentro do clado: *T. spirale* (APG 2), *T. subuliforme* (APG 4), *T. subazureum* (APG 10). Descrevemos também dois APG's pertencentes as espécies novas *T. gilbertensae* (APG 1) e *T. rubropilosa* (APG 9). Os isolados que constituem o APG 1 são oriundos de diferentes trabalhos, além disso, alguns isolados pertencentes ao mesmo trabalho foram coletados em diferentes locais, como os isolados, *T. spirale* LESF, que possuem locais de isolamentos diferentes (Tab. 1). Outra característica desse APG é a presença de isolados coletados em Camarões, África. A aparição desses isolados nesse grupo ainda é uma incógnita, evidenciando o pouco entendimento sobre os padrões biogeográficos das espécies de *Trichoderma*, uma vez que a maioria das espécies pertencentes a esse grupo são da América do Sul (Tab. 1). Com exceção do APG 1, 4, 7 e 8, todos os demais são formados com isolados que pertencem ao mesmo continente. Apenas os *Trichoderma* sp. nov. 7 (APG 7) e o *Trichoderma* sp. nov. 8 (APG 8) possuem característica de uma espécie cosmopolita, composto por isolados de diferentes continentes e habitats (Fig. 3 e Tab. 1). Apenas quatro APG's são constituídas por um único isolado, são eles: *Trichoderma* sp. nov. 3, 6, 11 e 14, onde dois são oriundos da América do Sul (APG's 11 e 14), um da Ásia (APG 6) e outro da Europa (APG 3). Esse isolados podem representar espécies novas de isolado único, o que vem se tornando cada vez mais comum dentro do gênero *Trichoderma* (Qiao et al., 2018; Zheng et al., 2021). Outro aspecto observado é a incongruência em relação ao APG 10, onde duas novas espécies descritas recentemente para o Clado Spirale estão presentes, representadas pelo *tef1* da espécie tipo de *T. subazureum* (MT070148.1) e pelo *tef1* do isolado identificado como ex-tipo de *T. asymmetricum* (MT070152.1). Contudo, em sua descrição, a identificação YMF 1.06203 atribuída a uma espécie denominado *T. asymmetricum* no material suplementar, faz referência a espécie *T. inaequilaterale* no trabalho publicado, que por sua vez, não se faz presente em nenhuma base de dados e nem nos dados suplementares (Zheng et al., 2021). Dessa forma, se faz necessário a revisão dessas sequências

referentes a espécie *T. asymmetricum*, no intuito de prevenir incongruências em análises futuras a qual a mesma possa estar presente.

5.4 Adição de novas espécies ao clado Spirale

O fator de alongamento 1- α (*tef1*) é utilizado como DNA *barcode* para distinguir isolados do gênero *Trichoderma* em nível de espécie, o *rpb2* é utilizado como marcador molecular secundário, além disso foi incluído um terceiro gene a *cal1* buscando uma resolução filogenética mais apurada (Qiao et al., 2018; Jiang et al., 2016). Utilizando desses marcadores recuperamos e demonstramos a monofilia do Clado Spirale e sua concordância genealógica com alto suporte estatístico (MV e PP > 90%) em todas as filogenias presentes nesse estudo (Fig. 3, 4, S2., S3 e S4) (Zheng et al., 2021, Chen e Zhuang 2017). Além disso, também demonstrando a concordância genealógica das espécies *T. gilbertensae* e *T. rubropilosa*, APG 1 e 9 respectivamente, ambas espécies possuem alto suporte estatístico (Fig. 3 e 4) com (MV e PP >90%). Todas as espécies descritas nesse estudo, possuem uma posição bem definida dentro do Clado Spirale, sendo *T. rubropilosa* espécie irmã de *T. subazureum* e *T. gilbertensae* intimamente relacionada com *T. spirale*.

5.5 A importância da identificação correta para o uso biotecnológico

Dentro do Clado Spirale atualmente alguns isolados de *T. spirale* possuem estudos e relatos de suas aplicações biotecnológicas (Li et al., 2012; Marques et al., 2016; Baiyee et al., 2019; Chen et al., 2020; Lacerda et al., 2021). Sendo algumas dessas aplicações, a produção de enzimas como β -1,3-glucanase e quitinase que realizam a degradação da parede celular proporcionando a inibição do crescimento de outros organismos (Kamala et al., 2015; Baiyee et al., 2019). Além disso, alguns isolados podem produzir compostos voláteis que inibe o desenvolvimento de fitopatógenos (Baiyee et al., 2019). Outros estudos demonstram que algumas cepas de *T. spirale*, também produzem compostos antitumorais como o tirosol e o ácido tricodêmico capazes de inibir a atividade de células cancerígenas (Li et al., 2010; Li e Zhang 2019). Com tudo, devido à falta de acurácia na identificação de algumas cepas desse gênero, algumas espécies podem estar sendo identificadas de forma errônea,

prejudicando assim o direcionamento de quais espécies e de quais isolados possuem o real valor biotecnológico. Como demonstrado nesse estudo, onde há registro de isolados com potenciais biotecnológicos que são espécies novas não descritas, um exemplo é o conjunto de isolados PPRC (APG 8), oriundos da África, que são descritos como isolados que possuem o potencial de biocontrole contra *Gibberella xylarioides*, agente causador da murcha do café (Belayneh Mulaw et al., 2010). Na composição de isolados do APG 1, atribuído a espécie nova *T. gilbertensae*, existe um isolado (*T. spirale* Th122) capaz de exercer o biocontrole contra *Sclerotinia sclerotiorum* (Tab. 1), *T. rubropilosa* (APG 9) faz parte de um estudo do controle de formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa*), apesar de não estar presente nos testes realizados, a mesma foi isolada do mesmo local onde outras espécies possuem esse potencial biotecnológico (Rocha et al., 2017). Logo, não se pode ser descartada a possibilidade de a mesma desempenhar esse potencial. Em relação a espécie de *T. spirale* identificadas com *tef1*, a única aplicação biotecnológica presente está associada aos isolados *T. spirale* PSF 064 e *T. spirale* PF001, ambos pertencentes ao AGP 2. Esses isolados são capazes de promover o crescimento de *Tricholoma matsutake*, aumentando a sua área de crescimento em 124 - 207% em relação às placas controle (Oh et al., 2019). Além desses problemas de identificação e atribuição de valores biotecnológicos utilizando o *tef1*, também a registros de identificações errôneas com outros marcadores, como o ITS. Um exemplo disso, ocorre em uma revisão onde é atribuído ao isolado *T. spirale* strain A17 a capacidade de produção de tirosol e ácido trichodêmico, compostos que são agentes do controle da atividade de células cancerígenas (Li et al., 2019). Contudo, a identificação desse isolado foi feita apenas com o gene ITS, que é 100% identificador com o ITS do tipo de *T. spirale*, e ao de *T. subazureum*, 99,82% identificador a *T. subuliforme* e 99,28% ao *T. hunanense*, tornando impossível determinar a qual espécie o potencial biotecnológico do isolado *T. spirale* A17 de fato pertence. Esse problema de atribuição biotecnológica foi alertado por Chaverri et al., (2015), demonstrando o problema acerca de identificações equivocadas sobre determinadas culturas, como no caso da cultura *T. harzianum* T22 que foi determinado como sendo *T. afroharzianum*, gerando problemas em produtos comerciais que utilizam esse isolado.

5.6 Os limites de *T. spirale*

Antes da formação do Clado Spirale, a espécie *T. spirale*, era considerada uma linhagem solitária dentro da taxonomia do gênero, ou seja, uma espécie que não possui uma relação filogenética definida com nenhuma outra espécie ou clado (Chaverri et al., 2003; Jaklitsch e Voglmayr 2015). Além disso, já existiam dezenas de sequências depositadas nos bancos de dados oriundas de todos os continentes dando a esta espécie a alcunhar de uma espécie cosmopolita contudo, como demonstrado nesse estudo, a espécie tipo de *T. spirale* DAOM 183974 = CBS 346.93, que foi isolado da Tailândia, por Bisset (1991), pertence ao APG 2, onde contém apenas isolados que foram obtidos na Ásia, incluindo o seu registro de ocorrência da Coreia do Sul, *T. spirale* KUC21268 (Jang et al., 2017). Esse APG possui apenas espécies que foram coletadas no continente Asiático, além disso esse APG é fortemente suportado por dados estatísticos (MV e PP >70%) nas análises filogenéticas (Fig. 3 e Fig. 4^a). Outro fator que corrobora com a formação desse APG e sua consistência geográfica, é que os isolados pertencentes ao APG 2 são oriundos de diferentes trabalhos e foram coletados em épocas e períodos diferentes, demonstrando que essa espécie possui uma consistência de amostragem ao longo do tempo nessa região (Fig. 3 e Tab. 1). Dessa forma, *T. spirale* não é uma espécie cosmopolita, e sim uma espécie restrita ao continente Asiático. Outra inconsistência associada a essa espécie, está relacionada aos seus isolados adicionais, como *T. spirale* isolado DAOM 177714 (Bisset 1991), que além de não fazer parte do APG 2, grupo no qual se encontra o tipo de *T. spirale*, possui uma localização geográfica distinta do tipo e as identidades dos *tef1* desses isolados adicionais variam de 93 a 97.56% quando comparada com o *tef1* do tipo (Fig. S1). Dessa forma, os limites fisiológicos e morfológicos atribuídos a espécie tipo, podem estar incorretos e devem ser revistos. Todavia, aconselha-se que seja refeita a descrição morfológica desta espécie com os isolados que são restritos a Ásia e que fazem parte do grupo taxonômico APG 2 e conseqüentemente, sejam revistos os isolados ditos como adicionais, quanto as sequências depositadas e suas relativas posições em uma filogenia do Clado Spirale.

5.7 Espécies escondidas

A demanda por espécies de *Trichoderma* que possuem potenciais biotecnológicos vem aumentando acentuadamente desde dos anos 90 (Bennett et al., 1998; Xiao et al., 2022). Este aumento está em grande parte associados a estudos de biodiversidade, taxonomia, controle biológico e produção de enzimas (Xiao et al., 2022). A realização desses estudos vem ocorrendo em diferentes épocas, onde a concepção para descrição e identificação das espécies de *Trichoderma* sofreram ajustes ao longo do tempo, acarretando dessa forma em um *pool* descontínuo de material genético nos bancos de dados. Um exemplo desse fenômeno, se dá nas primeiras descrições das espécies desse gênero, que foi iniciada com ITS e atualmente vem sendo feita com as RII e o início da RIII *tef1*, método esse que foi estabelecido a menos de uma década (Jaklitsch et al., 2013; Jaklitsch e Voglmayr 2015). Esse problema de descontinuidade de genes *barcodes* acabam gerando uma baixa veracidade taxonômica e consequentemente um número de espécies que não podem ser incluídas em análises futuras. Outro fator associado ao surgimento de espécies escondidas, é a falta de taxonomistas especialistas no gênero estudado em questão, principalmente em estudos associados a fins biotecnológicos (Lücking et al., 2020). A falta de um taxonomista acarreta na utilização de metodologias simplistas como a utilização da ferramenta *Blastn* para identificação dos isolados, ocasionando em identificações ou atribuições errôneas. Cai et al., (2020), ressaltam, esclarecem e estabelecem, terminologias, metodologias e a utilização correta dos genes *barcodes* empregados na descrição de *Trichoderma*. Além disso, Cai et al., (2020), estabelecem um protocolo de identificação para as espécies de *Trichoderma* com o objetivo de organizar e facilitar as futuras descrições. O protocolo é baseado em similaridade de sequências de referências, com os genes ITS, *rpb2*, e *tef1*, a concordância genealógica desses genes, uma descrição morfologia congruente com as espécies próximas e o padrão biogeográfico da espécie. Contudo, até o momento poucos estudos seguem o protocolo proposto (Zhang et al., 2022). Nesse estudo, adaptamos e seguimos o protocolo de descrição proposto por Cai et al., (2020), além disso, acrescentamos um método novo de delimitação de espécie (ASAP) que vem sendo utilizado tanto em estudos do gênero

Trichoderma, quanto em outros gêneros fúngicos ((Bustamante et al., 2021; Leavitt, et al., 2021; Zhang et al., 2022). Todavia, o protocolo proposto é útil para a padronização das descrições e a identificação das espécies, contudo, existem dezenas de sequências de espécies referência nas bases de dados que foram descritas fora desse padrão (Chaverri et al., 2003; Chen e Zhuang 2017; Gu et al., 2020). Dessa forma, é evidente a necessidade de novos estudos visando a padronização das espécies já descritas e a utilização do protocolo proposto afim de testá-lo em larga escala.

5.8 A falta de responsabilidade com os bancos de dados

Os autores são responsáveis pelas informações relativas às sequências de nucleotídeos e de proteínas depositadas em bases de dados públicas como o NCBI. Logo, erros na identificação em nível de espécie dos isolados do qual a sequência foi obtida acontecem por vários motivos. Primeiro, os autores podem não ter feito uma descrição morfológica detalhada do isolado seguida de uma identificação taxonômica e identificam o isolado em nível de espécie apenas via BLAST. Essa prática contribui para a propagação de erros de anotação na identificação da espécie que a sequência de nucleotídeos e de proteínas representa. A existência de espécies crípticas é um fenômeno comum no Reino *Fungi* (Chaverri et al., 2015; Druzhinina et al., 2010), estas espécies são indistinguíveis do ponto de vista morfológico, mas são distintas do ponto de vista evolutivo. Esse problema é agravado pela falta de critérios para a definição dos limites de diversidade genética e morfológica de uma espécie de fungo. Portanto, dependendo do grupo taxonômico que um determinado fungo pertence a designação correta da espécie a qual ele pertence pode ser um problema, principalmente se essa linhagem é representada por uma ou poucas sequências nas bases de dados. As questões relativas à anotação das sequências de nucleotídeos e de proteínas apresentadas acima não diminuem ou colocam em dúvida a importância das bases de dados públicas, contudo mostra que as informações depositadas nelas devem ser usadas com parcimônia e interpretadas caso a caso com conhecimento de causa para minimizar o risco de propagação de erros de anotação (Pertsemliadis e Fondon 2002). Dessa forma, a pouca diversidade encontrada na literatura pode não ser a real amostragem

desse clado, mostrado que a diversidade abrigada por ele é maior do que se pensa atualmente e que algumas espécies estudadas nesse trabalho já estão evoluindo de forma independente ao longo do tempo.

6. CONCLUSÕES

A maioria das sequências de *tef1* depositadas nas bases de dados do NCBI de isolados identificados como *T. spirale* representam 14 prováveis novas espécies pertencentes ao recente clado Spirale. Dessas 14 espécies, duas delas são descritas neste trabalho como *T. gilbertensae* e *T. rubropilosa*.

7. REFERENCIAS

Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Crozier, J., Thomas, S. E., Samuels, G. J., & Holmes, K. A. (2008). Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. **Biological control**, 46(1), 24-35.

<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.003>

Baiyee, B., Pornsuriya, C., Ito, S. I., & Sunpapao, A. (2019). *Trichoderma spirale* T76-1 displays biocontrol activity against leaf spot on lettuce (*Lactuca sativa* L.) caused by *Corynespora cassiicola* or *Curvularia aeria*. **Biological control**, 129, 195-200.

<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.10.018>

Belayneh Mulaw, T., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. (2010). The rhizosphere of *Coffea arabica* in its native highland forests of Ethiopia provides a niche for a distinguished diversity of *Trichoderma*. **Diversity**, 2(4), 527-549.

[doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01736.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01736.x)

Bennett, J. W. (1998). Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of biotechnology**, 66(2-3), 101-107.

[https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00133-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00133-3)

Bilung, L. M., Pui, C. F., Su'ut, L., & Apun, K. (2018). Evaluation of BOX-PCR and ERIC-PCR as molecular typing tools for pathogenic *Leptospira*. **Disease markers**, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1351634>

Bissett, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. **Canadian journal of botany**, 69(11), 2373-2417.

Bustamante, D. E., Calderon, M. S., Leiva, S., Mendoza, J. E., Arce, M., & Oliva, M. (2021). Three new species of *Trichoderma* in the Harzianum and Longibrachiatum lineages from *Peruvian cacao* crop soils based on an integrative approach. **Mycologia**, 113(5), 1056-1072.

<https://doi.org/10.1080/00275514.2021.1917243>

Cai, F., Dou, K., Wang, P., Chenthamara, K., Chen, J., & Druzhinina, I. S. (2022). The Current State of Taxonomy and Species Identification. In *Advances in Trichoderma Biology for Agricultural Applications* (pp. 3-35). **Springer, Cham.**

https://doi.org/10.1007/978-3-030-91650-3_1

Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, 91(3), 553-556.

Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., & Samuels, G. J. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. **Mycologia**, 107(3), 558-590. DOI: [10.3852/14-147](https://doi.org/10.3852/14-147)

Chaverri, P., Castlebury, L. A., Overton, B. E., & Samuels, G. J. (2003). *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. **Mycologia**, 95(6), 1100-1140. DOI: [10.2307/3761915](https://doi.org/10.2307/3761915)

Chaverri, P., Castlebury, L. A., Samuels, G. J., & Geiser, D. M. (2003). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. **Molecular phylogenetics and evolution**, 27(2), 302-313.

[https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00400-1](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00400-1)

Chen, K., & Zhuang, W. Y. (2017). Discovery from a large-scaled survey of *Trichoderma* in soil of China. **Scientific reports**, 7(1), 1-37.

Chen, Q., Gao, W., Zhu, C., Yan, Y., Pang, G., & Hu, Z. (2013). Establishment of ERIC-PCR DNA fingerprint on enterobacteriaceae in raw milk. **Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering**, 29(11), 261-269.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-07807-3>

Chen, S., Liu, H., Liu, Z., Li, S., Chen, Y., Li, H., ... & Zhang, W. (2020). Two new polyketide compounds from the endophytic fungus *Trichoderma spirale* A725 of

Morinda officinalis. **Chinese journal of organic chemistry**, 40(1), 209-214.
DOI: [10.6023/cjoc201907041](https://doi.org/10.6023/cjoc201907041)

Claverys, J. P., & Mabilat, C. (1998). *U.S. Patent No. 5,776,691*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

DOYL, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., Komoń, M., Bissett, J., Szakacs, G., & Kubicek, C. P. (2005). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. **Fungal Genetics and Biology**, 42(10), 813-828.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.06.007>

Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Komoń-Zelazowska, M., Mulaw, T. B., & Bissett, J. (2010). The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. **BMC Evolutionary Biology**, 10(1), 1-14.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-94>

Gazis, R., & Chaverri, P. (2010). Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **fungal ecology**, 3(3), 240-254. doi.org/10.1016/j.funeco.2009.12.001

Gerardo, N. M., Mueller, U. G., Price, S. L., & Currie, C. R. (2004). Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus–growing ant symbiosis. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, 271(1550), 1791-1798. DOI: [10.1098/rspb.2004.2792](https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2792)

Gu, X., Wang, R., Sun, Q., Wu, B., & Sun, J. Z. (2020). Four new species of *Trichoderma* in the Harzianum clade from northern China. **MycoKeys**, 73, 109.
doi: [10.3897/mycokeys.73.51424](https://doi.org/10.3897/mycokeys.73.51424)

Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology spectrum**, 5(4), 5-4.

<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016>

Hermosa, M. R., Keck, E., Chamorro, I., Rubio, B., Sanz, L., Vizcaíno, J. A., ... & Monte, E. (2004). Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. **Mycological research**, 108(8), 897-906.

DOI: [10.1017/s0953756204000358](https://doi.org/10.1017/s0953756204000358)

Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S., & Bissett, J. (2009). Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. **Fungal Genetics and Biology**, 46(9), 615-631. [doi:10.1016/j.fgb.2009.04.006](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.04.006)

Hulton, C. S. J., Higgins, C. F., & Sharp, P. M. (1991). ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular microbiology**, 5(4), 825-834. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00755.x>

Illescas, M., Pedrero-Méndez, A., Pitorini-Bovolini, M., Hermosa, R., & Monte, E. (2021). Phytohormone production profiles in *Trichoderma* species and their relationship to wheat plant responses to water stress. **Pathogens**, 10(8), 991. DOI: [10.3390/pathogens10080991](https://doi.org/10.3390/pathogens10080991)

Jaklitsch, W. M., & Voglmayr, H. (2015). Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. **Studies in mycology**, 80, 1-87. DOI: [10.1016/j.simyco.2014.11.001](https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.11.001)

Jaklitsch, W. M., Samuels, G. J., Ismaiel, A., & Voglmayr, H. (2013). Disentangling the *Trichoderma viridescens* complex. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, 31(1), 112-146. DOI: <https://doi.org/10.3767/003158513X672234>

Jang, S., Jang, Y., Kim, C. W., Lee, H., Hong, J. H., Heo, Y. M., ... & Kim, J. J. (2017). Five New Records of Soil-Derived *Trichoderma* in Korea: *T.*

albolutescens, *T. asperelloides*, *T. orientale*, *T. spirale*, and *T. tomentosum*. **Mycobiology**, 45(1),18.[https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.1.](https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.1.1)

[1](#)

Jankowiak, R., Stępniewska, H., Bilański, P., & Taerum, S. J. (2022). Fungi as potential factors limiting natural regeneration of pedunculate oak (*Quercus robur*) in mixed-species forest stands in Poland. **Plant Pathology**, 71(4), 805-817. <https://doi.org/10.1111/ppa.13529>

Jiang, Y., Wang, J. L., Chen, J., Mao, L. J., Feng, X. X., Zhang, C. L., & Lin, F. C. (2016). *Trichoderma* biodiversity of agricultural fields in east China reveals a gradient distribution of species. **PLoS One**, 11(8), e0160613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160613>

Kamala, T., Devi, S. I., Sharma, K. C., & Kennedy, K. (2015). Phylogeny and taxonomical investigation of *Trichoderma* spp. from Indian region of Indo-Burma biodiversity hot spot region with special reference to Manipur. **BioMed research international**, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/285261>

Katoh, K., Asimenos, G., & Toh, H. (2009). Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. In **Bioinformatics for DNA sequence analysis** (pp. 39-64). Humana Press. DOI: [10.1007/978-1-59745-251-9_3](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-251-9_3)

Kullnig-Gradinger, C. M., Szakacs, G., & Kubicek, C. P. (2002). Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. **Mycological Research**, 106(7), 757-767. [doi:10.1017/s0953756202006172](https://doi.org/10.1017/s0953756202006172)

Lacerda, J. W., Siqueira, K. A., Vasconcelos, L. G., Belleite, B. S., Dall'Oglio, E. L., Sousa Junior, P. T., ... & Sampaio, O. M. (2021). Metabolomic Analysis of *Combretum lanceolatum* Plants Interaction with *Diaporthe phaseolorum* and *Trichoderma spirale* Endophytic Fungi through 1H-NMR. **Chemistry & Biodiversity**, 18(10), e2100350. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100350>

Lee, A., & Wong, E. (2009). Optimization and the robustness of BOX A1R PCR for DNA fingerprinting using trout lake *E. coli* isolates. **J. Exp. Microbiol.**

Immunol, 13, 104-113.

Leavitt, S. D., Hollinger, J., Summerhays, S., Munger, I., Allen, J., & Smith, B. (2021). Alpine lichen diversity in an isolated sky island in the *Colorado Plateau*, USA—Insight from an integrative biodiversity inventory. **Ecology and evolution**, 11(16), 11090-11101. <https://doi.org/10.3390/jof8050490>

Li, D. L., Chen, Y. C., Tao, M. H., Li, H. H., & Zhang, W. M. (2012). Two new octahydronaphthalene derivatives from *Trichoderma spirale*, an endophytic fungus derived from *Aquilaria sinensis*. **Helvetica Chimica Acta**, 95(5), 805-809. <https://doi.org/10.1002/hlca.201100417>

Li, M. F., Li, G. H., & Zhang, K. Q. (2019). Non-volatile metabolites from *Trichoderma* spp. **Metabolites**, 9(3), 58. <https://doi.org/10.3390/metabo9030058>

Liu, Y. J., Whelen, S., & Hall, B. D. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. **Molecular biology and evolution**, 16(12), 1799-1808.

DOI: [10.1093/oxfordjournals.molbev.a026092](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026092)

Lücking, R., Aime, M. C., Robbertse, B., Miller, A. N., Ariyawansa, H. A., Aoki, T., ... & Schoch, C. L. (2020). Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding?. **IMA fungus**, 11(1), 1-32. <https://doi.org/10.1186/s43008-020-00033-z>

Marques, E., Martins, I., Cunha, M. D. O. C., Lima, M. A., Silva, J. B. T. D., Silva, J. P. D., ... & Mello, S. C. M. (2016). New isolates of *Trichoderma* antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biota Neotropica**, 16.

. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2016-0218>

Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., ... & Claverys, J. P. (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic acids research**, 20(13), 3479-3483. <https://doi.org/10.1093/nar/20.13.3479>

Mishra, R. K., Pandey, B. K., Pathak, N., & Zeeshan, M. (2015). BOX-PCR-and ERIC-PCR-based genotyping and phylogenetic correlation among *Fusarium oxysporum* isolates associated with wilt disease in *Psidium guajava* L. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 4(1), 25-32.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.09.012>

Montoya, Q. V., Meirelles, L. A., Chaverri, P., & Rodrigues, A. (2016). Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. **Antonie van Leeuwenhoek**, 109(5), 633-651.
[DOI 10.1007/s10482-016-0666-9](https://doi.org/10.1007/s10482-016-0666-9)

Nirenberg, H. (1976). Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der Fusarium-Sektion Liseola.

Oh, S. Y., Park, M. S., & Lim, Y. W. (2019). The influence of microfungi on the mycelial growth of ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake*. **Microorganisms**, 7(6), 169. DOI:[10.3390/microorganisms7060169](https://doi.org/10.3390/microorganisms7060169)

Pertsemlidis, A., & Fondon, J. W. (2001). Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLASTphemy). **Genome biology**, 2(10), 1-10.
<https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-10-reviews2002>

Puillandre, N., Brouillet, S., & Achaz, G. (2021). ASAP: assemble species by automatic partitioning. **Molecular Ecology Resources**, 21(2), 609-620.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281>

Qiao, M., Du, X., Zhang, Z., Xu, J., & Yu, Z. (2018). Three new species of soil-inhabiting *Trichoderma* from southwest China. **MycKeys**, (44), 63.
<https://doi.org/10.3897/mycokeys.44.30295>

Rocha, S. L., Evans, H. C., Jorge, V. L., Cardoso, L. A., Pereira, F. S., Rocha, F. B., ... & Elliot, S. L. (2017). Recognition of endophytic *Trichoderma* species by leaf-cutting ants and their potential in a Trojan-horse management

strategy. **Royal Society open science**, 4(4), 160628.

<http://dx.doi.org/10.1098/rsos.160628>

Rupesh, K. M., Vijai, S., Neelam, P., & Mohd, Z. (2013). Genetic characterization of *Fusarium oxysporum* isolated from guava in northern India. **African Journal of Microbiology Research**, 7(33), 4228-4234.

DOI: [10.5897/AJMR2013.5916](https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5916)

Samuels, G. J. (2006). *Trichoderma*: Systematics, the Sexual State, and Ecology. *Phytopathology*. 96, 195-206. DOI: [10.1094/PHYTO-96-0195](https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0195)

Samuels, G. J., Dodd, S. L., Gams, W., Castlebury, L. A., & Petrini, O. (2002). *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, 94(1), 146-170.

<https://doi.org/10.1080/15572536.2003.11833257>

Samuels, G. J., Dodd, S. L., Lu, B. S., Petrini, O., Schroers, H. J., & Druzhinina, I. S. (2006). The *Trichoderma koningii* aggregate species. **Studies in mycology**, 56(1), 67-133. <https://doi.org/10.3114/sim.2006.56.03>

Smith, A., Beltrán, C. A., Kusunoki, M., Cotes, A. M., Motohashi, K., Kondo, T., & Deguchi, M. (2013). Diversity of soil-dwelling *Trichoderma* in Colombia and their potential as biocontrol agents against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Journal of general plant pathology**, 79(1), 74-85.

DOI [10.1007/s10327-012-0419-1](https://doi.org/10.1007/s10327-012-0419-1)

Stern, M. J., Prossnitz, E., & Ames, G. F. L. (1988). Role of the intercistronic region in post-transcriptional control of gene expression in the histidine transport operon of *Salmonella typhimurium*: involvement of REP sequences. **Molecular microbiology**, 2(1), 141-152.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1988.tb00015.x>

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and**

evolution, 30(12), 2725-2729. DOI:[10.1093/molbev/mst197](https://doi.org/10.1093/molbev/mst197)

Urbez-Torres, J. R., Tomaselli, E., Pollard-Flamand, J., Boule, J., Gerin, D., & Pollastro, S. (2020). Characterization of *Trichoderma* isolates from southern Italy, and their potential biocontrol activity against grapevine trunk disease fungi. **Phytopathologia Mediterranea**, 59(3), 425-439. DOI: [10.14601/Phyto-11273](https://doi.org/10.14601/Phyto-11273)

Van Belkum, A., Struelens, M., de Visser, A., Verbrugh, H., & Tibayrenc, M. (2001). Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. **Clinical microbiology reviews**, 14(3), 547-560.

DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.547-560.2001>

Versalovic, J., Kapur, V., Mason Jr, E. O., Shah, U., Koeuth, T., Lupski, J. R., & Musser, J. M. (1993). Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains recovered in Houston: identification and molecular characterization of multiple clones. **Journal of Infectious Diseases**, 167(4), 850-856.

<https://doi.org/10.1093/infdis/167.4.850>

Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K., & Meyer, W. (1994). *DNA fingerprinting in plants and fungi*. **CRC press**.

Welsh, J., & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic acids research**, 18(24), 7213-7218. DOI:

<https://doi.org/10.1093/nar/18.24.7213>

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic acids research**, 18(22), 6531-6535. DOI:

<https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>

Wong, H. C., & Lin, C. H. (2001). Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers. **Journal of Clinical**

Microbiology, 39(12), 4233-4240.

DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.39.12.4233-4240.2001>

Xiao, P., Wu, D., & Wang, J. (2022). Bibliometric analysis of global research on white rot fungi biotechnology for environmental application. **Environmental Science and Pollution Research**, 29(1), 1491-1507.

<https://doi.org/10.1007/s11356-021-15787-1>

Zhang, Y., Clancy, J., Jensen, J., McMullin, R. T., Wang, L., & Leavitt, S. D. (2022). Providing Scale to a Known Taxonomic Unknown—At Least a 70-Fold Increase in Species Diversity in a Cosmopolitan Nominal Taxon of Lichen-Forming Fungi. **Journal of Fungi**, 8(5), 490. DOI:

<https://doi.org/10.3390/jof8050490>

Zheng, H., Qiao, M., Lv, Y., Du, X., Zhang, K. Q., & Yu, Z. (2021). New species of *Trichoderma* isolated as endophytes and saprobes from southwest china. **Journal of fungi**, 7(6), 467. <https://doi.org/10.3390/jof7060467>

Zhu, P., van der Ende, A., Falush, D., Brieske, N., Morelli, G., Linz, B., & Achtman, M. (2001). Fit genotypes and escape variants of subgroup III *Neisseria meningitidis* during three pandemics of epidemic meningitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98(9), 5234-5239.

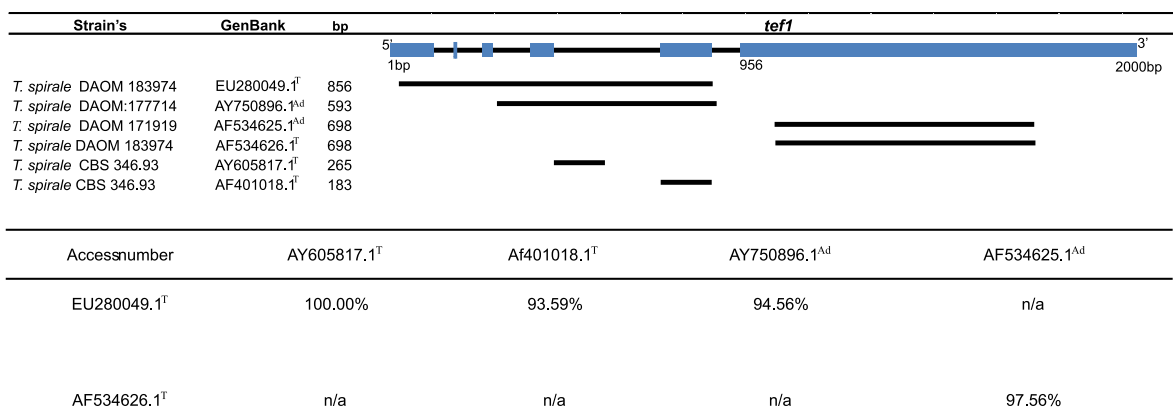
<https://doi.org/10.1073/pnas.061386098>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As informações depositadas nos bancos de dados são de grande importância para o estudo sobre biodiversidade e estudos genéticos, dessa forma, os dados depositados devem ser curados afim de minimizar as incongruências e seus relativos problemas. Nesse estudo, demonstramos que 88 sequencias do *tef1* de isolados relacionados com a espécie *T. spirale*, representam 11 espécies novas, duas delas são descritas aqui como *T. gilbertensae* e *T. rubropilosa*. Descrevemos também a primeiras espécies do gênero *Trichoderma* relacionadas com o ecossistema restinga, sendo ela, a já citada *T. gilbertensae*, e a espécie oriunda de Mata Atlântica, *T. sexdens* e *T. rubropilosa*. Essa biodiversidade oriunda da restinga de Guaibim, Bahia evidencia a necessidade para mais estudos voltados para essa área de proteção ambiental e o levamento da sua micobiota local, afim de reduzir as perdas futuras que atingirá esse ecossistema.

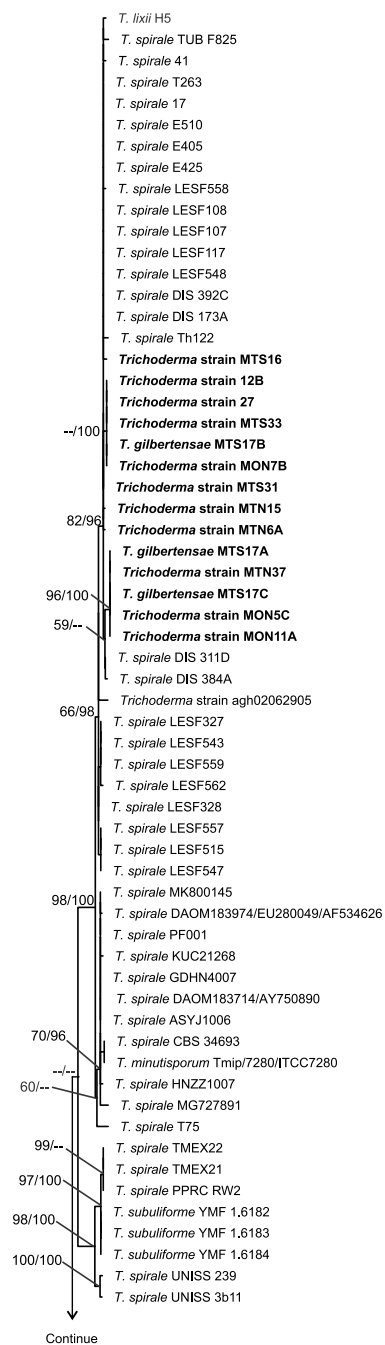
APÊNDICE: Árvores filogenéticas e Tabelas suplementares.

Figura S1 – Fragmentos das sequências do *tef1* depositadas no NCBI referente aos isolados tipos e adicionais de *T. spirale* com suas respectivas posições e identidades. Sequência pertencente a espécie tipo (^T), sequências pertencentes



a isolados adicionais (^{Ad})

Figura S2 - Filogenia da melhor árvore de Máxima Verossimilhança revelada por RAxML a partir de uma análise do alinhamento da sequência do *tef1* de todos os isolados relacionadas com *T. spirale*, grupo externo, *T. longisporum* e *T. hunanense*. MV acima de 50% (esquerda), PP acima de 80% (direita), indicada nos nós. Novas espécies e isolados deste estudo estão indicados em negrito.



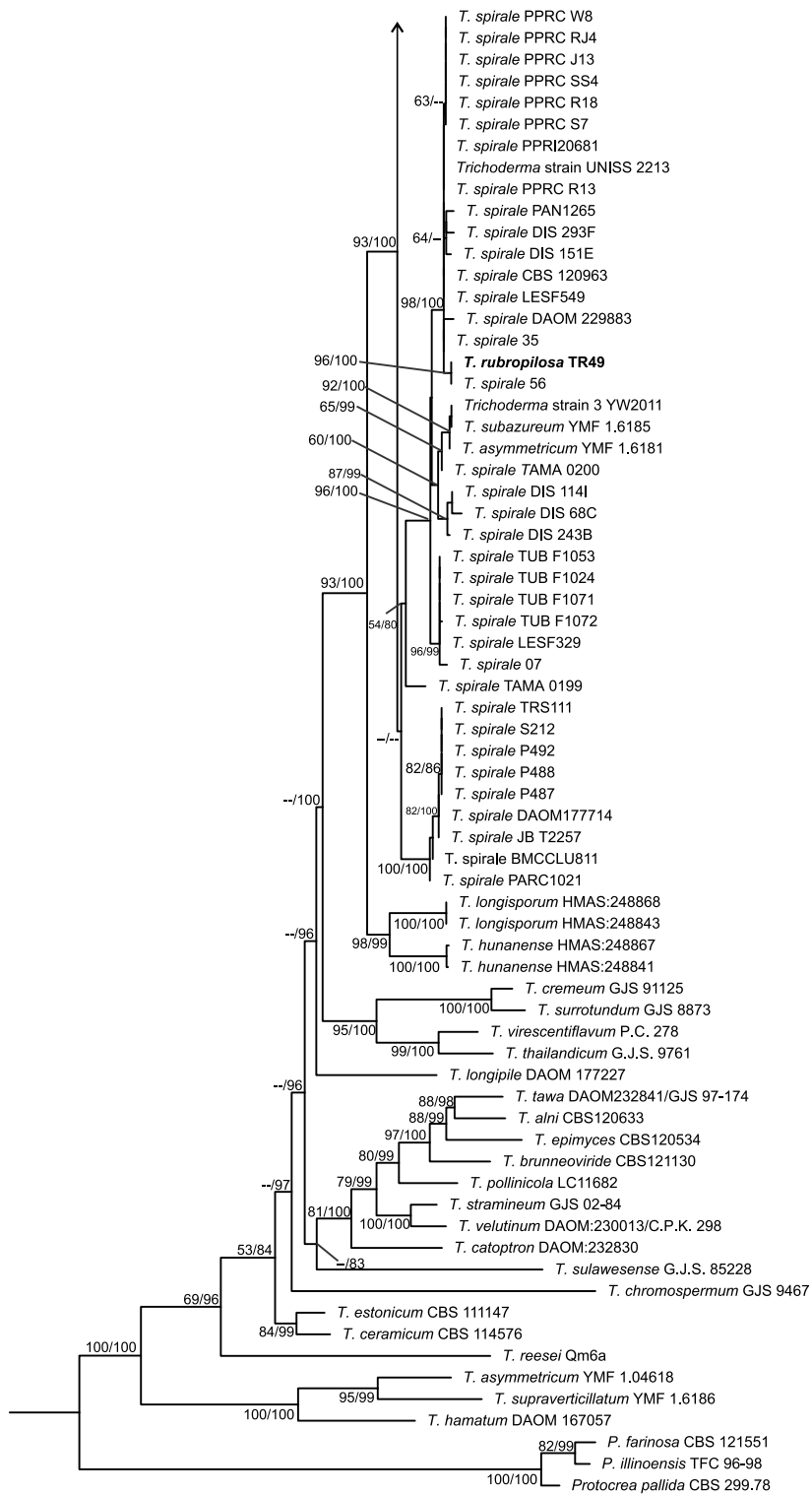


Figura S3 – Filogenia da melhor árvore de Máxima Verossimilhança árvore revelada por RAxML a partir de uma análise do alinhamento das sequências *rpb2* e *cal1* de espécie do clado Spirale e *green-spored*, utilizando *Protocrea farinosa*, *P. illinoensis*, *P. pallida* como grupo externo. MV acima de 50% (esquerda), PP acima de 80% (direita), indicado nos nódulos. Novas espécies propostas estão indicadas em negrito.



Figura S4 – Filogenia da melhor árvore de Máxima Verossimilhança revelada por RAxML a partir de uma análise do alinhamento das sequências *cal1* do clado Spirale e *green-spored*, utilizando *T. hamatum* como grupo externo. MV acima de 50% (esquerda), PP acima de 80% (direita), indicado nos nódulos. Novas espécies propostas estão indicadas em negrito.

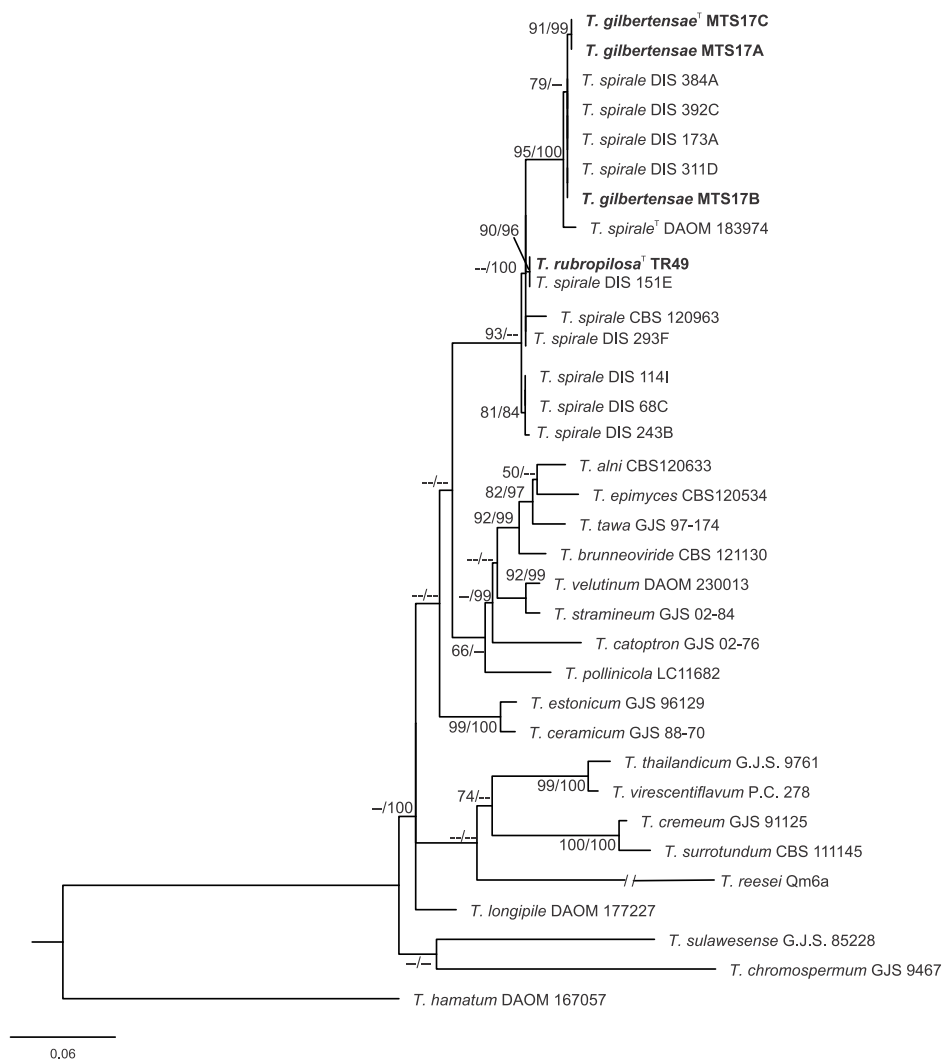


Tabela S1 – Números de acesso GenBank de táxons usados em análises filogenéticas.

Type	Strain Number	NCBI GenBank		
		<i>tef1</i>	<i>rpb2</i>	<i>cal1</i>
<i>T. subuliforme</i>	YMF 1.06204	MT070149.1		
	YMF 1.6182	MT070151.1*		
	YMF 1.6183	MT070150.1		
<i>T. subazureum</i>	YMF 1.6185	MT070148.1	MT052190.1	
<i>T. supraverticillatum</i>	YMF 1.6186	MT070147.1	MT052191.1	
<i>T. asymmetricum</i>	YMF 1.6181	MT070152.1	MT052186.1	
	YMF 1.04618		MK795987.1*	
<i>T. longisporum</i>	HMAS:248843	KY688043.1*	KY687982.1	
	HMAS:248868	KY688044.1		
<i>T. hunanense</i>	HMAS:248841	KY688039.1*	KY687980.1	
	HMAS:248867	KY688040.1		
<i>T. spirale</i>	DAOM 183974	EU280049.1	AF545553.1	FJ442395.1
<i>T. ceramicum</i>	CBS 114576	FJ860628.1	FJ860531.1	FJ442401.1
<i>T. estonicum</i>	GJS 96-129	FJ860638.1	AF545514.1	JN133526.1
<i>T. longipile</i>	DAOM 177227	AY937430.1	AF545550.1	JN133534.1
		AF534622.1		
<i>T. catoptron</i>	G.J.S. 02-76 DAOM:232830	KJ871245.1	AY391900.1	FJ442387.1
		AY737726.1		
		AY391963.1		
<i>T. stramineum</i>	G.J.S. 02-84	AY737746.1	AY391945.1	FJ442386.1
		AY391999.1		
<i>T. velutinum</i>	DAOM 230013	KJ665769.1	JN133569.1	JN133550.1
<i>T. epimyces</i>	CBS120534	EU498320.2	EU498360.1	EU498332.1
<i>T. alni</i>	CBS120633	EU498312.1	EU498349.1	EU498326.1
<i>T. tawa</i>	G.J.S. 97-174 DAOM 232841	EU279972.1	AY391956.1	FJ442406.1
		AY737739.1		
		AY392004.1		
<i>T. brunneoviride</i>	CBS121130	EU498316.1	EU498357.1	EU498329.1
<i>T. thailandicum</i>	G.J.S. 97-61	AY737748.1	AY391957.1	JN133546.1
		AY392005.1		
		AY737749.1	AY391959.1	JN133552.1
<i>T. virescentiflavum</i>	P.C. 278	AY392007.1		
		AY737728.1	AY391913.1	JN133523.1
<i>T. chromospermum</i>	G.J.S. 94-68	AY391973.1		
		AY737730.1	AY391954.1	FJ442408.1
<i>T. sulawesense</i>	G.J.S. 85-228	AY392002.1		
		MF939619.1	MF939604.1	MF939586.1
<i>T. pollinicola</i>	LC11682	MF939619.1	MF939604.1	MF939586.1
<i>T. hamatum</i>	DAOM 167057	EU279965.1	AF545548.1	DQ122154.1
		AF534620.1		
<i>T. reesei</i>	DAOM:167654 QM 6a	CP016234.1	KJ842213.1	JN180917.2
<i>T. cremeum</i>	GJS 91-125	AY737736.1	AF545511.1	JN133525.1
		AF534598.1		
<i>T. surrotundum</i>	GJS 88-73	AY737734.1	AF545540.1	JN133545.1
		AF534594.1		
<i>Protocrea farinosa</i>	CBS 121551	EU703905.1	EU703935.1	
<i>Protocrea illinoensis</i>	TFC 96-98	EU703889.1	EU703952.1	
<i>Protocrea pallida</i>	CBS 299.7	EU703900.1	EU703948.1	