

Análise *in silico* do potencial de produção de metabólitos de *Trichoderma asperelloides*

Fonseca, Jennifer Salgado^{1,3}; Gwinner, Raoni³; Sousa, Thiago Fernandes^{1,3};
Koolen, Hector Henrique²; Silva, Gilvan Ferreira³; Fernandes, Kamila Rangel
Primo¹; Souza, Afonso Duarte Leão¹; Souza, Antonia Queiroz Lima¹

¹Universidade Federal do Amazonas, ²Universidade do Estado do Amazonas, ³Empresa
Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Email: fonseca.jsd@gmail.com

Resumo

Trichoderma asperelloides foi descrito pela primeira vez por Samuels em 2010, com base em uma revisão taxonômica, sendo segregado de *Trichoderma asperellum*. Desde então, muitos estudos *in vitro* e em planta foram realizados e demonstram o potencial da espécie para o biocontrole bem como para produção de moléculas com diversas aplicações biotecnológicas. Embora bem explorado do ponto de vista químico, poucos estudos têm utilizado a abordagem genômica para caracterização de vias biossintéticas relacionadas ao metabolismo secundário. Neste trabalho foi realizado o sequenciamento do genoma completo de *T. asperelloides* (T.145) isolado de *Victoria amazonica* visando a prospecção de clusters gênicos biossintéticos (BGCs). Foram identificados 36 clusters, nos quais 4 apresentaram 100% de similaridade com vias já caracterizadas, indicando que a linhagem é capaz de produzir ácido clavárico, eniatina, colina e peramina.

Palavras-Chave: BGC; Micotoxinas; NRPS

Introdução

A ubiquidade de *Trichoderma* em solos naturais e agrícolas é uma prova de que é um bom competidor por espaço e pelos recursos nutricionais (Monte et al. 2019). É encontrado em quase todos os solos e também em habitats naturais que contêm grandes quantidades de matéria orgânica, onde se comporta como excelente decompositor de material vegetal e fúngico. Além disso, muitas espécies de *Trichoderma* mostram uma grande versatilidade metabólica, além de grande variação genética inter e intraespecífica, que lhes permite crescer utilizando uma ampla gama de fontes de carbono e de nitrogênio (Shanmugam et al. 2008; Silva 2020).

Dentre os metabólitos já descritos, pode-se citar ácido indolacético (AIA),

sideróforos, solubilizadores de fosfato, β -1,3-glucanase, quitinase, celulase, lipase e protease, antraquinonas, peptaibols, peptídeos não-ribossômicos, policetídeos (trichoharzianol), terpenos (isoharziandione), pironas (6-pentyl-a-pyrone) e outros compostos voláteis e não voláteis (Bara et al. 2003; Liu et al. 2009; Jeerapong et al. 2015, França et al. 2017; Monte et al. 2019; Nandini et al. 2021; Zhang et al. 2021).

Por ser uma espécie descoberta em 2010 por Samuel e colaboradores, ainda se faz necessário muitos estudos metabólicos e genômicos para descrever o *Trichoderma asperelloides*. Desta forma, apenas em 2021 é relatado o primeiro isolamento de metabólitos secundários (11R-methoxy-5,9,13-proharzitrien-19-ol, 3S-hydroxy-9R, 10R-dihydroharzianone, 3S-hydroxyTrichodermaerin, methyl-3S-hydroxy- 10, 11-seco-harzianate, harzianol J, harziandione, harzianone, harzianol A, 9-harzien- 11-ol e Trichodermaerin) de *T. asperelloides* e a elucidação das estruturas destes compostos (Zhou et al. 2021).

Ainda em 2021, também foram descritas peptaibols (asperelinas), com o suporte de cromatografia líquida acoplada com espectrofotômetro de massa, de uma linhagem de *T. asperelloides* isolado de *Victoria amazonica*, sendo uma com estrutura inédita na literatura (Fernandes et al. 2021).

Na literatura, este fungo é descrito como um potencial inoculante e biofertilizante, algo que é comum das demais espécies do mesmo gênero (Phoka et al. 2020; Ramírez-Cariño et al. 2020; Ruangwong et al. 2021)

Para colaborar com os estudos químicos, é imprescindível realizar a mineração genômica, uma vez que estes permitem avaliar e elucidar vias biossintetizadoras de metabólitos secundários de interesse biotecnológico e estabelecer os alvos numa purificação e caracterização química dos extratos, economizando recursos e otimizando os processos.

O objetivo desta pesquisa foi analisar os clusters gênicos de *Trichoderma asperelloides* para a identificação de possíveis novas moléculas.

Material e Métodos

A linhagem de *T. asperelloides* (T.145) foi isolada da planta aquática amazônica *Victoria amazonica* (Poepp.) J.C. Sowerby, Nymphaeaceae, coletada no município de Careiro, Estado do Amazonas, Brasil (registro SISGEN

brasileiro: A39C76B). A identificação da espécie foi realizada com base em filogenia multilocus usando os barcodes ITS, tef e rpb2.

O genoma foi obtido por sequenciamento Illumina com comprimento de read de: 2 x 150 pb (Paired End). O genoma montado obteve cobertura de 428X e foi submetido a identificação de BGCs por meio da plataforma antiSMASH fungal version 7.0 (02/01/2023). Os genes foram anotados por meio do plugin AUGUSTUS do software Geneious usando *Fusarium* como referência e a predição funcional dos genes foi realizada pelas plataformas PFAM e NCBI.

Resultados e Discussão

A mineração genômica da linhagem T.145 resultou em 36 clusters biossintéticos distribuídos em diferentes classes: terpenos (8), NRPS (14), PKS (10) e híbridos (3), sendo em sua maioria de função desconhecida (Tabela 1).

No cluster 5.2, ocorre a biossíntese de ácido clavárico (100% de similaridade com o terpeno descrito em *Hypholoma sublateritium*), um triterpenoide inibidor da proteína farnesyltransferase, atuando assim na redução de tumores. Este composto é comumente encontrado em cogumelos (*Clavariadelphus truncatus*, *Hypholoma sublateritium*), mas há estudos que comprovam sua biossíntese em espécies de *Trichoderma* (Jayasuriya et al. 1998; Tamizi et al. 2022).

Dentre os clusters relacionados a PKS analisadas, somente a do cluster 2.1 (BGC 1) apresentou correspondência com alguma molécula já descrita, após todas as análises *in silico*, e depositada nos bancos de dados, ácido carboxílico atrocrisona (ACA), uma antraquinona empregada como laxativo e catártico. Essa molécula é produzida por uma PKS I interativa previamente relatada em *Aspergillus terreus* e com expressão heteróloga em *Aspergillus oryzae* (Kan et al. 2020).

Os clusters 6.1 (BGC 9) e 24.1 (BGC 24) possuem os genes para síntese de tricodieno sintase (TRI5), um sequiterpeno ciclase, que catalisa a formação de tricodieno na biossíntese de antibióticos e micotoxinas. Além disso, ambos os clusters possuem o gene de amino transferase, o que aumenta as possibilidades de moléculas que podem ser sintetizadas, como tricodienos, tricotecenos e tricoderminas (Proctor et al. 2018; Barué et al. 2019).

Tabela 1. Clusters gênicos biossintéticos (BGC) de metabólitos previstos no genoma de *Trichoderma asperelloides* usando FungiSmash 7.0.

BGC	Tipo	Tamanho (pb)	Similaridade (%)	Metabólito	MIBig ID
1	PKS I	42.642	19	Ácido abscísico	BGC0001893
2	NRPS	45.733	-	-	
3	Terpeno	16.410	-	-	
4	Terpeno	22.110	40	Ácido zaragozico	BGC0001839
5	Terpeno	21.478	-	-	
6	PKS I	46.527	-	-	
7	Terpeno	22.373	100	Ácido clavarico	BGC0001248
8	PKS I-NRPS-NRPS-like	76.264	15	Leucinastatina	BGC0001989
9	Terpeno	20.980	-	-	-
10	PKS I	47.561	50	Tricóxido	BGC0002233
11	PKS I	47.367	-	-	-
12	NRPS-like	42.888	-	-	-
13	Terpeno	13.582	-	-	-
14	NRPS	46.016	100	Eniatina	BGC0000343
15	PKS I	46.215	-	-	-
16	NRPS	46.079	11	Ergotamina	BGC0001249
17	NRPS	44.921	62	Ácido dimerúmico	BGC0002710
18	PKS I	47.840	-	-	-
19	NRPS	58.405	-	-	-
20	NRPS-like	46.203	-	-	-
21	NRPS-like	43.858	100	Colina	BGC0002276
22	PKS I	47.444	35	Ácido fusárico	BGC0002228
23	Terpeno	21.569	-	-	-
24	Terpeno	21.003	-	-	-
25	NRPS-like	30.914	-	-	-
26	NRPS-like	42.387	-	-	-
27	PKS I	47.355	9	Triptoquialanina	BGC0002525
28	NRPS	36.019	-	-	-
29	NRPS-PKS I	66.629	-	-	-
30	NRPS-like	30.078	-	-	-
31	NRPS	46.263	-	-	-
32	PKS I	47.473	-	-	-
33	NRPS-PKS I	103.093	-	-	-
34	PKS I	45.242	-	-	-
35	NRPS-like	41.127	100	Peramina	BGC0002295
36	Fungal-RiPP-like	60.312	-	-	-

Os genes encontrados no cluster 28.1 (BGC 28) para a formação do tricoteceno T2, indicam que possivelmente o tricodieno sintetizado nos clusters 6.1 e 24.1 ser direcionado para a formação de inúmeros tricotecenos e a tricodermina, sendo este último formado pela superexpressão de TRI5, o que é

uma hipótese válida uma vez que se observa que há dois clusters para a biossíntese do mesmo composto (Gupta 2007; Baruá et al. 2019).

Dentre os BGC apontados na Tabela 1, 86% não apresentaram nenhuma correspondência com clusters já caracterizados e depositados na base de dados MIBiG, indicando que esses BGCs são novos e podem produzir novos compostos.

Apesar do cluster 12.1 (BGC 19) não apresentar similaridade com clusters já conhecidos (Figura 1), a análise filogenética da NRPS codificada pelo gene 33 revelou similaridades com a NRPS de *Fusarium* para a produção de fusaricidina. Esses resultados podem indicar semelhanças estruturais do produto do BGC 19 com esse lipopeptídeo (Figura 2, 3).

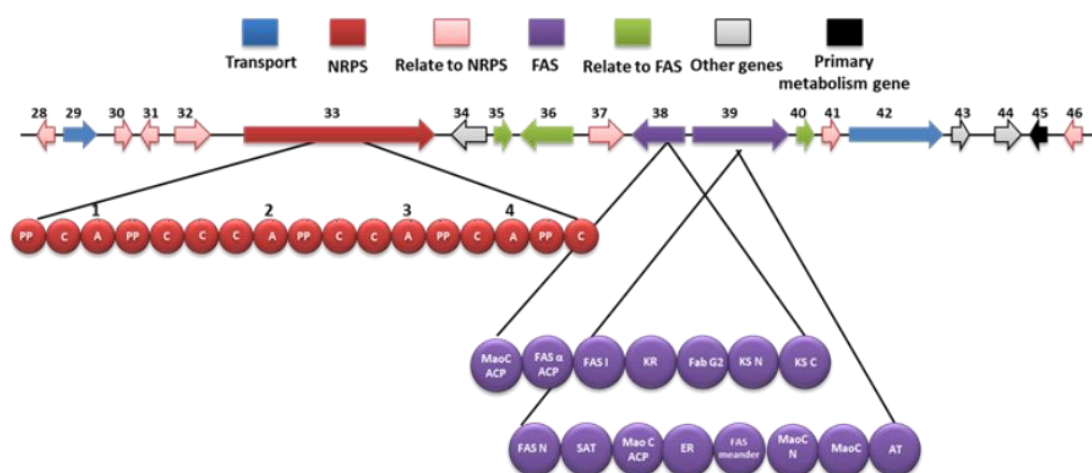


Figura 1. Representação do cluster 12.1 de *Trichoderma asperelloides* com a organização dos domínios dos genes 33 (NRPS), 38 e 39 (FAS).

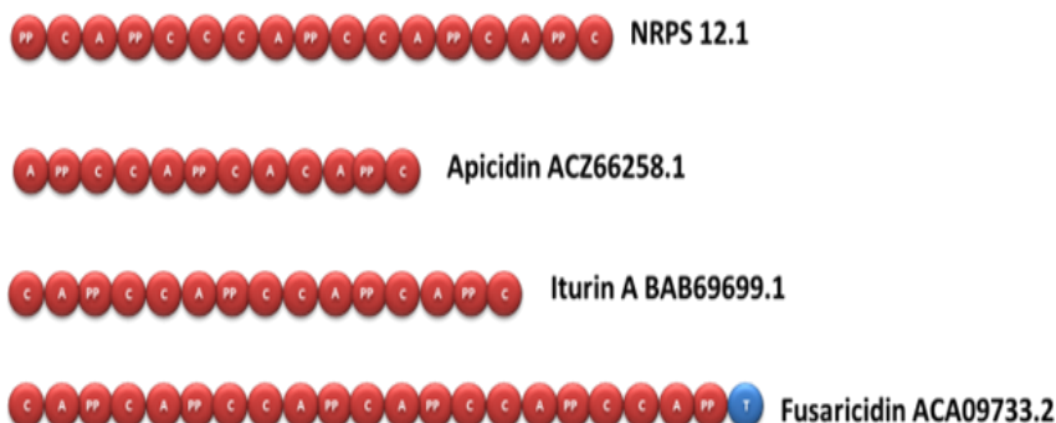


Figura 2 - Organização dos domínios de NRPS responsáveis pela biossíntese de lipopeptídeos com similaridade com o sintetizado no cluster 12.1.

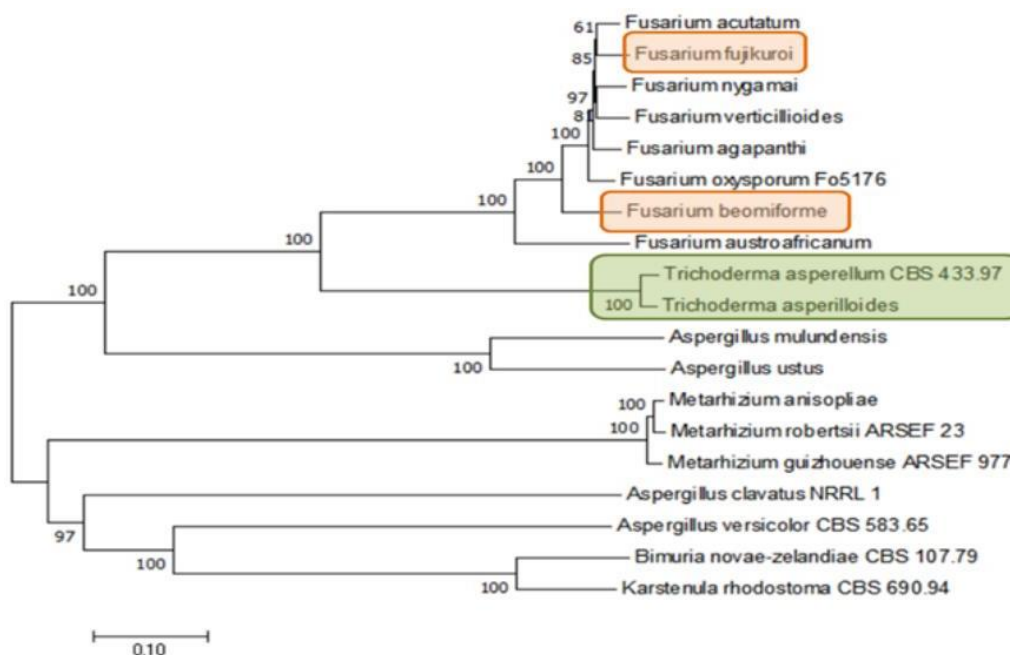


Figura 3. Filogenia da sequência de aminoácidos da NRPS do cluster 12.1.

Como comentado anteriormente, essa NRPS possui um trio de domínios de condensação incomum. Com base na ordem de similaridade, foram escolhidos três microrganismos (Figura 3) para estudar a organização da NRPS (Figura 4). *Trichoderma asperellum*, *Fusarium beomiforme* e *Fusarium fujikuroi* com 96.25%, 52.11% e 51.81%, respectivamente, de similaridade com a sequência de aminoácidos da NRPS em questão.

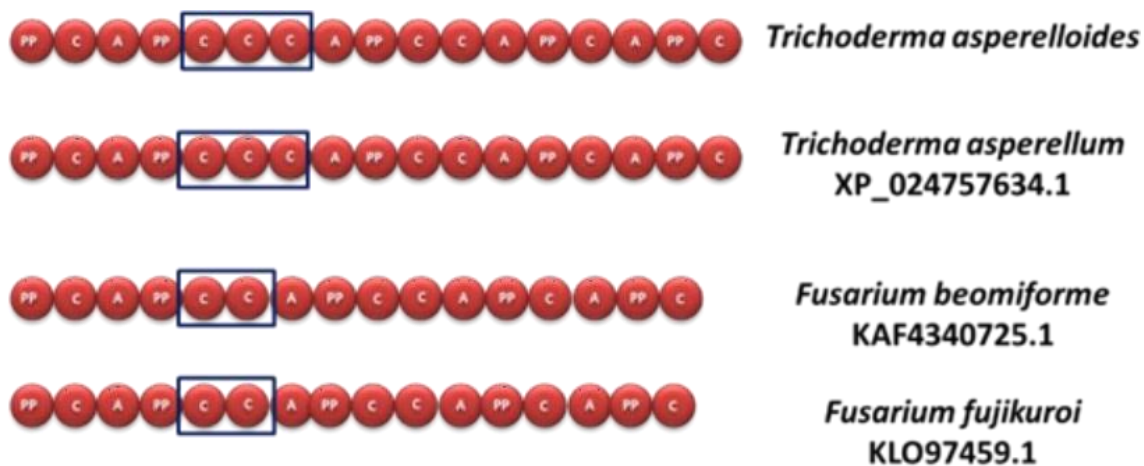


Figura 4. Organização dos domínios de NRPS de maior a menor similaridade com a *T. asperelloides*.

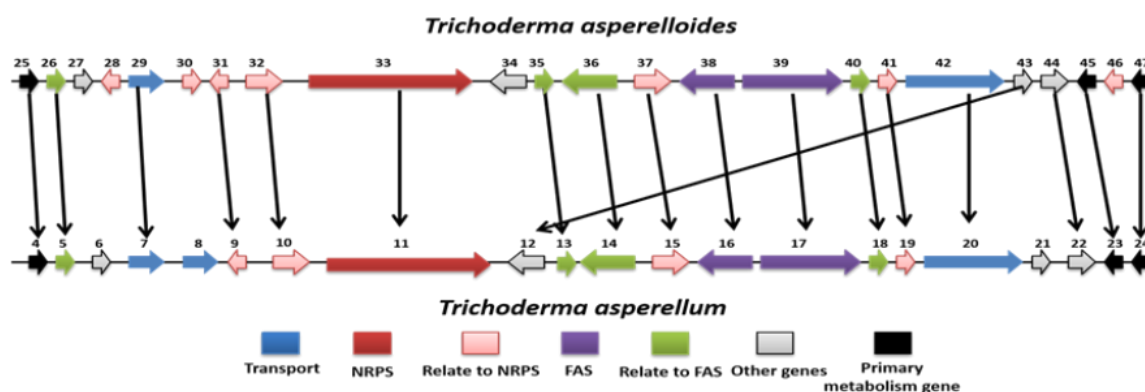


Figura 5. Organização e comparação dos clusters 12.1 (*T. asperelloides*) e 11.1 (*T. asperellum*).

A comparação do cluster 12.1 com *T. asperellum* revelou uma metiltransferase (gene 30) não compartilhada em *T. asperelloides*. Esses resultados podem indicar uma decoração na molécula, o que implica que o lipopeptídeo final formado terá diferenças químicas do formado pelo *T. asperellum*.

A compreensão das vias produtoras de biomoléculas possibilita não apenas a otimização da produção das mesmas, mas também a modificação do produto final, levando a novas moléculas e aplicações. Ter um microorganismo com o *T. asperelloides*, com alto potencial biotecnológico de aplicação, com apenas 14% das moléculas já descritas na literatura a nível genômico demonstra o quanto ainda são necessários estudos.

Conclusões

A avaliação preliminar dos clusters evidencia o potencial de produção de antibióticos e micotoxinas, características interessantes ao se considerar o desenvolvimento de um inoculante. Por haver estudos de isolamento de alguns compostos produzidos por *T. asperelloides*, torna-se possível prever quais clusters são responsáveis pela produção dos mesmos ao aprofundar as análises.

Agradecimentos

À FAPEAM, CNPq, CAPES e Embrapa pelo apoio à pesquisa.

Referências

Bara, M.; Lima, A.; Ulhoa, C. 2003. Purification and characterization of an exo-beta-1,3- glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiology* 219(1): 81-85.

Barúa, J.; Cruz, M.; Pedro, N.; Cautain, B.; Hermosa, R.; Cardoza, R.; et al. 2019. Synthesis of Trichodermin derivatives and their antimicrobial and cytotoxic activities. *Molecules* 24(3811): 1-14.

Fernandes, K.; Souza, A.; Santos, L.; Nogueira, F.; Evaristo, J.; Carneiro, G.; et al. 2021. Asperelines produced by the endophytic fungus *Trichoderma asperelloides* from the aquatic plant *Victoria amazonica*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 31: 667-675.

Jayasuriya, H.; Silverman, K.; Zink, D.; Jenkins, R.; Sanchez, M.; Pelaez, F.; et al. 1998. Clavaric Acid: a triterpenoid inhibitor of farnesyl-protein transferase from *Clavariadelphus truncatus*. *Journal of Natural Products* 61: 1568-1570.

Jeerapong, C.; Phupong, W.; Bangrak, P.; Intana, W.; Tuchinda, P. 2015. Trichoharzionol, a new antifungal from *Trichoderma harzium* F031. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(14): 3704-3708.

Liu, S.; Lo, C.; Shibu, M.; Leu, Y.; Jen, B.; Pen, K. 2009. Study on the anthraquinones separated from the cultivation of *Trichoderma harzium* strain Th-R16 and their biological activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(16): 7288-7292.

Gupta, R.C. 2007. *Veterinary toxicology*. Academic press, 1201p.

Nandini, B.; Puttaswamy, H.; Saini, R.; Prakash, H.; Geetha, N. 2021. Trichovariability in rhizosphere soil samples and their biocontrol potential against downy mildew pathogen in pearl millet. *Science Reports* 11(1): 9517.

Phoka, N.; Suwannarach, N.; Lumyong, S.; Ito, S.I.; Matsui, K.; Arikiti, S.; Sunpapao, A. 2020. Role of volatiles from the endophytic fungus *Trichoderma asperelloides* PSU-P1 in biocontrol potential and in promoting the plant growth of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Fungi* 6(341): 1-15.

Ramírez-Cariño, H.F.; Guadarrama-Mendoza, P.C.; Sánchez-López, V. 2020. Biocontrol of *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* by *Trichoderma asperelloides* and *Bacillus paralicheniformis* in tomato plants. *Antonie van Leeuwenhoek* 113: 1247-1261.

Reitz, Z.; Hardya, C.; Suka, J.; Bouveta, J.; Butler, A. 2019. Genomic analysis of siderophore β -hydroxylases reveals divergent stereocontrol and expands the condensation domain family. *PNAS Latest Articles* 116(40): 19805-19814.

Ruangwong, O.U.; Wonglom, P.; Suwannarach, N.; Kumla, J.; Thaochan, N.; Chomnunti, P.; et al. 2021. Volatile organic compound from *Trichoderma asperelloides* TSU1: impact on plant pathogenic fungi. *Journal of Fungi* 7(187): 1-13.

Samuels, G.; Ismaiel, A.; Bon, M.; Respinis, S.; Petrini, O. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia* 102(4): 944-966.

Tamizi, A.; Mat-Amin, N.; Weaver, J.; Olumakaiye, R.; Akbar, M.; Jin, S.; et al. 2022. Genome sequencing and analysis of *Trichoderma* (Hypocreaceae) isolates exhibiting antagonistic activity against the papaya dieback pathogen, *Erwinia mallotivora*. *Journal of Fungi* 8(246): 1-19.

Zhang, J.; Tang, W.; Huang, Q.; Li, Y.; Wei, M.; Jiang, L.; et al. 2021. *Trichoderma*: a treasure house of structurally diverse secondary metabolites with medical importance. *Frontiers in Microbiology* 12: 1-21.

Zhou, J.; Song, Y.; Zeng, Z.; Nai-Yun, J. 2021. Proharziane and Harziane derivatives from the marine algicolous fungus *Trichoderma asperelloides* RR-dl-6-11. *Journal of Natural Products* 84: 1414-1419.